



**HAL**  
open science

# Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'adaptation des cellules endothéliales à la température

Julie Vorbe

► **To cite this version:**

Julie Vorbe. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'adaptation des cellules endothéliales à la température. Biologie moléculaire. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7174 . tel-03278436

**HAL Id: tel-03278436**

**<https://theses.hal.science/tel-03278436v1>**

Submitted on 5 Jul 2021

**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.

Thèse de doctorat de l'Université de Paris  
Préparée à l'école doctorale Bio Sorbonne Paris Cité, n°562  
Laboratoires **Sanofi-Aventis** et **LVTS (Inserm U1148)**

**Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués  
dans l'adaptation des cellules endothéliales à la  
température**

Thèse soutenue publiquement le 19 novembre 2020 par  
**Julie VORBE**

**Composition du jury**

---

<b>Chantal BOULANGER</b>	Directeur de Recherche Université de Paris (UMR S970)	Présidente
<b>Cécile VINDIS</b>	Directeur de Recherche Université de Toulouse (UMR 1048)	Rapporteur
<b>Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA</b>	Directeur de Recherche Université d'Angers (UMR 1063)	Rapporteur
<b>Jean-François ARNAL</b>	Professeur des Universités Université de Toulouse (UMR 1048)	Examineur
<b>Stéphane ILLIANO</b>	Responsable de service scientifique Sanofi-Aventis R&D	Co-directeur de thèse
<b>Antonino NICOLETTI</b>	Professeur des Universités Université de Paris (UMR 1148)	Directeur de thèse



Mes travaux de thèse ont été réalisés au sein des laboratoires :

Sanofi-Aventis R&D

Équipe « Cardiovasculaire et Diabète »

1, avenue Pierre Brossolette

91380 Chilly-Mazarin

FRANCE

Et

Inserm U1148, *Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS)*

Équipe 1, *Cardiovascular Immunology*

Hôpital Bichat-Claude Bernard

46, rue Henri Huchard

75018 Paris

FRANCE

## REMERCIEMENTS

---

*L'exercice de rédaction de la thèse est un exercice solitaire mais la thèse en elle-même a été pour moi une véritable aventure humaine. J'ai énormément appris d'un point de vue professionnel bien sûr mais également d'un point de vue personnel. Par ces quelques lignes, je tiens donc à remercier toutes les personnes qui, par leurs connaissances, leurs compétences, leurs qualités humaines ou tout à la fois, ont contribué à l'aboutissement de mes travaux de recherche. Moi qui suis exilée en région parisienne depuis maintenant plus de 4 ans, vous avez été comme une deuxième famille pour moi et c'est avec beaucoup de tristesse et de nostalgie que je vais vous quitter.*

*Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury : le docteur **Cécile VINDIS** et le Docteur **Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA** pour avoir pris de leur temps et avoir évalué mes travaux en tant que rapporteurs, le professeur **Jean-François ARNAL** pour avoir participé à mon jury en qualité d'examineur ainsi que le professeur **Chantal BOULANGER** pour avoir accepté de présider ce jury.*

*Je tiens également à remercier **Didier LETOURNEUR**, directeur du LVTS (Inserm U1148) et **Philip JANIAK**, responsable du département « Cardiovasculaire et Diabète » de Sanofi, pour m'avoir accueillie dans vos laboratoires respectifs. Merci Philip pour tous tes précieux conseils concernant mon projet de thèse, mon article ou encore mon avenir. Chacune de nos discussions scientifiques a été grandement bénéfique, m'apportant de nouvelles pistes de travail et me permettant d'approfondir mes travaux.*

*Merci **Pina** pour m'avoir donné la possibilité d'être ingénieur d'étude à la suite de mon Master 2. Ton enthousiasme, ta folie et ton caractère m'ont permis d'acquérir de l'expérience supplémentaire, de l'autonomie et de la confiance en moi dont j'ai eu grandement besoin par la suite ! Cette année sous ta direction n'a pas été de tout repos mais j'ai beaucoup appris et grandi ! Grâce à toi, les dosages par billes n'ont plus aucun secret pour moi et je sais à présent qu'il ne faut jamais te dire quand on a prévu de faire une manip, sous peine que tu analyses toi-même les résultats dans la minute qui suit la fin de l'expérience. Ton impatience m'a montré à quel point tu étais passionnée par ce métier et je te remercie de « m'avoir laissée » effectuer cette thèse afin que je rende compte, moi aussi, que l'attente des résultats est parfois trop longue.*

*Il est évident que les deux prochaines personnes que je souhaite remercier, ce sont mes directeurs de thèse sans qui je n'aurais pas été bien loin. Diriger une thèse n'est pas une chose facile mais diriger une thèse CIFRE l'est encore moins je pense.*

*Mille mercis à mon directeur de thèse académique **Tony**. Je pense que tu te souviendras longtemps de cette matinée où tu m'as proposé d'effectuer cette thèse sous ta direction, elle était mémorable ! Quoi*

*qu'il en soit, les trois années qui ont suivi m'ont permis de te découvrir en tant que directeur de thèse mais également en tant que personne. Je tiens sincèrement à te remercier pour toute la confiance que tu m'as accordée, pour ta compréhension, ta patience ainsi que pour l'ensemble des conseils que tu as pu me prodiguer tout au long de cette thèse. Je te remercie également pour la gentillesse et la bienveillance dont tu as fait preuve à mon égard mais également pour ta disponibilité et tout le savoir que tu m'as transmis. J'ai beaucoup appris à tes côtés et ça a été un réel plaisir de réaliser cette thèse sous ta direction.*

*Merci à mon directeur de thèse industriel **Stéphane**. Avant toute chose, je veux te remercier pour la bienveillance, la gentillesse mais également la grande patience dont tu as fait preuve tout au long de ma thèse. Tu as su très rapidement me cerner, t'adapter et m'aider en me donnant les clés pour avancer, me surpasser et gagner en confiance. Ton optimisme constant, ta pédagogie et tes précieux conseils m'ont fait évoluer, relativiser et voir les choses différemment. Tu m'as beaucoup appris sur la façon dont mener un projet scientifique en m'amenant à me poser les bonnes questions, à suivre un raisonnement logique, à prioriser mes expériences et j'en passe. Je te remercie également d'avoir toujours trouvé les mots justes lorsque je manquais de motivation ou de confiance en moi et pour l'ensemble du savoir que tu as su me transmettre... Je me demande encore comment on peut stocker autant de connaissances dans un seul cerveau ! Tu es un véritable puits de science que j'admire énormément. Ton côté humain, ta sympathie, ton soutien et ton franc parler sont vraiment des qualités inestimables pour un chef. Travailler à tes côtés fut un réel plaisir que je vais grandement regretter. Tes « ouais ouais ouais ouais ouais » à la fin de chaque phrase vont me manquer. Mais ne t'inquiète pas, pour mon prochain poste, je garde en tête que les immunomarquages sur lame de verre et les western blot avec des gels tris-acétate amélioreront sans aucun doute les résultats ! Merci pour la personne que tu es, pour ton implication dans ce projet, pour tes conseils concernant mon avenir et pour tout ce que tu as pu faire pour moi jusqu'à présent. Daghe Munegu !*

*Il est temps pour moi de remercier les personnes qui furent présentes au quotidien durant ces trois années. Certaines d'entre elles resteront toujours dans ma mémoire et vont beaucoup me manquer. Bien s'entendre avec ses collègues était indispensable pour moi mais en faire de vrais amis était plutôt inattendu.*

*Je remercie **Laetitia**, qui a été pour moi un modèle et une véritable force durant cette thèse. Je tiens tout d'abord à te remercier de m'avoir accueillie dans ton équipe et d'avoir suivi l'avancée de mon projet. Tu n'en étais pas obligée mais tu as toujours été présente ! Tu m'as aidé à analyser mes résultats, à réfléchir à des hypothèses de travail, à parler le « Stéphane » et à passer mes commandes (d'ailleurs, je pense qu'on n'oubliera plus jamais les gènes de ménage dans les plaques TLDA !). Tu as*

*toujours su te rendre disponible en m'apportant toute l'aide dont j'avais besoin. Merci d'avoir participer à ces nombreuses réunions, d'avoir cru en mes idées, de m'avoir donnée confiance en moi et d'avoir toujours trouvé les mots justes pour me remonter le moral ou me donner des conseils. Si j'avais dû choisir une équipe, je n'aurais jamais pu trouver mieux que la tienne. Ta bienveillance, ton honnêteté et ta gentillesse m'ont permis de réaliser cette thèse dans un climat idéal et rien que pour ça, merci beaucoup ! Tu as été pour moi un véritable soutien et toutes nos discussions ont été réellement bénéfiques pour moi. Grâce à toi, je sais aujourd'hui vers où avancer et pour quelle raison je le fais. Mille mercis ne suffiraient pas à exprimer toute la gratitude que j'ai envers toi mais sache que cette thèse n'aurait pas été la même sans toi. Lorsqu'on part, on sait ce que l'on perd mais on ne sait pas ce que l'on gagne. Pour le coup, cette phrase prend tout son sens lorsque l'on a travaillé dans ton équipe. Je te souhaite le meilleur pour la suite, merci pour tout !*

*Merci **Grégory**, mon mini chef, pour avoir fait naître ce projet de thèse. On est arrivé ensemble à l'Inserm en Septembre 2016 (ça ne nous rajeunit pas tout ça !) et il faut dire que si je n'avais pas apprécié travailler avec toi pendant près d'un an, je n'aurais certainement pas accepté cette thèse. Tu as grandement contribué à mon envie de faire de la recherche et de résoudre cette grande énigme qu'est la température. Moi qui te voyais toujours en extase devant le moindre résultat, même lorsqu'il n'était pas significatif ! Ça m'a toujours fasciné de voir des gens comme toi, aussi passionnés par leur métier, et ça m'a donné envie de vivre la même chose. Merci pour toutes les idées et hypothèses que tu as fait naître pendant ma thèse, toutes aussi dingues les unes que les autres ! Bien évidemment, tu m'excuseras de ne pas avoir eu le temps de tout explorer ! Merci aussi pour ta gentillesse et toutes les discussions scientifiques où parfois, je l'avoue, je décrochais un peu ! Mais j'ai tellement appris malgré tout ! Ton soutien en toute circonstance, ton positivisme ainsi toutes les heures passées à discuter m'ont permis de relativiser et de prendre du recul sur beaucoup de choses. Je tiens aussi à te remercier pour tous les « à côté » de la thèse, notamment les « minutes potins » et les quelques heures de sport qu'on (10 km de Paris) ! Merci pour ta joie de vivre et pour ces 4 années ! Au-delà du bon chercheur que tu es, j'ai appris à découvrir quelqu'un de bien, avec de vraies qualités humaines et j'espère que tu les garderas, même lorsque tu seras chef !*

*Que serait mes remerciements sans mon pilier n°1, mon acolyte de toujours, mon suricate préféré (désolé pour les autres) ? Eh bien pas grand-chose. C'est pourquoi, avec beaucoup d'émotions, je tiens à remercier **Mr LEGER** alias **Bertrand** ! Quelle entrée en matière me diras-tu mais il fallait bien que je fasse ça pour toi. Tu as été LA personne qui m'a supporté le plus durant toute cette thèse, et beaucoup pourront en témoigner. Il est temps pour moi de me faire pardonner par un beau et long paragraphe*

*juste pour toi, comme je te l'avais promis ! Je ne sais même pas par où commencer tellement il y a à dire. Tu as débarqué de nulle part, en me montrant comment cultiver les cellules en flux et tu es devenu, en peu de temps, mon pilier n°1 dans cette folle aventure qu'est la thèse. Et ce n'est pas rien de le dire ! Au-delà du fait que tu ais dû supporter mes monologues pendant des heures, mes plaintes, mes fous rires, mes « minutes on s'en fout » (un peu longues parfois je l'avoue) et mes allées-venues dans ton bureau 50 fois par jour, je tiens sincèrement à te remercier pour tout ce que tu as pu m'apporter durant cette thèse. Tu as été un peu mon grand frère et mon confident en même temps. Niveau scientifique (parce qu'il faut quand même en parler !), merci de toujours avoir répondu présent pour un changement de milieu de dernière minute, pour la trypsination de mes cellules ou pour des manip de flux. Grâce à l'expert en culture cellulaire que tu es, je savais que mes cellules seraient heureuses et bien traitées à tes côtés. Il faut dire que tu as toujours su leur parler ! Merci aussi d'avoir été mon secrétaire (et parfois même mon stagiaire !) pendant 3 ans en acceptant, sans jamais te plaindre, de passer toutes mes commandes, d'effectuer mes demandes informatiques et de me prêter ton ordinateur pour l'analyse de mes résultats. Tu savais Ô combien ils étaient importants à mes yeux. Merci également d'avoir pris de ton temps pour relire ce Saint Graal et corriger les quelques fautes d'orthographe que les chefs ont dissimulés ! Sur le plan personnel maintenant (parce que c'est quand même ça qui nous intéresse !), je te remercie pour ton soutien infailible ! Notamment au labo en évitant que les pompes en flux ne passent par la fenêtre, après la soirée Escape Game où tu as dû jouer le rôle de psy pour Jérémy et moi, à Cuba où tu m'as redonné le sourire plus d'une fois malgré ce voyage rocambolesque (Tu voulais des anecdotes, tu as été servi !), pendant le confinement où tu as fait perdurer nos pauses café (Vive Skype !), pendant l'écriture de ma thèse et j'en passe... Chose importante aussi, merci d'avoir toujours (ou presque !) compris ce que je voulais dire, même quand je ne faisais aucun effort de langage. Tu connais par cœur le dictionnaire « Julie » et tu sais à quel point ça va être compliqué pour moi de faire à nouveau des efforts pour me faire comprendre ! Merci d'avoir été mon binôme pendant 30 secondes lors de mon tout premier semi-marathon (et dernier d'ailleurs !), merci pour tous ces fous rires qui m'ont permis de muscler mes abdos (tu sais à quel point j'en ai besoin !) et de gagner 30 ans de vie ! Ils vont être utiles vu le retard que j'ai pris sur ton plan's life ! Je me souviendrais longtemps de ta sortie du bain de glace, des escapes game où tu as failli t'étaler en plein milieu de la pièce, de cet aller-retour express à Paris pour finir à la pizzeria de Chilly, de cette soirée volley où tu as pu me montrer toutes tes compétences sportives de haut niveau (moi aussi d'ailleurs !) ! Merci aussi pour tous ces points MARS que j'attendais avec impatience chaque mois (et pour mon cutter que j'attends toujours d'ailleurs !). Merci d'avoir été mon « Monsieur Météo » et mon « trafic info » tous les soirs en partant du labo et pour toutes ces pauses de « 5 minutes, pas plus » qui vont vraiment me manquer. Enfin, je te remercie pour ta bonne humeur constante, ta gentillesse, ta joie de vivre et ton humour sans faille ! Tu as été pour moi un véritable pilier (oui, je sais, je radote mais c'est l'âge !) et tu es devenu, aujourd'hui, un*



*véritable ami. Je suis désolée, je dois m'arrêter là parce qu'il y a d'autres gens à remercier et je ne voudrais pas faire trop de jaloux mais quoi qu'il en soit, je souhaite à tout le monde de rencontrer un suricate comme toi au cours de sa thèse, merci pour tout !*

*Je tiens également à adresser mes remerciements à **Guillaume**, mon pilier côté Inserm (comme ça, pas de jaloux !). Je tiens tout d'abord à te remercier pour tout ce que tu m'as appris niveau manips pendant cette année en tant qu'ingénieur d'étude car ça m'a permis de commencer ma thèse dans les meilleures conditions possibles, avec un panel de techniques très variées. Je me souviendrai longtemps de ma première semaine à l'Inserm où on a dû faire une nocturne avec Lélé et plus de 60 lames à marquer. Quelle galère mais quel plaisir également d'avoir découvert la personne que tu étais ce soir-là ! Énergique, drôle, volontaire et bienveillant, tu es rapidement devenu mon repère et surtout une grande source de motivation au cours de ces 4 années ! Merci pour ton aide en toute circonstance et sans jamais te plaindre. Merci pour ta patience, ta joie de vivre, ton optimisme, ton naturel et ta simplicité qui ont grandement contribué à la bonne ambiance du labo. Il y a tant de moments qui resteront gravés et que je n'oublierai jamais : tous ces ménages et ces génotypages en musique, ces fous rires incontrôlables toutes les semaines permettant la musculation active de mes zygomatiques, les pauses café sur le toit, les heures de discussions philosophiques (ou pas d'ailleurs !), les soirées où ta folie était toujours présente, les escapes game réservés pour 16 alors qu'on était 12 et j'en passe. Merci d'avoir été là dans les bons moments comme dans les moins bons. Merci d'avoir supporté cette énergie que j'ai du mal à contrôler, d'avoir écouté mes « minutes on s'en fout » pendant des heures entières et d'avoir rigolé à mes blagues pas drôles. Merci d'avoir été mon confident et mon ami. Tu es une personne en or avec de vraies valeurs et j'ai beaucoup appris à tes côtés. Reste comme tu es, je te souhaite le meilleur ! Je t'aime fort mon Guigui d'amour !*

*Merci également à **Jérémy** ou Titoune pour les intimes. Tu as été mon coloc de bureau pendant 1 an et demi et quelle année ! Merci pour tes blagues salasses qui, je dois l'admettre, m'auront quand même bien fait rire tout au long de ma thèse. Merci pour tous ces compliments dont tu ne t'es jamais lassé de me faire au quotidien. Merci pour toutes ces « minutes infos » qui m'ont été très utiles et qui m'ont permis d'acquérir beaucoup de connaissances, tant au niveau de la science que de l'agriculture, en passant par les résumés de l'amour est dans le pré ! Merci pour tes coaching « question/réponses » lors de mes présentations. Merci d'avoir amélioré la vue que j'avais depuis mon bureau, notamment en ajoutant des photos de tracteur et de filles en maillot, c'était un plaisir de les voir chaque matin ! Merci pour cette journée Mudday où râler après les bobos parisiens qui couraient dans la boue m'a déclenché un nombre incalculable de fous rires. Merci aussi à ton caractère de cochon qui m'a valu quelques journées très silencieuses dans le bureau et où j'ai ENFIN pu me concentrer... Que c'était agréable ! Merci de m'avoir fait confiance en tant que coach sportive, même si malheureusement, tu as*

*abandonné lâchement la course du jour au lendemain ! Sache que ce n'est pas comme ça que tu auras un corps d'Apollon ! Merci aussi d'avoir proposé à plusieurs reprises qu'on aille voir « Au nom de la Terre » ensemble mais sache que je suis très déçue que tu n'aies jamais tenu ta promesse... Malgré tout, merci d'avoir toujours répondu présent quand j'en avais besoin ! Tu feras toujours parti de la Team Suri, je t'aime mon petit Jérémouille !*

*Merci à **Morane**, ma Momo d'amour, qui est le 4e suricate de la bande et ma deuxième coloc de bureau ! Merci d'avoir supporté mon dynamisme (et celui de Jérémie) au quotidien, merci pour les « minutes gossip ». Merci pour tous ces fous rires et ces discussions à n'en plus finir, merci d'avoir imposé le silence dans le bureau juste par ta présence (Je ne comprends toujours pas pourquoi ça n'a jamais fonctionné avec moi !). Merci aussi pour tous tes conseils et pour ces moments partagés hors du labo (escape game, 10 km de Paris, mudday, restau, etc). Je te souhaite vraiment le meilleur pour la suite et pour ton projet !*

*Je tiens maintenant à remercier mes deux acolytes **Kévin** et **Dévy** !*

*Ah, mon **Kévinou** ! C'est vrai que lorsque je t'ai vu pour la première fois, je me suis demandé d'où sortait ce spécimen rare à la chevelure intense et à la barbe approximative qui se prenait pour le fils de Mozart avec ses « La, Do, Mi, Ré, Fa dieze » ! Néanmoins, en deux-trois échanges, je me suis rapidement rendu compte que tu étais véritablement quelqu'un de bien. Tu as été un véritable soutien pour moi durant ces 4 années. Merci pour nos conversations pendant des heures à refaire le monde, merci pour ton humour, parfois un peu beauf, mais que j'aime tant ! Merci pour avoir été l'épaule sur laquelle j'ai le plus pleuré (enfin je crois) et merci pour toute ta bienveillance. Bien évidemment, je me dois de rajouter quelques lignes afin de te remercier pour cette formation word express pendant la mise en page de cette Bible ! Ça m'a bien aidé ! 😊. Ah mon **Dévinou** ! Merci pour ton franc parler, ton humour, ton sens de l'autodérision et toutes ces heures passées à discuter ! Merci pour cette longue escapade chez Ikéa, merci ces visios et ton talent de DJ qui ont améliorés mon quotidien pendant le confinement. Merci pour ton soutien, surtout pendant ma première année de thèse. Merci pour ta bienveillance, tes conseils et nos conversations interminables à refaire le monde. Et merci **Réda**.*

*Je voulais également remercier mon Papa de Paris : **Jean-Christophe** alias **JC** qui est remonté inextrémiste dans mon TOP 5 Sanofi grâce aux dernières semaines ! Merci pour ton aide, notamment dans les moments de rush où tu as toujours été super efficace pour trouver la solution à mes problèmes (je pense notamment au plasmide GFP) ! Merci d'avoir passé mes commandes quand Mr LEGER n'était pas là ! Merci d'avoir été un véritable père pour moi en me remontant le moral devant des résultats négatifs, en prenant plusieurs heures de ton temps pour m'expliquer comment fonctionne les expériences de transfection, en faisant le clown à la moindre occasion ! Ta joie de vivre et ton rire*

*ont été vraiment communicatif et m'ont permis de relativiser de nombreuses choses ! Merci aussi de m'avoir fait prendre conscience de ce qui est vraiment important et ce qui ne l'es pas. Merci pour tous tes appels téléphoniques et ta magnifique voix qui m'ont bercé quotidiennement depuis mon bureau, même la porte fermée ! Et surtout, merci d'avoir soutenu Jérémy dans toutes ses conneries, on voit que tu préfères entre tes deux enfants !*

*Merci à **Mr Gaubert** qui est sans doute mon coup de cœur de cette thèse. Tu as été si bienveillant avec moi, toujours prêt à m'aider en cherchant des protocoles archivés des années 1950 mais qui m'ont sauvé la mise plus d'une fois. Merci d'avoir été la cause de 75% de mes fous-rires. Merci pour ta gentillesse et pour tous ces repas passés à tes côtés, je sais à quel point ils t'ont fait plaisir ! Merci pour tous ces points MARS que j'attendais avec impatience tellement ils m'ont fait rire ! Et bien évidemment, merci aussi pour toutes ces conversations que je n'avais pas commencées mais que tu as fini ! Enfin, tu vois ce que je veux dire ?*

*Merci à **Mr Lo-Presti**, pour m'avoir initié et expliqué à de longues reprises tous les secrets de la biologie moléculaire et de la génétique. Je te remercie pour ton hygiène alimentaire qui a été un véritable modèle pour moi. D'ailleurs, promets-moi de faire une exception à cette alimentation équilibrée et de prendre un moelleux au chocolat à chaque fois qu'il y sera, en hommage au dernier que je n'ai pas pu savourer ! Enfin, merci pour ton optimisme et ta joie de vivre qui resteront toujours inversement proportionnel à ta bonne humeur !*

*Je tiens à remercier **Michel**, pour ta bienveillance, ton sens de l'autodérision et ta gentillesse. Merci également pour tes punchlines et pour m'avoir fait découvrir **Miqueline**, personnage emblématique de ma thèse et source de nombreuses crises de rire au cours de ces 3 années ! D'ailleurs, merci à elle pour son grain de peau parfait, sa beauté bien au-dessus de la moyenne, ses enfants et... ses enfants ! Merci **Aurélien**, pour ton aide concernant les immunomarquages ainsi que pour toutes ces discussions quotidiennes et ces pauses improvisées ! Merci **Stéphane** (Leclair) pour ton aide et ta formation concernant les western blot ! Merci aussi pour ton rire communicatif et ta bienveillance ! Merci aux **Philippe** (Peron et Pringent), à **Xavier**, à **Georges** et à **Didier** pour ces repas animés, drôles et qui me permettaient de réellement faire une pause pendant la journée. Merci pour votre bonne humeur, votre culture cinématographique, vos discussions et votre humour ! Ça a été un réel plaisir d'effectuer ma thèse avec vous.*

*Merci **Cécile**, de m'avoir supporté plus de 50 fois par jour dans ton bureau. Merci pour ta patience, ta gentillesse, ta bienveillance et ton franc-parler. Merci pour tous ces fous-rires ainsi que tous tes conseils. J'espère que mon départ n'affectera pas trop vos journées avec Mr Léger 😊*

Merci **Fatima**, d'avoir également supporter mes aller-retours dans ton bureau. Merci pour tes conseils, toutes ces discussions, ton soutien (même pendant le confinement !) ainsi que ton aide pour les expériences pharmaco ! J'en profite, par la même occasion, pour remercier **Alain**, pour ta bienveillance, ta gentillesse et pour avoir tout de suite été partant pour ces expériences.

Merci **Patrick** pour ta grande passion pour la recherche et pour ton amour pour l'Xcelligence. Tu noteras que j'ai quand même essayé de vérifier l'effet de la température sur cet appareil pour te faire plaisir !! Malheureusement, cela n'a rien donné mais je garde en tête la question du calcium !

Merci **Karima** pour ton aide précieuse, notamment lors du déménagement du service cardio ! Merci pour ton accueil en salle de culture, pour l'incubateur 40°C, pour m'avoir permis de terminer mes manip dans de très bonnes conditions et pour ta gentillesse ! Merci également à **Laurence, Alice, Stéphanie, Marie-Claire** et **Véronique** pour leur bonne humeur quotidienne et leur soutien.

Merci **Maria-Francesca** pour nos « minutes potins » et tous tes conseils qui m'ont grandement servi ! Je te souhaite le meilleur pour la suite ! Thomas a bien de la chance d'avoir une maman comme toi ! Garde ta joie de vivre et ta gentillesse qui font de toi la personne formidable que tu es !

Merci **Cyril** pour ton rire communicatif, pour ta bonne humeur et ta disponibilité. Tu es LE roi de l'informatique et je ne te remercierai jamais assez pour toutes ces galères dont tu m'as sortie !

Merci à **Florence, Corinne, Galina, Sandrine, Hamida, Michel** et **Gilbert** de m'avoir aidé à réaliser les expériences et analyses de microarray, les maxiprep et les dernières expériences de TLDA pendant le confinement. Votre aide m'a réellement été précieuse !

Merci également aux adorables stagiaires, **Fariza, N'diaye, Fanny, Céline** et **Léa** qui m'ont beaucoup fait rire pendant 6 mois et avec qui j'ai partagé de réels bon moments ! Merci aussi à **Casquette** de m'avoir montré toutes les combines possibles et inimaginables pour ne pas venir travailler le matin !

Merci à tous les anciens de l'Inserm, notamment **Charlotte** et **Francesco**, qui m'ont initié à cette folle aventure qu'est la thèse, **Varouna** pour nos « minutes potins », **Alexia** pour nos discussions interminables (scientifique ou pas) sur le toit et tous tes conseils qui m'ont été très utiles, **Lélé**, pour tous ces bons moments partagés lors de ma première année à l'Inserm, **Neila**, pour tous ces fous-rires de stents, de culture cell et de sport et **Alice**, sans qui je n'aurais pas pu réaliser cette thèse.

Merci à **Tatie Sandy** pour ta franchise, ton humour et ton accent chantant (oui, il s'entend encore quand tu t'énerves !). Merci d'avoir supporté ma folie, mes minutes on s'en fout ainsi que tous ces fous-rires (et ces pleures pour évacuer le trop plein de pression !) au quotidien !

Merci à **Marie** pour t'être entrainer tant de fois à pleurer pour ma soutenance de thèse ! Ca y est, la fin approche et tu vas enfin pouvoir mettre à exécution ces 4 années d'entraînement !

Merci à **Anh** pour tous tes conseils voyages et merci à **Jamila** pour m'avoir montré « Li cillules » et pour toutes tes questions pertinentes pendant mes oraux.

Merci à **Véronique** pour toute ta gentillesse, ta formation à la culture en flux ainsi que toute ta bienveillance ! Merci à **Christine** et à **Liliane** pour votre aide lors de mes différentes galères, notamment administratives.

Merci au **pâtissier de chez Sanofi** qui m'a grandement aidé à maintenir ma ligne durant ces trois années. Merci surtout pour ses moelleux au chocolat si réconfortants les jours de stress (mais pas que !) et qui m'ont permis de passer certains « cap » sur la balance. Thank you **Mehdi** pour tous mes problèmes informatiques que tu as su réparer en un rien de temps ! Merci à **Kévin** sans qui nous n'aurions pas pu sortir le bouchon d'éthanol qui bloquait l'aspiration de la hotte.

Merci à Blablacar, la SNCF, les compagnies de vol et de voyage ainsi que le garagiste sans qui je n'aurais pas pu raconter autant de « minutes on s'en fout » pendant ma thèse.

Merci à **Dame Edith** et à **Florence** pour avoir continué à être présentes, même après mon stage ! Vous êtes mes deux commères préférées et je vous aime trop ! Merci également à **Sébastien** et à la **team foot** pour m'avoir permis de souffler quelque fois autour d'un ballon !

Merci à **Graziella**, ma copine à toute épreuve ! Tout d'abord merci pour ton aide sans faille (déménagement, fourrière, garagiste, aéroport, blablacar, serrurier et j'en passe) ! Merci de toujours avoir été présente depuis maintenant plus de 6 ans ! Merci pour ta franchise, pour ta gentillesse, pour toutes ces activités, ces marches interminables, ces restaurants et ces soirées sans lesquelles Paris n'aurait jamais eu la même saveur. Merci aussi de t'être adapté à mon organisation de dernière minute et pour toutes ces discussions à n'en plus finir ! Merci d'avoir pris le temps de relire assidument mon Saint Graal afin d'y corriger les fautes ! Je sais à quel point tu t'es appliquée pour le faire et je t'en remercie du fond du cœur ! Je suis fière aujourd'hui de te compter parmi mes amies et je souhaite à tout le monde de trouver une amie comme toi ! Je t'aime.

Merci à **Jérôme**, mon ami fantôme mais véritable ami tout de même ! Il est vrai qu'on ne peut pas dire que tu sois très assidu pour répondre au téléphone mais malgré tout, je veux te remercier pour tous ces moments géniaux ! Merci pour ta bonne humeur, ton sourire, ton aide, tes conseils, ton franc-parler, ton humour et j'en passe. Je te souhaite tout le bonheur du monde !

*Merci à **Aurélie** et **Aurélia**, mes copines de Paris sans qui ces trois années n'auraient pas été les mêmes !  
Merci à **Aurélie** pour ta patience à toute épreuve quand je dois prendre une décision. Merci aussi pour ton franc-parler, ton humour, ta folie et ta joie de vivre qui ont été pour moi un véritable moteur pendant cette thèse. Merci à **Aurélia** pour tous ces fous-rires à n'en plus finir, pour toutes ces soirées partagées. Merci aussi pour tous ces moments de partage, pour ta discrétion à toute épreuve et pour tous tes conseils ! Je vous aime fort les filles !*

*Enfin, je tiens à remercier ma famille. Tout d'abord **Olga** et **Gilles** qui ont toujours été présents pour moi et qui, depuis petite, me motivent à faire des études et à aller au bout de moi-même. Ensuite, je voulais remercier **Charly** et **Coraline**, mon frère et ma sœur, qui comptent plus que tout au monde pour moi et qui ont été un véritable moteur tout au long de ma vie afin que je leur donne le bon exemple. Merci à mon chat **Monky** (oui oui, je remercie mon chat et alors ?) qui partage ma vie depuis maintenant 7 ans, qui supporte mes excès de folie quotidien et à qui j'ai déjà fait vivre 10 déménagements à cause des études... Pau, Angers, Poitiers, Paris... Plus aucune ville n'a de secret pour lui ! Enfin, merci à mon papa, **Louis**, sans qui je n'aurais pas fait le quart de ce que j'ai fait dans ma vie. Merci pour ton soutien quotidien, pour m'avoir écouté et conseillé pendant des heures, merci pour la folie et les valeurs que tu m'as transmises. Aujourd'hui, je suis fière d'être celle que je suis et c'est grâce à toi. Je t'aime papa.*

# SOMMAIRE

---

REMERCIEMENTS.....	
SOMMAIRE .....	
RÉSUMÉ.....	
ABSTRACT.....	
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	
LISTE DES FIGURES .....	
LISTE DES TABLEAUX.....	
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
I. La température.....	1
I.1. L'endothermie, une stratégie évolutive avantageuse.....	2
I.2. Les transferts thermiques passifs.....	3
I.2.1. La conduction .....	4
I.2.2. La convection.....	4
I.2.3. Le rayonnement .....	4
I.2.4. L'évaporation.....	5
I.3. Variations thermiques et thermorégulation à l'échelle de l'organisme .....	5
I.3.1. Bilan thermique, rhéostat de la thermorégulation .....	5
I.3.2. Variations physiologiques et pathologiques de la température .....	7
I.3.2.1. Hypothermie et hyperthermie .....	7
I.3.2.2. Hétérogénéité thermique entre différents organes .....	7
I.3.2.3. Élévations pathologiques de la température .....	9
I.3.2.4. Le système sanguin, un élément central de la thermorégulation systémique .....	10
I.4. Variations thermiques et thermorégulation à l'échelle cellulaire .....	13
I.4.1. TRP et détection des variations thermiques .....	13
I.4.2. Les mécanismes adaptatifs : protéines chaperonnes et activités enzymatiques .....	14
II. Le système sanguin.....	15
II.1. Structure de la paroi artérielle .....	15
II.2. Importance de l'endothélium dans l'homéostasie vasculaire .....	16
II.2.1. Fonctions principales de l'endothélium .....	16
II.2.1.1. Barrière semi-perméable .....	17
II.2.1.2. Contrôle du tonus vasculaire.....	19
II.2.1.3. Contrôle de la réponse inflammatoire .....	21
II.2.2. Forces de cisaillement .....	21

II.2.2.1. Impact des modifications des forces de cisaillement sur la fonction endothéliale .....	24
II.2.2.2. Hétérogénéité thermique liée à la morphologie du vaisseau .....	25
II.2.3. Cellules endothéliales et température .....	27
<b>OBJECTIFS.....</b>	<b>28</b>
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>29</b>
I. Culture cellulaire .....	29
I.1. Caractéristiques des cellules .....	29
I.1.1. Les HCAEC.....	29
I.1.2. Les Telo-HAEC.....	30
I.1.3. Les THP-1 DsRed .....	30
I.2. Conditions de culture cellulaire.....	30
I.3. Conditions d'amplification cellulaire.....	31
I.4. La culture cellulaire en condition de flux .....	32
I.4.1. Le système de pompe Ibidi® .....	32
I.4.1.1. La pompe .....	33
I.4.1.2. L'unité fluidique.....	34
I.4.1.3. <i>Perfusion set</i> et <i>μ-slide</i> .....	36
I.4.1.4. L'ordinateur et le logiciel de flux.....	37
I.4.1.5. Le flacon de séchage .....	38
I.4.2. Les grandes étapes de la culture en flux .....	38
I.4.2.1. Ensemencement des cellules .....	38
I.4.2.2. Mise en flux .....	39
I.4.2.3. Traitement et devenir des cellules .....	39
II. Étude de l'expression génique .....	40
II.1. Étude transcriptomique par <i>microarray</i> .....	40
II.1.1. Principe général.....	40
II.1.2. Extraction et dosage des ARN .....	40
II.1.3. Synthèse d'ADN complémentaires (ADNc) .....	41
II.1.4. Transcription et marquage des ARN complémentaires .....	42
II.1.5. Purification et quantification des ARN amplifiés.....	42
II.1.6. Hybridation.....	43
II.1.7. Analyse des résultats de <i>microarray</i> .....	43
II.2. Étude de l'expression des ARN messagers (ARNm) par RT-QPCR.....	45
II.2.1. Extraction des ARNm .....	45
II.2.1.1. À partir de cellules cultivées en condition statique .....	45



II.2.1.2.	À partir de cellules cultivées en condition de flux .....	46
II.2.1.3.	À partir d'échantillons <i>in vivo</i> .....	46
II.2.2.	Transcription inverse .....	47
II.2.3.	PCR quantitative en temps réel.....	47
II.3.	Étude de l'expression des ARNm par TLDA .....	50
III.	Mesure de l'expression protéique .....	51
III.1.	Le Western Blot .....	51
III.1.1.	Préparation des lysats .....	51
III.1.2.	Dosage des protéines .....	52
III.1.3.	Migration .....	53
III.1.4.	Transfert sur membrane .....	53
III.1.5.	Immuno-détection.....	53
III.1.6.	Révélation.....	54
III.1.7.	Liste des anticorps utilisés en western blot .....	54
III.2.	L'immunomarquage cellulaire.....	56
III.2.1.	Fixation et perméabilisation.....	56
III.2.2.	Marquage .....	56
III.2.3.	Acquisition des images .....	57
III.2.4.	Liste des anticorps utilisés en immunomarquage .....	57
III.3.	L'immunohistochimie.....	58
III.3.1.	Prélèvement et coupe du tissu.....	58
III.3.2.	Fixation et immunomarquage .....	58
III.3.3.	Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie.....	59
IV.	Transfection.....	59
IV.1.	Principe de la transfection.....	59
IV.2.	Conditions expérimentales.....	60
IV.3.	Analyse des résultats de transfection .....	60
IV.4.	Plasmides utilisés.....	61
V.	Adhérence des monocytes .....	62
VI.	Transmigration .....	62
VI.1.	Passage de dextran-FITC à travers la monocouche d'HCAEC.....	62
VI.2.	Passage des THP-1 DsRed à travers la monocouche endothéliale.....	63
VII.	Test de prolifération.....	64
VIII.	Mesure de la température par différentes méthodes .....	64
VIII.1.	Mesure <i>ex vivo</i> de la température par caméra thermique infrarouge .....	64
VIII.2.	Mesure de la température par IRM .....	65

VIII.3.	Utilisation d'une sonde thermique.....	66
VIII.3.1.	Structure de la sonde .....	66
VIII.3.2.	Traitement des cellules .....	66
VIII.3.3.	Lecture de fluorescence .....	67
IX.	Organes isolés.....	68
IX.1.	Prélèvement des artères iliaques et montage .....	68
IX.2.	Protocole de réactivité vasculaire et sélection des vaisseaux.....	68
IX.3.	Conditions expérimentales.....	69
X.	Analyses statistiques .....	69
	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>70</b>
I.	Réponse thermique des cellules endothéliales.....	70
I.1.	Voies de signalisation modulées en réponse à une augmentation de la température ....	70
I.1.1.	Analyse de l'expression génique par microarray .....	70
I.1.2.	Identification des voies de signalisation.....	76
I.1.3.	Mise en évidence de régulateurs géniques.....	78
I.1.4.	Confirmation des gènes régulés par la température à 6h.....	80
I.1.4.1.	Validation globale des résultats de <i>microarrays</i> .....	80
I.1.4.2.	Détermination d'un panel génique de référence et validation en condition statique .....	81
I.1.4.3.	Validation du panel de référence en condition de flux laminaire.....	83
I.1.4.4.	Validation de l'expression protéique des HSP .....	87
I.2.	Étude des voies de signalisation mises en place par les cellules endothéliales.....	89
I.2.1.	Implication du régulateur HSF1.....	89
I.2.1.1.	Étude de la phosphorylation de HSF1 .....	89
I.2.1.2.	Étude de l'activité protéique de HSF1.....	90
I.2.1.3.	Étude de la translocation nucléaire de HSF1.....	92
I.2.1.4.	Modulation des gènes régulés par HSF1 .....	94
I.2.2.	Implication de la voie de signalisation mTORC1 et étude de son lien avec HSF1 .....	96
I.2.2.1.	Étude de la phosphorylation de la protéine p70-S6K .....	96
I.2.2.2.	Inhibition de la voie mTORC1.....	97
I.2.2.2.1.	Effet de la rapamycine sur la phosphorylation de la protéine p70-S6K.....	97
I.2.2.2.2.	Effet de la rapamycine sur l'expression génique .....	98
I.2.2.2.3.	Effet de la rapamycine sur la phosphorylation de la protéine HSF1 .....	100
I.2.3.	Implication de la voie de signalisation UPR.....	101
I.2.3.1.	Étude de l'activité ribonucléasique de ERN1 .....	101
I.2.3.2.	Corrélation avec le niveau protéique de la protéine XBP1 .....	103

I.2.3.3.	Modulation des gènes régulés par ERN1 .....	105
I.2.3.4.	Effet de l'inhibiteur B-I09 .....	106
I.2.3.5.	Étude de la phosphorylation de ERN1.....	109
I.2.4.	Blocage des deux voies de signalisation.....	111
II.	Étude de l'intégrité de l'endothélium en réponse à la température .....	112
II.1.	Étude de la perméabilité endothéliale .....	112
II.1.1.	Étude de l'expression de la VE-cadhérine .....	112
II.1.2.	Étude du passage de macromolécules à travers la monocouche endothéliale .....	113
II.2.	Étude de la diapédèse monocytaire .....	114
II.2.1.	Étude de l'adhérence monocytaire .....	115
II.2.2.	Étude de la transmigration des monocytes à travers l'endothélium .....	116
II.3.	Implication de la voie de signalisation eNOS .....	117
III.	Mesures thermiques en conditions physiopathologiques .....	122
III.1.	Mesure de la température <i>ex vivo</i> dans différents modèles .....	122
III.1.1.	Le modèle Cellix® .....	122
III.1.2.	Le modèle de bifurcation imprimée en 3D.....	123
III.2.	Mesure de la température <i>in vitro</i> .....	125
III.2.1.	Validation de la sonde en condition statique.....	126
III.2.2.	Validation de la sonde en condition de flux .....	127
III.2.3.	Expression protéique au sein des bifurcations.....	128
III.3.	Mesure de la température <i>in vivo</i> .....	129
III.4.	Perception de la température par les HCAEC .....	132
IV.	Conclusion des résultats.....	135
	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>136</b>
I.	L'augmentation de température active plusieurs voies de signalisation dans les cellules endothéliales coronaires.....	136
I.1.	HSF1 et mTORC1 : deux voies de signalisation activées à 40°C et intimement liées.....	136
I.2.	La température déclenche une réponse UPR atypique .....	139
I.3.	Le flux amplifie l'effet de la température.....	143
I.4.	eNOS : une autre voie modulée par la température ? .....	144
I.5.	Température et phénomène d'hormèse.....	145
II.	Limitations .....	147
II.1.	Conditions de culture .....	147
II.2.	Mesure de la température à l'échelle tissulaire et cellulaire.....	148
II.3.	HSP et CIRBP utilisés comme alternatives aux sondes thermiques .....	149
III.	Perspectives.....	150

III.1. Modifications épigénétiques des HCAEC .....	150
III.2. Spécificité de la réponse thermique des cellules endothéliales .....	152
III.3. Perception de la température par les cellules endothéliales.....	153
IV. Conclusion générale .....	154
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>155</b>
<b>ANNEXE I.....</b>	<b>168</b>
<b>ANNEXE II.....</b>	<b>175</b>
<b>ANNEXE III.....</b>	<b>190</b>

## RÉSUMÉ

---

**Titre** : Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'adaptation des cellules endothéliales à la température.

**Mots-clefs** : Hyperthermie, endothélium, voies de signalisation

**Résumé** :

Une des fonctions majeures du système vasculaire est la régulation de la distribution de chaleur à travers l'organisme grâce aux mécanismes de vasodilatation (dissipation de chaleur) et de vasoconstriction (préservation de la chaleur). Par conséquent, la température du sang n'est pas uniforme en tout point de la circulation sanguine. Elle peut aussi augmenter lorsque la fièvre est déclenchée à l'échelle de l'organisme ou lorsqu'une thermogenèse locale accompagne une réponse inflammatoire. Ainsi, que ce soit en condition physiologique ou pathologique, la température du sang peut varier de plusieurs degrés. Les cellules endothéliales, constamment soumises au flux sanguin et situées à l'interface entre la paroi vasculaire et le sang, font partie des premières cellules à percevoir ces variations de température. Néanmoins, aucune étude ne s'est encore intéressée aux mécanismes d'adaptation mis en place par ces cellules en réponse à une hyperthermie modérée.

L'objectif de mon travail de thèse a été de déterminer l'impact d'une augmentation de température (40°C versus 37°C) sur la fonction endothéliale, en identifiant et en étudiant les différentes voies de signalisation mises en jeu au sein de cellules endothéliales primaires vasculaires (HCAEC).

Dans un premier temps, nous avons montré qu'en cas d'hyperthermie modérée, les cellules endothéliales entraînent l'activation de deux voies de signalisation cytosoliques (HSF1 et mTORC1) et d'une voie de signalisation spécifique du réticulum endoplasmique (UPR). Ces différentes voies entraînent la modulation de l'expression de nombreux gènes. Ces variations géniques ont été observés en condition de culture statique mais également en condition de culture en flux, où elles sont amplifiées. Dans un second temps, nous avons démontré que d'autres fonctions endothéliales, telles que le maintien de la perméabilité, pouvaient être altérées par la température. Enfin, dans un dernier temps, nous avons tenté de montrer que l'élévation de la température pouvait être en relation avec la variation des forces de cisaillement et l'acquisition de propriétés biologiques par l'endothélium.

L'ensemble de ces travaux de thèse a donc permis de mettre en évidence que la biologie de l'endothélium est profondément impactée par une augmentation de la température. Une telle augmentation peut être observée lors d'épisodes fébriles et/ou inflammatoires, ouvrant de nouvelles perspectives sur le rôle de la température dans les pathologies vasculaires.

## ABSTRACT

---

**Title** : Cellular and molecular mechanisms involved in the adaptation of endothelial cells to temperature.

**Keywords** : Hyperthermia, endothelium, signaling pathways

**Abstract** :

One of the crucial functions of the vascular system is the regulation of heat distribution throughout the body through vasodilation (heat dissipation) and vasoconstriction (heat preservation). Therefore, blood temperature is not uniform throughout the blood stream. It is also increased with fever or when local thermogenesis accompanies an inflammatory response. Thus, either in physiological condition or in pathological condition, blood temperature can vary by several degrees. Endothelial cells, constantly subjected to blood flow and located at the interface between the vessel wall and the blood, are among the first cells to sense these changes in temperature. However, no study has yet investigated the adaptation mechanisms developed by endothelial cells in response to moderate hyperthermia.

The purpose of my work was to determine the impact of an increase in temperature (40°C versus 37°C) on endothelial function, by identifying and studying the different signaling pathways involved within vascular primary endothelial cells (HCAECs).

First, we showed that under moderate hyperthermia, endothelial cells trigger the activation of two cytosolic signaling pathways (HSF1 and mTORC1) and one specific-endoplasmic-reticulum signaling pathway (UPR). These different pathways lead to the modulation of the expression of many genes. These gene variations were observed under static conditions and are amplified under flow conditions. Secondly, we demonstrated that other endothelial functions, such as permeability maintenance, could be altered by temperature. Finally, we tried to show that the increase in temperature could be related to the variation of shear stress and to the acquisition of biological properties by the endothelium.

Altogether, this work demonstrates that the biology of the endothelium is deeply impacted by an increased temperature that could be observed during febrile and/or inflammatory episodes, opening the door to new perspectives on the role of temperature in vascular pathologies.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

- 3D** : Trois Dimensions
- ADMA** : *Asymmetric Dimethylarginine*
- ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- ADNc** : Acide Désoxyribonucléique complémentaire
- AHSA1** : *Activator of HSP90 ATPase Activity 1*
- Akt** : *protein kinase B*
- ANOVA** : *Analysis Of Variance*
- ARN** : Acide Ribonucléique
- ARN 18S** : ARN ribosomique 18S
- ARNm** : Acide Ribonucléique messenger
- ATF6** : *Activating Transcription Factor 6*
- ATF6 RE** : *Activating Transcription Factor 6 Response Element*
- ATG** : *Autophagy related genes*
- ATP** : Adénosine Triphosphate
- BAD** : *Bcl-2 Associated Agonist of Cell Death*
- BCA** : *Bicinchoninic Acid*
- BDKRB2** : *Bradykinin Receptor B2*
- BiP** : *Binding-Immunoglobulin Protein*
- BODIPY** : Bore-Dipyrométhène
- BSA** : *Bovine Serum Albumin*
- Ca<sup>2+</sup>** : Ion calcium
- CaCl<sub>2</sub>** : Chlorure de calcium
- CACYBP** : *Calcyclin-Binding Protein*
- CCL2** : *Chemokine (C-C motif) Ligand 2*
- CD31** : *Cluster of Differentiation 31*
- CDC** : *Cell Division Cycle*
- cDNA** : *complementary Deoxyribonucleic Acid*
- CH<sub>2</sub>** : groupement méthylène

**CIRBP** : *Cold-Inducible RNA-Binding Protein*

**CML** : Cellule Musculaire Lisse

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**CORO1A** : *Coronin 1A*

**CREB** : *cAMP Response Element-Binding protein*

**Ct** : *Cycle Threshold*

**CTP** : Cytidine Triphosphate

**Cu<sup>+</sup>** : Ion cuivreux (I)

**Cu<sup>2+</sup>** : Ion cuivrique (II)

**Cy3** : Cyanine 3

**DAPI** : 4',6-Diamidino-2-Phénylindole

**Dmrt1** : *Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 1*

**DNA** : *Deoxyribonucleic Acid*

**DNAJB9** : *DnaJ Heat Shock Protein Family Member B9*

**DNAse** : Désoxyribonucléase

**dnHSF1** : *dominant negative Heat Shock Factor 1*

**dNTP** : désoxyribonucléoside Triphosphate

**DTT** : Dithiothréitol

**EBM-2** : *Endothelial cell growth Basal Medium-2*

**ECL** : *Enhanced Chemiluminescence*

**EDHF** : *Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*

**EDTA** : *Ethylenediaminetetraacetic acid*

**EGM-2 MV** : *MicroVascular Endothelial cell Growth Medium-2*

**EGTA** : *Ethylene glycol tetraacetic acid*

**EIF4A2** : *Eukaryotic Initiation Factor 4A-II*

**eNOS** : *endothelial Nitric Oxide Synthase*

**ERN1** : *Endoplasmic Reticulum To Nucleus signaling 1*

**ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène

**ERSE** : *Endoplasmic Reticulum Stress-response Element*

**ET-1** : *Endothelin-1*

**FAM** : *Fluorescein Amidite*



**FBS** : *Fetal Bovine Serum*

**FITC** : *Fluorescein Isothiocyanate*

**FKBP4** : *FKBP Prolyl Isomerase 4*

**FoxL2** : *Forkhead Box L2*

**FRIM** : Fédération de Recherche en Imagerie Multimodalité

**GC** : Guanylate cyclase

**GFP** : *Green Fluorescent Protein*

**GMPc** : Guanosine MonoPhosphate cyclique

**GRP78** : *Glucose-Regulated Protein, 78kDa*

**H<sup>+</sup>** : Ion hydrogène

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène

**H3K4** : Histone H3 lysine K4

**HAEC** : *Human Aortic Endothelial Cell*

**HCAEC** : *Human Coronary Artery Endothelial Cell*

**hEGF** : *human Epidermal Growth Factor*

**HEK** : *Human Embryonic Kidney*

**HeLa** : Henrietta Lacks

**hFGF-B** : *human Basic Fibroblast Growth Factor*

**HIST1** : *Histone cluster 1*

**HIST2** : *Histone cluster 2*

**HIST3** : *Histone cluster 3*

**HPRT1** : Hypoxanthine Phosphoribosyltransférase 1

**HRP** : *Horseradish Peroxidase*

**HSE** : *Heat Shock Element*

**HSF** : *Heat Shock Factor*

**HSF1** : *Heat Shock Factor 1*

**HSP** : *Heat Shock Protein*

**HSP40** : *Heat Shock Protein 40*

**HSP70** : *Heat Shock Protein 70*

**HSP90** : *Heat Shock Protein 90*

**HSP90AA1** : *Heat Shock Protein 90 alpha family class A member 1*

**HSP90B1** : *Heat Shock Protein 90 beta family member 1*

**HSPA1A** : *Heat Shock Protein Family A member 1A*

**HSPA1B** : *Heat Shock Protein family A member 1B*

**HSPA5** : *Heat Shock Protein family A member 5*

**HSPH1** : *Heat Shock Protein family H member 1*

**HSR** : *Heat Shock response*

**hTERT** : *human Telomerase Reverse Transcriptase*

**IC50** : *half maximal Inhibitory Concentration*

**ICAM-1** : *InterCellular Adhesion Molecule-1*

**IDI1** : *Isopentenyl-Diphosphate Delta Isomerase 1*

**IL-1 $\beta$**  : *Interleukin-1 Beta*

**IL7R** : *Interleukin 7 Receptor*

**IPA** : *Ingenuity Pathway Analysis*

**IRE1 $\alpha$**  : *Inositol-Requiring Enzyme 1 alpha*

**IRM** : *Imagerie par Résonance Magnétique*

**KCl** : *Chlorure de potassium*

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : *Phosphate de monopotassium*

**LDL** : *Low Density Lipoprotein*

**lnc** : *long non-coding*

**MAPK** : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

**MCP-1** : *Monocyte Chemoattractant Protein-1*

**MEK** : *Mitogen-activated Extracellular signal-regulated protein Kinase*

**MEM** : *Minimum Essential Media*

**MgCl<sub>2</sub>** : *Chlorure de magnésium*

**MgSO<sub>4</sub>** : *Sulfate de magnésium*

**mTORC1** : *mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*

**Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>** : *Sodium orthovanadate*

**Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>** : *Pyrophosphate de sodium*

**NaCl** : *Chlorure de sodium*

**NADPH** : *Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate*

**NaF** : *Fluorure de sodium*

**NaHCO<sub>3</sub>** : Bicarbonate de sodium

**NCBI** : *National Center for Biotechnology Information*

**NF-κB** : *Nuclear Factor-kappa B*

**NFQ** : *Non-Fluorescent Quencher*

**NF-Y** : *Nuclear transcription Factor Y*

**NO** : *Nitric Oxide*

**NTP** : *Nucleoside Triphosphate*

**O<sub>2</sub>** : *Dioxygène*

**Oligo-dT** : *Oligodeoxythymidylic Acid*

**ORF** : *Open Reading Frame*

**p70-S6K** : *p70-S6 Kinase*

**PBS** : *Phosphate-Buffered Saline*

**PCR** : *Polymerase Chain Reaction*

**PECAM-1** : *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*

**PERK** : *Protein kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase*

**PFA** : *Paraformaldéhyde*

**PGE2** : *Prostaglandin E2*

**PGI2** : *Prostacyclin*

**pH** : *potential of hydrogen*

**PI3K** : *PhosphoInositide 3-Kinase*

**PKG** : *Protéine Kinase G*

**PMSF** : *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*

**PVDF** : *Polyvinylidene Fluoride*

**qPCR** : *quantitative Polymerase Chain Reaction*

**R3-IGF-1** : *Recombinant human analog of Insulin-like Growth Factor-1*

**rhEGF** : *recombinant human Epidermal Growth Factor*

**rhFGF-B** : *recombinant human Basic Fibroblast Growth Factor*

**rhIGF-1** : *recombinant human Insulin-like Growth Factor*

**rhVEGF** : *recombinant human Vascular Endothelial Growth Factor*

**RNA** : *Ribonucleic Acid*

**RNAse** : *Ribonucléase*

**RPMI** : *Roswell Park Memorial Institute*

**RT-qPCR** : *real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*

**RW1** : *Ribonucleic acid wash 1*

**SDF2L1** : *Stromal cell Derived Factor 2 Like 1*

**SDS** : *Sodium Dodecyl Sulfate*

**SELE** : *Sélectine E*

**SEM** : *Standard Error of the Mean*

**Ser** : *Sérine*

**siRNA** : *small interfering RNA*

**SQSTM1** : *Séquestosome 1*

**SRM** : *Spectroscopie par Résonance Magnétique*

**SSRE** : *Shear Stress Response Element*

**STARD4** : *StAR related lipid transfer Domain containing 4*

**STIP1** : *Stress-Induced Phosphoprotein 1*

**SVF** : *Sérum de Veau Foetal*

**TBP** : *TATA-Box binding Protein*

**TBS** : *Tris-Buffered Saline*

**Thr** : *Thréonine*

**TLDA** : *TaqMan Low-Density Array*

**TNF $\alpha$**  : *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*

**TRP** : *Transient Receptor Potential*

**TRPA1** : *Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily A Member 1*

**TRPC5** : *Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 5*

**TRPM3** : *Transient Receptor Potential channel subfamily M member 3*

**TRPM8** : *Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 8*

**TRPV1** : *Transient Receptor Potential channel subfamily V member 1*

**TRPV2** : *Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 2*

**TRPV4** : *Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 4*

**TXA2** : *Thromboxane A2*

**UPR** : *Unfolded Protein Response*

**VCAM-1** : *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*

**VE** : *Vascular Endothelial*

**VEGF** : *Vascular Endothelial Growth Factor*

**XBP1** : *X-Box binding Protein 1*

**XBP1s** : *X-Box binding Protein 1 spliced*

**XBP1u** : *X-Box binding Protein 1 unspliced*

# LISTE DES FIGURES

---

FIGURE 1 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DIFFÉRENTS TYPES DE TRANSFERTS THERMIQUES PASSIFS ENTRE L'HOMME ET SON ENVIRONNEMENT.....	3
FIGURE 2 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU SYSTÈME VASCULAIRE DE LA PEAU.....	12
FIGURE 3 : STRUCTURE D'UN CANAL TRP MONOMÉRIQUE (A) OU TÉTRAMÉRIQUE (B). ....	14
FIGURE 4 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA STRUCTURE D'UNE ARTÈRE SANGUINE. ....	16
FIGURE 5 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DIFFÉRENTS TYPES DE JONCTIONS CELLULAIRES ÉTABLIES PAR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES. ....	17
FIGURE 6 : CONSÉQUENCE D'UNE INFLAMMATION VASCULAIRE SUR LES JONCTIONS ADHÉRENTES. ....	19
FIGURE 7 : VOIE DE SIGNALISATION DU NO ENTRAINANT LA VASODILATATION DES VAISSEaux SANGUINS. ....	20
FIGURE 8 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DIFFÉRENTES FORCES EXERCÉES À LA SURFACE ENDOTHÉLIALE. ....	22
FIGURE 9 : RÉSUMÉ SCHÉMATIQUE DES RÉPONSES ENDOTHÉLIALES MISES EN PLACE SUITE À LEUR EXPOSITION À DES FORCES DE CISAILLEMENT LAMINAIRES. ....	24
FIGURE 10 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES CONSÉQUENCES D'UN FLUX LAMINAIRE (A) ET D'UN FLUX PERTURBÉ (B) SUR LA FONCTION ENDOTHÉLIALE. ....	25
FIGURE 11 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UN FLUX LAMINAIRE (A) ET D'UN FLUX TURBULENT (B) AU SEIN D'UN VAISSEAU SANGUIN. ....	26
FIGURE 12 : VUES AVANT (A) ET ARRIÈRE (B) DE LA POMPE.....	33
FIGURE 13 : VUES AVANT (A), DE PROFIL (B) ET ARRIÈRE (C) DE L'UNITÉ FLUIDIQUE.....	34
FIGURE 14 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DES VANNES POUR CRÉER UN FLUX UNIDIRECTIONNEL. ....	35
FIGURE 15 : DESCRIPTION D'UN PERFUSSION SET (A) ET D'UNE $\mu$ -SLIDE (B).....	36
FIGURE 16 : LOGICIEL DE CONTRÔLE DES POMPES.....	37
FIGURE 17 : FLACON DE SÉCHAGE.....	38
FIGURE 18 : CONFIGURATION DU SYSTÈME DE POMPE IBIDI. ....	39
FIGURE 19 : SYNTHÈSE DES ADNC DOUBLE BRIN À PARTIR DES ARN EXTRAITS.....	41
FIGURE 20 : TRANSCRIPTION DES ADNC DOUBLE BRIN ET MARQUAGE DES ARN GÉNÉRÉS. ....	42
FIGURE 21 : PURIFICATION DES ARN MARQUÉS. ....	43
FIGURE 22 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE LA TECHNOLOGIE TAQMAN.....	48
FIGURE 23 : CARTES DES PLASMIDES UTILISÉS. ....	61
FIGURE 24 : STRUCTURE DE LA SONDE THERMIQUE UTILISÉE IN VITRO. ....	66
FIGURE 25 : RÉPARTITION DES GÈNES EXPRIMÉS PAR LES HCAEC EN RÉPONSE À LA TEMPÉRATURE. ....	71
FIGURE 26 : VOLCANO PLOT ISSUS DES ANALYSES STATISTIQUES ANOVA. ....	72
FIGURE 27 : ANALYSE HIÉRARCHIQUE NON SUPERVISÉE DES DONNÉES DE MICROARRAY. ....	73
FIGURE 28 : DIAGRAMME DE VENN REGROUPANT LES 1526 GÈNES DIFFÉRENTIELLEMENT EXPRIMÉS ENTRE 37°C ET 40°C. ....	74
FIGURE 29 : ANALYSE HIÉRARCHIQUE NON SUPERVISÉE DES 581 GÈNES MODULÉS À 6H. ....	75
FIGURE 30 : VOIES DE SIGNALISATION PRÉDITES POUR ÊTRE IMPLIQUÉES DANS LA RÉPONSE CELLULAIRE À LA TEMPÉRATURE.....	77

FIGURE 31 : RÉGULATEURS GÉNIQUES PRÉDITS POUR ÊTRE IMPLIQUÉS DANS LA RÉPONSE CELLULAIRE À LA TEMPÉRATURE. ....	79
FIGURE 32 : LES HSP ET CIRBP FONT PARTIE DES GÈNES RESPECTIVEMENT LES PLUS INDUITS ET RÉPRIMÉS APRÈS 6H À 40°C. ....	81
FIGURE 33 : LES GÈNES MODULÉS PAR LES FORCES DE CISAILLEMENT NE SONT PAS MODULÉS PAR LA TEMPÉRATURE. ....	85
FIGURE 34 : LE FLUX EXACERBE LES DIFFÉRENCES D'EXPRESSION GÉNIQUE EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE. ....	86
FIGURE 35 : LE NIVEAU D'EXPRESSION PROTÉIQUE DES HSP EST AUGMENTÉ EN CONDITION STATIQUE ET EN CONDITION DE FLUX APRÈS 6H À 40°C. ....	88
FIGURE 36 : LA PROTÉINE HSF1 EST PHOSPHORYLÉE EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE. ....	90
FIGURE 37 : L'EXPRESSION DE LUCIFÉRASE, SOUS CONTRÔLE DES ÉLÉMENTS DE RÉPONSE À HSF1, EST FORTEMENT ACTIVÉE EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DE LA TEMPÉRATURE. ....	91
FIGURE 38 : ÉTUDE DE LA TRANSLOCATION NUCLÉAIRE DE HSF1 EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE. ....	92
FIGURE 39 : LES GÈNES THÉORIQUEMENT RÉGULÉS PAR HSF1 SONT SOUS-EXPRIMÉS APRÈS 6H À 40°C. ....	95
FIGURE 40 : LA PROTÉINE P70-S6K EST PHOSPHORYLÉE EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE. ....	96
FIGURE 41 : LA RAPAMYCINE INHIBE LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE P70-S6K. ....	97
FIGURE 42 : LA RAPAMYCINE MODULE UNE PARTIE DES GÈNES RÉGULÉS PAR HSF1 APRÈS 6H À 40°C. ....	99
FIGURE 43 : GEL NON REPRÉSENTATIF DES EXPÉRIENCES RÉALISÉES POUR VISUALISER L'EFFET DE LA RAPAMYCINE SUR LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE HSF1. ....	100
FIGURE 44 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DIFFÉRENTS TRANSCRITS DE XBP1 ET DES PROTÉINES TRADUITES À PARTIR DE CES TRANSCRITS. ....	102
FIGURE 45 : LE TRANSCRIT XBP1 EST ÉPISSÉ EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE. ....	103
FIGURE 46 : LA QUANTITÉ DE PROTÉINE XBP1S ISSUE DU TRANSCRIT ÉPISSÉ EST AUGMENTÉE EN RÉPONSE À UNE ÉLÉVATION DE TEMPÉRATURE. ....	104
FIGURE 47 : LES GÈNES RÉGULÉS PAR ERN1 SONT MODULÉS À 40°C. ....	105
FIGURE 48 : LE B-109 PERMET DE DIMINUER L'ÉPISSAGE DU TRANSCRIT XBP1 APRÈS 2H D'INCUBATION AUX DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES. ....	106
FIGURE 49 : LE B-109 PERMET DE DIMINUER L'ÉPISSAGE DU TRANSCRIT XBP1 APRÈS 6H D'INCUBATION AUX DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES. ....	107
FIGURE 50 : LES GÈNES RÉGULÉS PAR ERN1 NE SONT PAS MODULÉS PAR LE B-109. ....	108
FIGURE 51 : LA TEMPÉRATURE NE MODIFIE PAS LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE ERN1. ....	110
FIGURE 52 : EXEMPLE DE GÈNES DONT L'EXPRESSION, EN PRÉSENCE DES DEUX INHIBITEURS, VARIE COMME EN PRÉSENCE DE RAPAMYCINE SEULE. ....	111
FIGURE 53 : L'EXPRESSION DE LA VE-CADHÉRINE EST DIMINUÉE À 40°C. ....	113
FIGURE 54 : LE PASSAGE DE DEXTRAN-FITC À TRAVERS LA MONOCOUCHE ENDOTHÉLIALE EST AUGMENTÉ À 40°C. ....	114
FIGURE 55 : L'ADHÉRENCE MONOCYTAIRE À L'ENDOTHÉLIUM N'EST PAS MODIFIÉE PAR LA TEMPÉRATURE. ....	115
FIGURE 56 : LA TRANSMIGRATION DES MONOCYTES N'EST PAS MODIFIÉE PAR LA TEMPÉRATURE. ....	117
FIGURE 57 : VOIE DE SIGNALISATION eNOS PRÉDITE POUR ÊTRE IMPLIQUÉE DANS LA RÉPONSE CELLULAIRE À LA TEMPÉRATURE. ....	118
FIGURE 58 : LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE eNOS AUGMENTE DE MANIÈRE CONCOMITANTE À L'AUGMENTATION DES FORCES DE CISAILLEMENT. ....	119
FIGURE 59 : LA TEMPÉRATURE N'A PAS D'EFFET SUR LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE eNOS. ....	120
FIGURE 60 : LA TEMPÉRATURE N'A PAS D'EFFET SUR LA RELAXATION DES ARTÈRES ILIAQUES DE RATS. ....	121

<b>FIGURE 61 : LA TEMPÉRATURE DE LA SOLUTION AQUEUSE AUGMENTE DE MANIÈRE LOCALE AU NIVEAU DE LA BIFURCATION, EX VIVO.</b>	123
<b>FIGURE 62 : LA TEMPÉRATURE DE LA SOLUTION AQUEUSE AUGMENTE DE MANIÈRE LOCALE, EX VIVO, DANS UN MODÈLE DE BIFURCATION IMPRIMÉE EN 3D.</b>	124
<b>FIGURE 63 : CARTOGRAPHIE DE LA TEMPÉRATURE ÉTABLIE PAR IRM EX VIVO, DANS UN MODÈLE DE BIFURCATION IMPRIMÉE EN 3D.</b>	125
<b>FIGURE 64 : LES RATIOS DE FLUORESCENCE DE LA SONDÉ THERMIQUE AUGMENTENT AVEC LA TEMPÉRATURE EN CONDITION STATIQUE.</b>	126
<b>FIGURE 65 : LES RATIOS DE FLUORESCENCE DE LA SONDÉ THERMIQUE NE VARIENT PAS AVEC LA TEMPÉRATURE EN CONDITION DE FLUX LAMINAIRE.</b>	127
<b>FIGURE 66 : EXPRESSION PROTÉIQUE DE HSPA1A ET CIRBP DANS LES DIFFÉRENTES ZONES DE FLUX.</b>	129
<b>FIGURE 67 : CARTOGRAPHIE DE LA TEMPÉRATURE ÉTABLIE PAR IRM AU NIVEAU D'UN SINUS CAROTIDIEN DE SOURIS.</b>	130
<b>FIGURE 68 : LES PERTURBATIONS DE FLUX GÉNÉRÉES PAR LE MANCHON AUGMENTENT L'EXPRESSION DES HSP ET DIMINUENT CELLE DE CIRBP.</b>	131
<b>FIGURE 69 : EXPRESSION DES TRP EN CONDITION BASALE.</b>	133
<b>FIGURE 70 : EXPRESSION DES TRP EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE ET DES CONDITIONS DE CULTURE.</b>	134
<b>FIGURE 71 : SCHÉMA RÉSUMÉ DES DIFFÉRENTES VOIES DE SIGNALISATION MISES EN LUMIÈRE PENDANT CE TRAVAIL DE THÈSE ET DÉCLENCHÉES PAR LES HCAEC À 40°C.</b>	142
<b>FIGURE 72 : LE PROMOTEUR ENRICHÉ EN ÉLÉMENTS DE RÉPONSE ERSE N'EST PAS ACTIVÉ EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DE LA TEMPÉRATURE.</b>	187
<b>FIGURE 73 : VOLCANO PLOT, VOIES DE SIGNALISATION ET RÉGULATEURS GÉNIQUES MIS EN ÉVIDENCE PAR LE LOGICIEL IPA APRÈS 6H OU 24H À 40°C.</b>	188
<b>FIGURE 74 : LA TEMPÉRATURE N'A PAS D'EFFET SUR LA PROLIFÉRATION DES HCAEC.</b>	189
<b>FIGURE 75 : DIAGRAMME DE VENN REGROUPANT LES GÈNES SUR-EXPRIMÉS À 40°C DANS LES CML ET LES HCAEC.</b>	189



# LISTE DES TABLEAUX

---

TABLEAU 1 : TEMPÉRATURE DE SURFACE DE LA PEAU DANS UN ENVIRONNEMENT FROID, CHAUD OU NEUTRE THERMIQUEMENT.....	8
TABLEAU 2 : CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTS DONNEURS D’HCAEC UTILISÉS.....	29
TABLEAU 3 : MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS POUR CHAQUE TYPE CELLULAIRE.....	31
TABLEAU 4 : LISTE DES CONDITIONS TESTÉES EN MICROARRAY.....	44
TABLEAU 5 : COMPOSITION DU TAMPON DE LYSE UTILISÉ EN WESTERN BLOT.....	52
TABLEAU 6 : LISTE ET CARACTÉRISTIQUES DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISÉS EN WESTERN BLOT.....	55
TABLEAU 7 : LISTE ET CARACTÉRISTIQUES DES ANTICORPS SECONDAIRES UTILISÉS EN WESTERN BLOT.....	55
TABLEAU 8 : CARACTÉRISTIQUES DES FILTRES UTILISÉS LORS DE L’ACQUISITION DES IMAGES À L’INCELL 2200.....	57
TABLEAU 9 : LISTE ET CARACTÉRISTIQUES DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISÉS EN IMMUNOMARQUAGE.....	57
TABLEAU 10 : LISTE ET CARACTÉRISTIQUES DES ANTICORPS SECONDAIRES UTILISÉS EN IMMUNOMARQUAGE.....	58
TABLEAU 11 : LISTE ET CARACTÉRISTIQUES DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISÉS EN IMMUNOHISTOCHIMIE.....	59
TABLEAU 12 : LISTE ET CARACTÉRISTIQUES DES ANTICORPS SECONDAIRES UTILISÉS EN IMMUNOHISTOCHIMIE.....	59
TABLEAU 13 : RÉSUMÉ DES CONDITIONS TESTÉES LORS DE L’UTILISATION DE LA SONDE THERMIQUE.....	67
TABLEAU 14 : COMPOSITION DE LA SOLUTION DE KREBS.....	68
TABLEAU 15 : PANEL GÉNIQUE DE RÉFÉRENCE REGROUPANT LES MARQUEURS DE TEMPÉRATURE.....	82
TABLEAU 16 : PANEL DE GÈNES RÉGULÉS PAR LES FORCES DE CISAILLEMENT D’APRÈS WASSERMAN ET AL. ET CHIEN SHU ET AL. ....	84
TABLEAU 17 : RÉSUMÉ DES CONDITIONS TESTÉES POUR VISUALISER LA TRANSLOCATION NUCLÉAIRE DE HSF1.....	93
TABLEAU 18 : LISTE ET RÉFÉRENCES DES GÈNES DONT L’EXPRESSION A ÉTÉ ÉTUDIÉE PAR RT-QPCR.....	168
TABLEAU 19 : LISTE ET RÉFÉRENCES DES 91 GÈNES DONT L’EXPRESSION A ÉTÉ ÉTUDIÉE PAR TLDA.....	171
TABLEAU 20 : LISTE ET RÉFÉRENCES DES 42 GÈNES DU PANEL DE RÉFÉRENCE DONT L’EXPRESSION A ÉTÉ ÉTUDIÉE PAR TLDA.....	173
TABLEAU 21 : LISTE ET RÉFÉRENCES DES 28 GÈNES MODULÉS PAR LES FORCES DE CISAILLEMENT ET DONT L’EXPRESSION A ÉTÉ ÉTUDIÉE PAR TLDA.....	174
TABLEAU 22 : LISTE DES 91 GÈNES DONT L’EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA.....	177
TABLEAU 23 : PANEL DES 42 GÈNES DE RÉFÉRENCE DONT L’EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA EN CONDITION STATIQUE ET EN CONDITION DE FLUX LAMINAIRE.....	178
TABLEAU 24 : LISTE DES GÈNES THÉORIQUÉMENT MODULÉS PAR LES FORCES DE CISAILLEMENT ET DONT L’EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA.....	180
TABLEAU 25 : PANEL DE RÉFÉRENCE DONT L’EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA DANS LES TELO-HAEC EN CONDITION STATIQUE.....	181
TABLEAU 26 : PANEL DE RÉFÉRENCE DONT L’EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA EN PRÉSENCE DE RAPAMYCINE ET EN CONDITION STATIQUE.....	182
TABLEAU 27 : PANEL DE RÉFÉRENCE DONT L’EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA EN PRÉSENCE DE B-109 ET EN CONDITION STATIQUE.....	183
TABLEAU 28 : PANEL DE RÉFÉRENCE DONT L’EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA EN PRÉSENCE DE RAPAMYCINE ET DE B-109 EN CONDITION STATIQUE.....	184

<b>TABLEAU 29 : PANEL DE RÉFÉRENCE DONT L'EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA EN PRÉSENCE D'ADMA EN CONDITION STATIQUE.</b>	185
<b>TABLEAU 30 : TAUX D'INDUCTION DES DIFFÉRENTES HISTONES À 40°C.</b>	186

# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

---

## I. La température

La température est un facteur abiotique clé de l'environnement qui régit le fonctionnement des organismes vivants. Les atomes et les molécules qui nous constituent et nous entourent sont en perpétuel mouvement. Plus la température augmente et plus ces mouvements sont rapides. La température détermine donc des propriétés essentielles tels que la viscosité, la fluidité ou encore les changements d'état (solide, liquide, gaz). C'est seulement à une température absolue égale à 0K (-273°C) que tout mouvement est stoppé (Reynolds and Casterlin, 1980).

L'ensemble des processus biologiques mis en place par les organismes vivants est de nature physico-chimique et donc susceptible d'être profondément impacté par la température. Une augmentation de température accélère la vitesse de déplacement des particules en solution et donc les réactions biochimiques, permettant de former de nouvelles combinaisons moléculaires. Ce facteur abiotique peut également perturber grandement l'intégrité structurelle des organismes. À l'échelle cellulaire, la fluidité membranaire peut être altérée (Cossins, 1977; Cossins and Prosser, 1978; Wodtke, 1978), tout comme le fonctionnement des enzymes puisque leur structure tridimensionnelle est thermolabile (Hochachka and Somero, 1968). Ainsi, lorsque la température augmente, même si les capacités réactionnelles du milieu sont augmentées, la vitesse des réactions enzymatiques peut diminuer en lien avec la concentration en enzymes non dénaturées, impactant alors le métabolisme cellulaire (Reynolds and Casterlin, 1980; Schulte, 2011).

La température est donc une variable fondamentale qui affecte pratiquement tous les aspects de la physiologie d'un organisme, allant de la structure de base de ses macromolécules à la vitesse de ses réactions chimiques. Par conséquent, la façon dont les organismes gèrent cette variable et la compréhension des effets de la température sur les organismes vivants, à tous les niveaux d'organisation, sont primordiales (Reynolds and Casterlin, 1980; Cossins, 1987; PW and Somero, 2002; Schulte, 2011; Buckley, Hurlbert and Jetz, 2012).

Les organismes ont développé différentes stratégies pour s'adapter aux variations de température. Ces stratégies thermiques divisent le monde vivant en deux grands groupes : les ectothermes et les endothermes (Schulte, 2011).

## I.1. L'endothermie, une stratégie évolutive avantageuse

L'endothermie est une adaptation importante dans le règne animal. C'est une caractéristique exclusive à deux groupes de vertébrés : les mammifères et les oiseaux. Ces organismes sont qualifiés d'endothermes car ils sont capables de produire et conserver leur propre chaleur grâce à leur métabolisme interne (Bennett and Ruben, 1979; Schulte, 2011; Clavijo-Baque and Bozinovic, 2012). La plupart d'entre eux sont également qualifiés d'homéothermes, c'est-à-dire que leur température corporelle reste constante indépendamment de la température de l'environnement (Ivanov, 2006). Ces organismes s'opposent au mode de fonctionnement des ectothermes dont la chaleur corporelle dépend directement des apports extérieurs (Crawshaw, 1979; Reynolds and Casterlin, 1980; Schulte, 2011).

Les endothermes ont acquis la capacité à s'adapter à un environnement thermique plus large et donc une possibilité d'occuper des niches géographiques plus variées (Buckley, Hurlbert and Jetz, 2012). De plus, leur température étant constante et optimale pour le fonctionnement des enzymes, les réactions biochimiques peuvent s'effectuer rapidement et de manière stable dans le temps. Les organismes endothermes présentent également une capacité supérieure de métabolisme aérobie, leur procurant un niveau d'activité plus élevé (Bennett, 1991). Par exemple, ils peuvent être davantage actifs la nuit, assimiler plus rapidement leurs nutriments et se déplacer sur une plus grande distance, leur permettant de mieux échapper aux prédateurs et de trouver plus rapidement de la nourriture (Bennett and Ruben, 1979; Clavijo-Baque and Bozinovic, 2012).

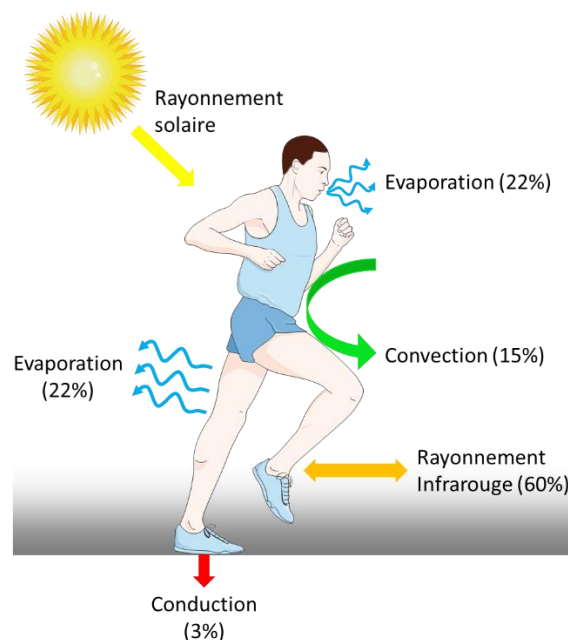
Bien que cette stratégie adaptative s'accompagne d'avantages physiologiques majeurs, elle est également très coûteuse en énergie. Au repos, les organismes endothermes ont une dépense énergétique qui peut dépasser de 5 à 10 fois celle d'un organisme ectotherme, pour une même masse et une même température corporelle (Bennett and Ruben, 1979; Ivanov, 2006). Hormis ces conditions de repos, les endothermes peuvent également mobiliser une très grande partie de leur énergie lorsque la température extérieure varie de manière importante. En effet, la température corporelle des mammifères et des oiseaux est en moyenne comprise entre 36°C et 42°C et chacun d'eux possède une zone de thermoneutralité (Ivanov, 2006). Cette dernière correspond à une gamme de température ambiante dans laquelle l'organisme peut maintenir sa température corporelle constante et où la dépense énergétique est indépendante de la température extérieure. Hors de cette zone, des mécanismes de thermorégulation se déclenchent et mobilisent une grande partie de leur énergie pour maintenir une température interne constante.

## I.2. Les transferts thermiques passifs

Le maintien de la température dans des fourchettes relativement constantes doit prendre en compte la façon dont les transferts thermiques s'opèrent au sein de l'organisme et entre l'organisme et son environnement. Les transferts thermiques correspondent à des transferts de chaleur entre deux systèmes présentant une différence de température. Ils sont qualifiés de passifs lorsqu'ils ne dépendent d'aucun processus biologique. Ils sont alors purement physiques et s'effectuent toujours du corps le plus chaud vers le corps le plus froid.

Même si les organismes endothermes maintiennent une température interne constante, il n'en demeure pas moins qu'il existe une différence thermique entre les parties les plus internes et les parties les plus périphériques de l'organisme. Cette différence génère des transferts de chaleur pour tendre vers un équilibre thermique entre ces deux régions. De manière générale, ces transferts ont tendance à s'effectuer depuis les parties internes vers la périphérie par deux mécanismes physiques différents : la conduction tissulaire et la convection forcée par le sang.

Outre ces transferts thermiques internes, d'autres transferts thermiques, dont certains peuvent être bidirectionnels, se font entre l'organisme et son environnement selon quatre mécanismes physiques différents : la conduction, la convection, le rayonnement et l'évaporation (**Figure 1**).



**FIGURE 1** : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DIFFÉRENTS TYPES DE TRANSFERTS THERMIQUES PASSIFS ENTRE L'HOMME ET SON ENVIRONNEMENT.

Les pourcentages représentent les proportions de chaleur perdue par l'organisme pour chacun d'eux.

D'après <https://smart.servier.com/>

### **I.2.1. La conduction**

La conduction correspond au transfert de chaleur entre deux corps solides en contact l'un avec l'autre.

Chez l'Homme, elle correspond par exemple à un échange thermique entre la surface cutanée et les objets directement en contact avec cette surface. Elle peut également correspondre à une conduction tissulaire mais cela reste un phénomène très lent et considéré comme négligeable.

La quantité de chaleur transférée par conduction dépend de la surface de contact, du gradient de température mais également de la conductivité des différents éléments impliqués. Cette conductivité dépend notamment du degré d'isolation (plume, fourrure, graisse, vêtements) et du rapport surface/volume. En effet, plus le degré d'isolation est important, plus la conductivité sera faible et inversement (L and H, 2012).

### **I.2.2. La convection**

La convection correspond au transfert de chaleur entre deux éléments en mouvement.

Elle correspond par exemple à l'échange thermique entre l'air et la surface cutanée. Lorsque le corps est plus chaud que l'air ambiant, l'air qui entre en contact avec la peau se réchauffe, s'élève et est remplacé par de l'air plus froid de manière continue. Cette convection dépend donc de la température ambiante, du débit de l'air ainsi que de la surface exposée (Tansey and Johnson, 2015).

Au sein de l'organisme, des échanges thermiques par convection sont également mis en place par la circulation sanguine. En effet, le sang transfère la chaleur depuis les organes internes vers la périphérie ou, au contraire, ramène ce sang refroidi en périphérie vers les organes internes et les tissus musculaires (L and H, 2012). L'intensité de cette convection est donc liée directement à la différence de température entre sang artériel et sang veineux, au débit sanguin et à la capacité calorifique du sang.

### **I.2.3. Le rayonnement**

Le transfert thermique par rayonnement correspond à l'échange de chaleur entre deux surfaces, distantes l'une de l'autre.

Cet échange s'effectue sous forme d'ondes d'électromagnétiques. En effet, tout corps, dont la température est supérieure au zéro absolu (0K), émet un rayonnement infrarouge. Certaines caméras,

sensibles à ces longueurs d'ondes, sont capables d'enregistrer des images thermiques et permettent de mesurer de façon fiable la température présente à la surface d'un corps.

Ces échanges par rayonnement peuvent être positifs, par absorption en surface d'infrarouges provenant d'une source externe (par exemple la lumière du soleil ou un radiateur), ou bien être négatifs, par rayonnement infrarouge de l'organisme vers des surfaces environnantes plus froides. Ces transferts thermiques dépendent de nombreux facteurs et notamment du coefficient de permittivité, c'est-à-dire la capacité d'un corps à absorber et réémettre l'énergie rayonnée (L and H, 2012).

#### **I.2.4. L'évaporation**

L'évaporation correspond à la perte de chaleur dans l'environnement sous forme de vapeur d'eau. Elle peut s'effectuer au niveau des voies respiratoires, puisque l'air expiré est saturé en vapeur d'eau, ou au niveau de la surface cutanée, via un phénomène de perspiration cutanée insensible.

Lorsque l'organisme est exposé à une température ambiante supérieure à sa température corporelle, c'est souvent le transfert thermique le plus efficace (L and H, 2012). Il dépend de la surface exposée à l'environnement, de la température et du taux d'humidité de l'air ambiant mais également des courants d'air convectifs autour du corps.

Bien que très efficace, ce mécanisme est rendu quasiment inutile lorsque l'air ambiant est saturé en humidité. Dans ce cas, l'air ne peut plus absorber d'humidité supplémentaire, l'évaporation est donc stoppée.

### **I.3. Variations thermiques et thermorégulation à l'échelle de l'organisme**

#### **I.3.1. Bilan thermique, rhéostat de la thermorégulation**

Comme la plupart des mammifères, l'Homme est un endotherme homéotherme, ce qui signifie qu'il est à la fois capable de produire sa propre chaleur grâce à son métabolisme interne mais également de maintenir sa température corporelle constante. La température optimale du corps humain est comprise en moyenne entre 36,5°C et 37,5°C (Wunderlich *et al.*, 1871; Mackowiak, Wasserman and Levine, 1992; Sund-Levander, Forsberg and Wahren, 2002). Elle fluctue de manière normale au cours d'une journée (cycles nyctéméraux et circadiens) (Van Someren, 2006), d'un mois (cycle menstruel) (Tur, 1997) ou même d'une vie (âge) (Van Someren *et al.*, 2002) mais pour simplifier, nous considérerons cette température interne à 37°C (Tansey and Johnson, 2015) pour une température de



thermoneutralité qui se situe chez l'Homme entre 26°C et 32°C (Hardy, Du Bois and Soderstrom, 1938; Erikson *et al.*, 1956).

Afin de modéliser et mieux comprendre les mécanismes intervenant dans le maintien de sa température corporelle, l'Homme est assimilé à un modèle bi-compartimental avec une partie centrale, appelée noyau, entourée d'une enveloppe périphérique. La température optimale du corps humain est considérée comme étant celle de la température du noyau. Le noyau correspond aux tissus corporels profonds, c'est-à-dire aux organes ayant un niveau élevé de métabolisme basal tel que le cerveau, le cœur ou encore le foie. La température du noyau est donc essentiellement due à la production de chaleur permise par le métabolisme et indépendante de celle du milieu extérieur. Elle doit être stable et maintenue à 37°C. À l'inverse, l'enveloppe périphérique correspond à la peau et aux tissus sous-cutanés. Sa température est donc directement influencée par la température du milieu extérieur et celle du flux sanguin. Elle est généralement inférieure de 4°C par rapport à la température du noyau (Arens and Zhang, 2006; Tansey and Johnson, 2015). Cependant, dans certains cas, elle peut varier de manière très importante, avec une amplitude allant de 20°C à 40°C, sans conséquences néfastes pour l'organisme.

La thermorégulation représente l'ensemble des processus permettant de maintenir la température centrale constante quel que soit le niveau métabolique ou la température du milieu extérieur. Pour cela, la production (thermogenèse) et les gains de chaleur doivent être en permanence équilibrés avec ses déperditions (thermolyse). Cette thermorégulation est primordiale puisque les variations thermiques du noyau en dehors des valeurs de températures optimales peuvent s'avérer fatales. La thermorégulation tente donc de contrôler les éléments de l'équation suivante :

$$\text{Bilan thermique} = \text{Thermogenèse} - \text{Thermolyse}$$

$$\text{Bilan thermique} = \text{Métabolisme} + \text{Gains de chaleur} - \text{Pertes de chaleur}$$

Sur la base de ce qui précède sur les transferts thermiques, cette équation peut s'écrire ainsi :

$$\text{Bilan thermique} = \text{Métabolisme} +/- \text{Conduction} +/- \text{Convection} +/- \text{Radiation} - \text{Évaporation}$$

Lorsque ce bilan thermique est nul, les productions et gains de chaleur sont équilibrés avec les pertes de chaleur et la température centrale est maintenue à 37°C.

Cependant, lorsque cette valeur s'éloigne de manière trop importante du 0 et donc, de l'équilibre thermique, des mécanismes actifs de thermorégulation, nécessitant une dépense énergétique, sont déclenchés (Tansey and Johnson, 2015).

## I.3.2. Variations physiologiques et pathologiques de la température

### I.3.2.1. Hypothermie et hyperthermie

En cas de déséquilibre entre les mécanismes de thermogenèse et de thermolyse, des modifications systémiques de la température corporelle peuvent être observées.

Lorsque les mécanismes de thermogenèse ne sont plus suffisants pour lutter contre le froid et que la température ambiante est faible, la température du corps va baisser. Lorsqu'elle diminue en dessous de 35°C, l'organisme est en hypothermie (Danzl and Pozos, 2010; Soar *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2012).

Au contraire, la température du corps peut augmenter au-delà de 37.5°C, l'organisme est alors en hyperthermie. Cette situation peut être provoquée par une augmentation de la thermogenèse, une température ambiante élevée ou encore une défaillance des mécanismes de thermolyse (Soar *et al.*, 2010).

Dans les deux cas, cela entraîne une variation importante de la température corporelle et donc, de la température sanguine, pouvant avoir des conséquences graves sur l'organisme en cas de durée prolongée (Simon, 2010; Soar *et al.*, 2010). L'hypo- et l'hyperthermie constituent des exemples de variations systémiques de la température corporelle. Néanmoins, il existe également des circonstances au cours desquelles des hétérogénéités thermiques localisées peuvent être observées.

### I.3.2.2. Hétérogénéité thermique entre différents organes

Le système sanguin permet la répartition de la chaleur à l'échelle de l'organisme. Néanmoins, certaines hétérogénéités thermiques peuvent persister entre différentes zones du corps, du fait de leur exposition au milieu extérieur ou leur niveau de métabolisme.

La peau par exemple, constitue une véritable interface entre le corps et l'environnement extérieur. Sa température est en moyenne 4°C plus basse que celle du noyau (Arens and Zhang, 2006; Tansey and Johnson, 2015) et peut varier de manière beaucoup plus importante selon la température du milieu extérieur (Arens and Zhang, 2006). Au-delà de l'hétérogénéité thermique existante entre le noyau et l'enveloppe périphérique, la température de la peau n'est pas identique en tout point du corps (**Tableau 1**).

Partie du corps	Température de la peau dans un milieu neutre thermiquement (°C)	Température de la peau dans un environnement froid (°C)	Température de la peau dans un environnement chaud (°C)
Front	35,8	<b>30,7</b>	36,5
Joue	35,2	27,7	36,3
Cou avant	35,8	<b>33,5</b>	36,8
Cou arrière	35,4	<b>34,5</b>	36,1
Poitrine	35,1	30,9	36,1
Dos	35,3	32,4	36,3
Abdomen	35,3	28,7	36,2
Haut du bras	34,2	24,7	36,4
Bas du bras	34,6	27,3	36,1
Main	34,4	<b>23,1</b>	<b>36</b>
Doigt gauche	35,3	<b>21,1</b>	<b>36,7</b>
Cuisse	34,3	27,0	<b>35,6</b>
Tibia	<b>32,9</b>	26,5	<b>34,4</b>
Mollet	<b>32,7</b>	24,3	<b>34,1</b>
Pied	<b>33,3</b>	21,4	<b>36,4</b>
Température moyenne	<b>34,45</b>	<b>26,8</b>	<b>35,8</b>

**TABLEAU 1 : TEMPÉRATURE DE SURFACE DE LA PEAU DANS UN ENVIRONNEMENT FROID, CHAUD OU NEUTRE THERMIQUEMENT.**

*D'après Arens et Zhang, 2006.*

Dans un environnement neutre thermiquement, elle est relativement homogène mais un abaissement d'environ 1°C est tout de même observé au niveau des membres inférieurs (**Tableau 1**).

Dans un environnement froid, la température de la peau va s'abaisser de manière importante en raison de la vasoconstriction cutanée. Des différences thermiques peuvent alors être observées entre certaines surfaces du corps. À titre d'exemple, les doigts feront partie des zones les plus froides du corps, pouvant atteindre une différence thermique de 9°C avec celle du front. Au contraire, le cou sera la zone la plus chaude (Arens and Zhang, 2006) (**Tableau 1**).

Dans un environnement chaud, les températures de la peau seront davantage homogènes, avec une différence thermique atteignant un maximum de 2,7°C. Néanmoins, quelques hétérogénéités peuvent persister, notamment au niveau des mains et des pieds. En effet, ces parties seront dilatées et représenteront les températures de surface les plus chaudes du corps. Au contraire, les membres inférieurs constitueront les zones les plus froides (Arens and Zhang, 2006) (**Tableau 1**).

Au-delà de l'hétérogénéité thermique observée à la surface de la peau, de la chaleur peut être produite de façon hétérogène par les différents organes. La majeure partie de la production de chaleur s'effectue dans le cerveau, le cœur et le foie. Les muscles squelettiques peuvent également être ajoutés à ces trois organes en cas d'exercice physique. Même si cette chaleur est transférée par la suite à travers le réseau vasculaire, cette différence de métabolisme constitue une source d'hétérogénéité thermique supplémentaire entre les organes.

Des différences de température peuvent donc être observées entre le noyau et l'enveloppe périphérique, au sein du noyau et au sein de l'enveloppe périphérique. Le système sanguin, qui assure la répartition de chaleur dans le corps, est donc sujet en permanence à des hétérogénéités thermiques.

### 1.3.2.3. Élévations pathologiques de la température

Certaines conditions pathologiques s'accompagnent d'une augmentation importante de la température de façon systémique ou de façon locale au sein d'un tissu donné.

La fièvre est un parfait exemple d'augmentation systémique de la température corporelle. Elle correspond en réalité à une hyperthermie contrôlée où les systèmes de thermorégulation fonctionnent correctement mais où le point d'équilibre au niveau de l'hypothalamus, initialement à 37°C, est modifié à un point d'équilibre plus élevé (Kluger *et al.*, 1996). La fièvre est généralement causée par une infection bactérienne, virale ou encore parasitaire et constitue un véritable système d'alerte pour le corps. En effet, son rôle principal est de protéger l'organisme en ralentissant la progression des agents pathogènes mais également en renforçant le fonctionnement du système immunitaire (Evans, Repasky and Fisher, 2015; Garami, Steiner and Romanovsky, 2018). Il est possible que l'hyperthermie fébrile puisse avoir un effet sur la biologie vasculaire (Vlad *et al.*, 2010). En effet, elle contribue à l'activation des cellules endothéliales et à l'augmentation de leur perméabilité (Lee and Slutsky, 2010; Srikiatkhachorn and Kelley, 2014; Li *et al.*, 2017). Cela favorise le passage des monocytes qui permettent de lutter contre l'infection (Walter *et al.*, 2016). Ce phénomène est

bénéfique pour l'organisme et est réversible. Si l'hyperthermie persiste ou devient trop prononcée, elle peut toutefois devenir délétère et entraîner des lésions endothéliales et le développement d'œdèmes tissulaires (Walter *et al.*, 2016), caractéristiques des maladies inflammatoires aiguës.

Les réponses inflammatoires (qu'elles soient d'origine infectieuse ou non) sont décrites depuis l'antiquité comme étant caractérisées par quatre signes cardinaux : la chaleur (*calor*), la douleur (*dolor*), la rougeur (*rubor*) et l'œdème (*tumor*) (Chandrasoma and Chandrasoma, 2013; 'Aulus Cornelius Celsus', 2020). Il est donc possible que l'élévation locale de la température entraîne une élévation de la température des vaisseaux irriguant ces tissus inflammatoires.

Il est intéressant de noter que des pathologies vasculaires peuvent également être associées à des élévations locales de la température. En effet, des hétérogénéités thermiques ont été décrites au niveau des plaques d'athérome, en comparaison avec des régions vasculaires saines. Cela a été démontré à la fois *ex vivo* (Casscells *et al.*, 1996) et *in vivo* notamment chez le lapin (Verheye *et al.*, 2002) et chez l'Homme (Stefanadis *et al.*, 1999). Ces hétérogénéités thermiques ont été interprétées comme résultant d'une activité métabolique élevée des cellules immunitaires (les macrophages notamment) présentes au sein des lésions vasculaires (Casscells *et al.*, 1996; Madjid *et al.*, 2002; Verheye *et al.*, 2002).

#### **I.3.2.4. Le système sanguin, un élément central de la thermorégulation systémique**

Les hétérogénéités thermiques observées au sein du corps ont donc de nombreuses origines possibles. Au sein du système vasculaire, ces hétérogénéités pourraient avoir des conséquences significatives sur la répartition de la chaleur, sur la température globale du sang mais aussi sur le fonctionnement des vaisseaux et leur structure.

La thermorégulation active est un système de rétrocontrôle capable de déclencher des mécanismes spécifiques et inconscients. Elle est contrôlée par le système nerveux autonome et nécessite différents acteurs :

- Les thermorécepteurs dont le rôle est de détecter les variations de température.
- Les voies de transmission afférentes qui permettent de transporter l'information issue des thermorécepteurs vers le centre intégrateur.
- Le centre intégrateur, correspondant à l'hypothalamus, qui permet de comparer les informations reçues avec la température optimale. Il est capable d'établir une réponse adaptée.

- Les voies de transmission effectrices qui permettent de transmettre aux effecteurs les réponses à mettre en place.
- Les effecteurs qui permettent véritablement de réguler la température centrale du corps. Il en existe deux types : ceux de la thermogenèse et ceux de la thermolyse.

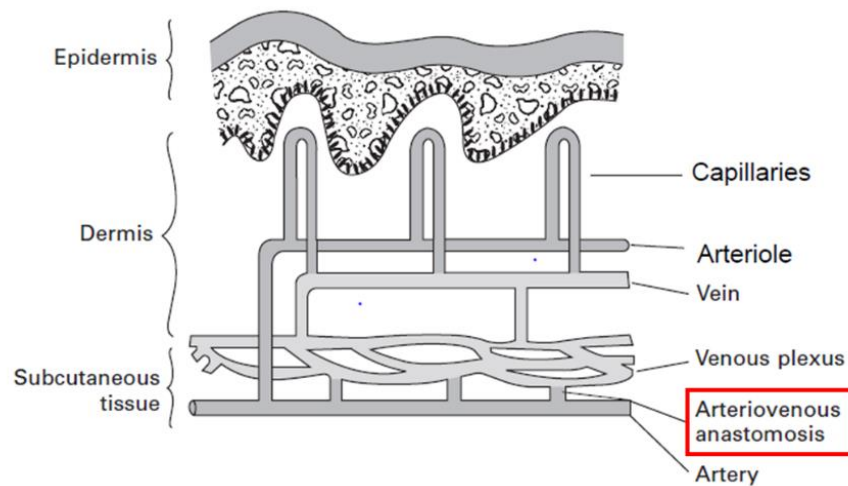
Les thermorécepteurs sont capables de mettre en place différentes réponses en fonction du bilan thermique de l'organisme : réponses vasomotrices adaptées, transpiration ou frisson (Tansey and Johnson, 2015). Le système sanguin, déjà impliqué dans les transferts thermiques passifs et la répartition de la chaleur à travers l'organisme, intervient également dans toutes ces réponses.

Lors d'une modification de température, les réponses vasomotrices, très peu coûteuses sur le plan énergétique, font partie des premiers mécanismes mis en place chez l'Homme. Elles permettent de faire varier le débit sanguin ainsi que le diamètre des vaisseaux afin de maintenir ou dissiper la chaleur présente dans le corps.

En réponse à une augmentation de la température corporelle, ces réponses vasomotrices se manifestent principalement par une vasodilatation cutanée (Johnson, Minson and Kellogg, 2014). En effet, le système nerveux sympathique noradrénergique est inhibé, entraînant d'une part, l'augmentation du débit sanguin (pouvant être multiplié par 10) et d'autre part, une importante vasodilatation (Charkoudian, 2003). Le volume sanguin sous-cutané est alors augmenté, ce qui accroît le gradient thermique entre la peau et l'environnement. Une quantité de sang plus importante étant refroidie, la perte de chaleur convective est favorisée (Arens and Zhang, 2006; Tansey and Johnson, 2015).

Au contraire, en réponse à une diminution de la température corporelle, le système nerveux noradrénergique est stimulé (Charkoudian, 2003). Les réponses vasomotrices se manifestent alors par une vasoconstriction généralisée des vaisseaux sanguins (Johnson, Minson and Kellogg, 2014). À travers ce mécanisme, le volume sanguin sous-cutané est diminué afin de limiter les transferts de chaleur vers le milieu extérieur. Le flux sanguin est alors dirigé vers les systèmes veineux plus profonds, favorisant une conservation de la chaleur corporelle et une augmentation du gradient thermique entre noyau et enveloppe périphérique (Arens and Zhang, 2006; Tansey and Johnson, 2015).

Tous ces phénomènes d'adaptation sont favorisés par des anastomoses artérioveineuses (**Figure 2**). Leur ouverture est sous le contrôle de fibres nerveuses sympathiques et permet de court-circuiter le réseau capillaire (Arens and Zhang, 2006; Tansey and Johnson, 2015). Elles jouent ainsi un rôle important dans la thermorégulation.



**FIGURE 2 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU SYSTÈME VASCULAIRE DE LA PEAU.**

*D'après Arens et Zhang, 2006.*

La réactivité vasculaire participe activement à la thermorégulation en contrôlant le flux sanguin. Cependant, lorsque ces réponses vasomotrices ne sont pas assez efficaces pour lutter contre les variations thermiques, d'autres mécanismes plus coûteux sur le plan énergétique entrent en jeu comme la transpiration ou le frissonnement.

La transpiration est la principale réponse mise en place par l'organisme pour lutter contre le chaud et permettre à la chaleur en excès d'être transférée dans l'environnement extérieur. Cette sécrétion sudorale est permise par la vasodilatation des vaisseaux sanguins (Bregelmann *et al.*, 1981). Elle serait également accompagnée d'une sécrétion de bradykinine vers le sang afin de favoriser et maintenir cette vasodilatation (Fox and Hilton, 1958). À l'inverse, le frisson est le mécanisme le plus efficace chez l'Homme pour produire de la chaleur et la conserver. C'est un indicateur de vasoconstriction maximale (Degroot and Kenney, 2007). En effet, le frisson correspond à une alternance de contraction-relaxation rapide et involontaire des muscles squelettiques dont l'intensité maximale permet une production de chaleur équivalente à 5 fois le taux métabolique basal (Eyolfson *et al.*, 2001). La vasomotricité du système sanguin joue donc un rôle essentiel dans ces deux mécanismes.

Par conséquent, malgré le fait que l'hypothalamus ait été défini comme le centre de thermorégulation de l'organisme, aucun processus de thermorégulation ne serait possible sans la plasticité fonctionnelle rapide du système vasculaire, contribuant notamment à la distribution du sang vers les organes clés. De ce fait, le système vasculaire joue un rôle majeur dans la thermorégulation en permettant le maintien de l'homéostasie thermique. Il peut être donc considéré comme un centre de thermorégulation à part entière.

## I.4. Variations thermiques et thermorégulation à l'échelle cellulaire

La thermorégulation active à l'échelle de l'organisme est dépendante du système nerveux autonome et est bien connue (Tansey and Johnson, 2015). Cependant, à l'échelle cellulaire, elle est peu décrite. Or, la température a un impact important dans tous les processus biologiques. Elle peut altérer la vitesse des réactions enzymatiques (Hochachka and Somero, 1968), la fluidité membranaire (Cossins and Prosser, 1978; Wodtke, 1978; Cossins, 1987) mais aussi la structure tridimensionnelle des protéines (Hochachka and Somero, 1968). Il existe donc, à l'échelle cellulaire, des systèmes de thermorégulation permettant aux cellules de maintenir leurs fonctions principales et de lutter contre les dommages créés par la température. Pour cela, les cellules doivent être capables de percevoir les variations thermiques et d'y répondre de manière adaptée. Les systèmes moléculaires les plus étudiés sont, d'une part, les systèmes de détection thermique au premier rang desquels on trouve les *Transient Receptor Potential Channels* ou canaux TRP et, d'autre part, les systèmes de réponse au stress thermique au centre desquels se placent les *Heat Shock Proteins* ou HSP.

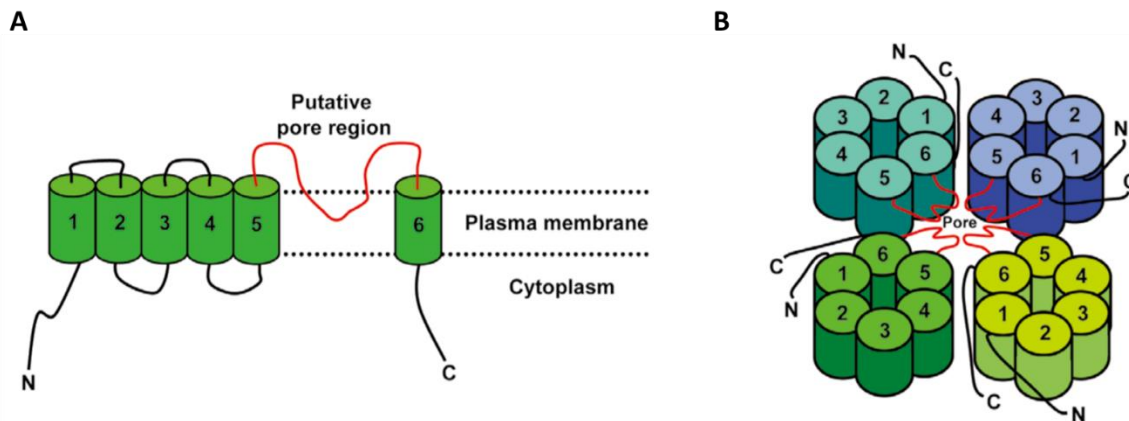
### I.4.1. TRP et détection des variations thermiques

De nombreuses cellules expriment, au niveau de leur surface membranaire, des canaux ioniques appelés TRP (Minke, 2010). Ils constituent une famille de 50 membres très conservés au cours de l'évolution dont 28 sont exprimés chez l'Homme (Clapham, 2003; Bandell, Macpherson and Patapoutian, 2007; Earley and Brayden, 2015). Ils sont activés de façon très variée : lorsqu'ils sont soumis à des plages définies de température, par des messagers cellulaires, des composés chimiques, des stimulations mécaniques ou encore un stress osmotique (Nilius and Voets, 2005; Pedersen, Owsianik and Nilius, 2005; Kaneko and Szallasi, 2014). Jusqu'à présent, les TRP ont été particulièrement étudiés pour leurs rôles dans la physiologie sensorielle mais ils participent également à la perception de stimuli avec un rôle dans la transduction du signal cellulaire.

Parmi l'ensemble des TRP, neuf ont la faculté d'être activés uniquement et directement par la température ou bien d'être indirectement influencés par cette dernière (Bandell, Macpherson and Patapoutian, 2007). Ils sont appelés « thermo-TRP ». Chacun d'entre eux est spécifique d'une plage de température donnée, allant du froid extrême à la chaleur nocive (Clapham, 2003; Patapoutian *et al.*, 2003). Sur le plan structurel, les thermo-TRP présentent une grande homologie avec six domaines transmembranaires séparés par des boucles hydrophiles. Les deux extrémités C- et N-terminales sont intracytoplasmiques (Clapham, 2003) et il existe, entre les domaines 5 et 6, un segment hydrophobe



participant à la formation d'un pore (Owsianik *et al.*, 2006) (**Figure 3A**). Un canal TRP est formé par l'association de quatre monomères, identiques ou non (Watanabe *et al.*, 2009) (**Figure 3B**).



**FIGURE 3 : STRUCTURE D'UN CANAL TRP MONOMÉRIQUE (A) OU TÉTRAMÉRIQUE (B).**

*D'après Watanabe et al, 2009.*

Les variations thermiques entraînent l'ouverture de ces canaux, ce qui favorise l'entrée massive de cations dans les cellules (notamment le  $\text{Ca}^{2+}$ ) et la mise en place d'une réponse adaptée. Ils participent activement à la transduction de signaux au sein des cellules (Clapham, 2003). Néanmoins, leur rôle et leur expression varient d'un type cellulaire à l'autre. Plusieurs travaux ont montré l'existence de ligands plus ou moins spécifiques, capables d'agoniser ou d'antagoniser les thermo-TRP (Kaneko and Szallasi, 2014).

À l'échelle cellulaire, les thermo-TRP jouent donc un rôle essentiel dans la thermorégulation, permettant la détection des variations thermiques par les cellules et la transduction d'un signal spécifique.

#### **1.4.2. Les mécanismes adaptatifs : protéines chaperonnes et activités enzymatiques**

Outre les TRP, la cellule dispose d'autres dispositifs moléculaires lui permettant de changer sa biologie selon la température. Les HSP sont des protéines ubiquitaires et abondantes dans tous les compartiments subcellulaires. Elles appartiennent à une famille multigénique très conservée au cours de l'évolution possédant un haut degré d'homologie (Lindquist, 1986). Elles sont classées en fonction de leur masse moléculaire et participent à la survie cellulaire.

Les HSP sont des protéines chaperonnes dont le rôle est d'aider au repliement et à l'assemblage des protéines dans des structures oligomériques (Ellis, van der Vies and Hemmingsen, 1989). Les HSP constituent donc un véritable système de « contrôle qualité » au sein de chaque cellule et de chaque compartiment cellulaire. Il est important de noter que le repliement protéique est un mécanisme thermo-dépendant. En effet, lors d'une augmentation de la température, la structure des protéines peut être altérée. C'est pour cette raison que l'expression des HSP est augmentée, pour pallier les mauvais repliements et protéger les cellules contre l'agrégation massive de protéines provoquée par l'hyperthermie (Ellis, van der Vies and Hemmingsen, 1989).

Les mécanismes moléculaires TRP- et HSP-dépendants, décrits ci-avant, sont les mécanismes de thermorégulation à l'échelle cellulaire qui ont été les plus étudiés. Ils l'ont été par des approches focalisées et en faisant appel à des systèmes cellulaires modèles soumis à des variations thermiques presque toujours supra-physiologiques. Nous manquons donc de données sur des cellules primaires soumises à des conditions hyperthermiques physiologiques.

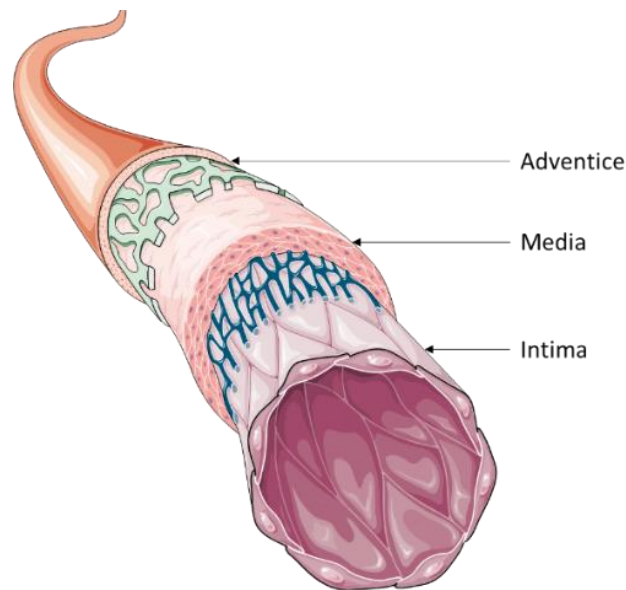
## II. Le système sanguin

Comme nous l'avons vu plus haut, la plasticité fonctionnelle rapide du système vasculaire contribue de façon centrale à la thermorégulation en permettant le maintien de l'homéostasie thermique. En outre, ce système circulatoire fermé assure le transport du dioxygène et des nutriments à travers l'ensemble de l'organisme.

Ce réseau, de près de 100 000 km de long chez l'Homme, est constitué de différents types de vaisseaux sanguins qui se différencient majoritairement par leur diamètre et leur fonction. Les artères permettent un transport du sang enrichi en dioxygène et en nutriments depuis le cœur gauche vers les différents organes. Au contraire, les veines assurent le retour du sang chargé en dioxyde de carbone des organes vers le cœur droit, puis les poumons. Tous les organes sont richement irrigués par les capillaires qui relient entre elles artérioles et veinules pour permettre les échanges entre le sang et les organes.

### II.1. Structure de la paroi artérielle

La structure et la fonction de chaque segment artériel varient en fonction de l'organe irrigué. Les artères sont toutefois toujours constituées de trois tuniques : l'adventice, la média et l'intima (**Figure 4**).



**FIGURE 4 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA STRUCTURE D'UNE ARTÈRE SANGUINE.**

D'après <https://smart.servier.com/>

L'adventice correspond à la tunique la plus externe du vaisseau. Elle est composée principalement de fibres de collagène, de quelques fibres élastiques et de fibroblastes conférant une résistance importante au vaisseau. La média, quant à elle, correspond à la tunique intermédiaire et la plus épaisse du vaisseau. Elle est composée essentiellement de cellules musculaires lisses (CML) responsables de la contractilité du vaisseau sanguin. Enfin, l'intima est la tunique la plus interne et la plus fine du vaisseau. Elle est constituée d'une couche continue de cellules endothéliales appelée endothélium. Ce dernier repose sur une couche sous-endothéliale de tissu conjonctif, composée de fibres de collagène et élastiques. L'endothélium constitue une véritable frontière entre le sang et la paroi des vaisseaux. Les cellules endothéliales qui le composent sont directement en contact avec le sang, leur conférant un rôle primordial dans l'homéostasie vasculaire.

## II.2. Importance de l'endothélium dans l'homéostasie vasculaire

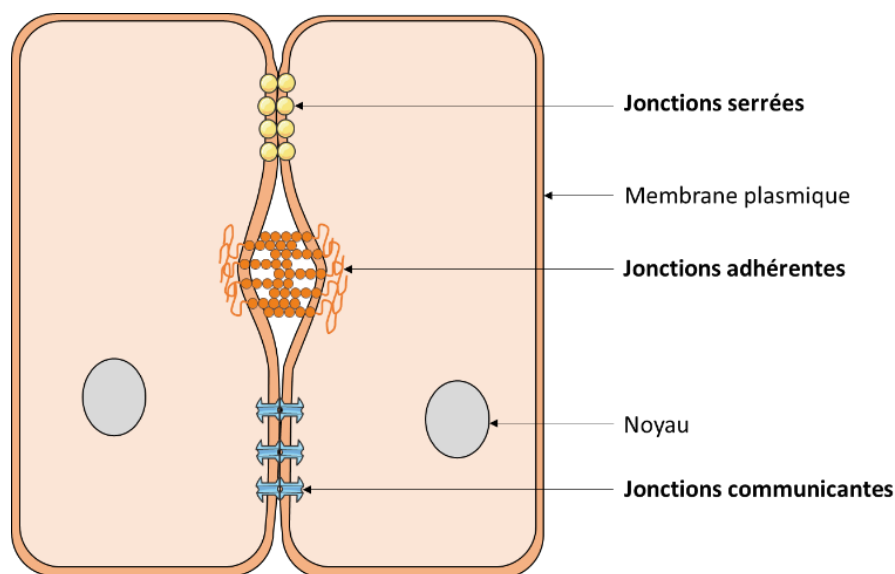
### II.2.1. Fonctions principales de l'endothélium

Les cellules endothéliales vasculaires forment une monocouche cellulaire qui tapisse la surface interne de tous les vaisseaux de l'organisme. Elles sont toujours orientées dans le sens de l'écoulement sanguin. L'intégrité endothéliale est assurée par des systèmes d'adhérence cellule/cellule et cellule/matrice qui permettent notamment d'assurer le maintien des fonctions essentielles de

l'endothélium comme la régulation du tonus vasculaire par la production de substances vasoactives qui modifient les fonctions des muscles lisses sous-jacents. À l'interface entre le sang et les tissus, les cellules endothéliales contrôlent également la perméabilité cellulaire et le recrutement des cellules immunitaires au sein de la paroi vasculaire. Enfin, ces cellules permettent de réguler l'hémostase et la thrombose par la production de molécules inhibant l'agrégation plaquettaire.

### II.2.1.1. Barrière semi-perméable

L'endothélium forme une barrière semi-perméable entre le sang et les tissus environnants. Sa fonction majeure est d'assurer le contrôle du passage des solutés et des macromolécules à travers la paroi des vaisseaux sanguins. Cette perméabilité sélective est assurée par différents types de jonctions cellulaires : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes (**Figure 5**). Ce sont des structures complexes formées de molécules transmembranaires reliées à un réseau de protéines cytoplasmiques et cytosquelettiques (Michiels, 2003; Féléto, 2011).



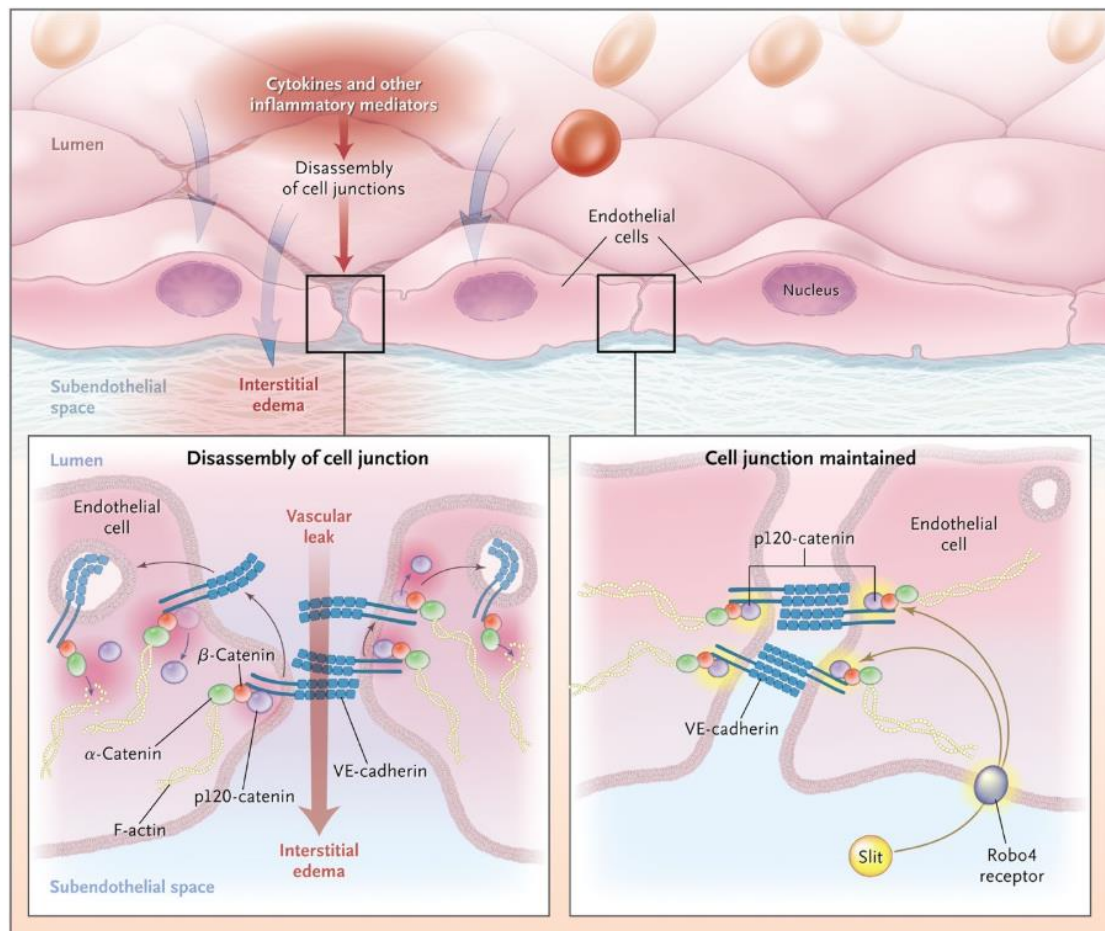
**FIGURE 5** : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DIFFÉRENTS TYPES DE JONCTIONS CELLULAIRES ÉTABLIES PAR LES CELLULES ENDOTHÉLIALES.

D'après <https://smart.servier.com/>

Les jonctions serrées sont situées au niveau de la partie apicale et basolatérale des cellules endothéliales et contribuent à leur polarisation. Elles permettent à deux cellules adjacentes d'accoler leurs membranes pour créer une barrière et ainsi de contrôler le passage de molécules dans l'espace

intercellulaire (Anderson and Van Itallie, 1995). Les jonctions adhérentes sont également impliquées dans l'adhérence entre les cellules endothéliales et le passage de macromolécules. Elles sont composées essentiellement de VE-cadhérines, spécifiques des cellules endothéliales (Vestweber, 2000). Ce sont des récepteurs transmembranaires dont le domaine intracellulaire ancre la cellule aux composants du cytosquelette via leurs partenaires cytoplasmiques, notamment les caténines (Dejana, 1996; Huber, 2000). Enfin, les jonctions communicantes permettent l'échange intercellulaire d'ions ou de petites molécules solubles dans l'eau. Cependant, elles ne permettent pas l'échange de macromolécules. Elles sont composées de canaux qui permettent la connexion du cytoplasme de deux cellules adjacentes (**Figure 5**).

L'ensemble des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales leur permet donc d'établir une barrière restrictive aux macromolécules. Dans certains cas, notamment en contexte inflammatoire, cette fonction peut être altérée (Lee and Slutsky, 2010; Srikiatkachorn and Kelley, 2014; Li *et al.*, 2017). Par exemple, la production et la libération de médiateurs tels que l'histamine ou la thrombine entraînent la phosphorylation des VE-cadhérines, la libération des caténines associées et ainsi la rétraction des cellules endothéliales (Lee and Slutsky, 2010). Cela favorise alors l'augmentation du volume de l'espace interstitiel et de la perméabilité cellulaire aux solutés et protéines plasmatiques. Un œdème et une dysfonction tissulaire peuvent ainsi apparaître (Michiels, 2003; Félétou, 2011) (**Figure 6**).



**FIGURE 6 : CONSÉQUENCE D'UNE INFLAMMATION VASCULAIRE SUR LES JONCTIONS ADHÉRENTES.**

*D'après Lee et Slutsky, 2010.*

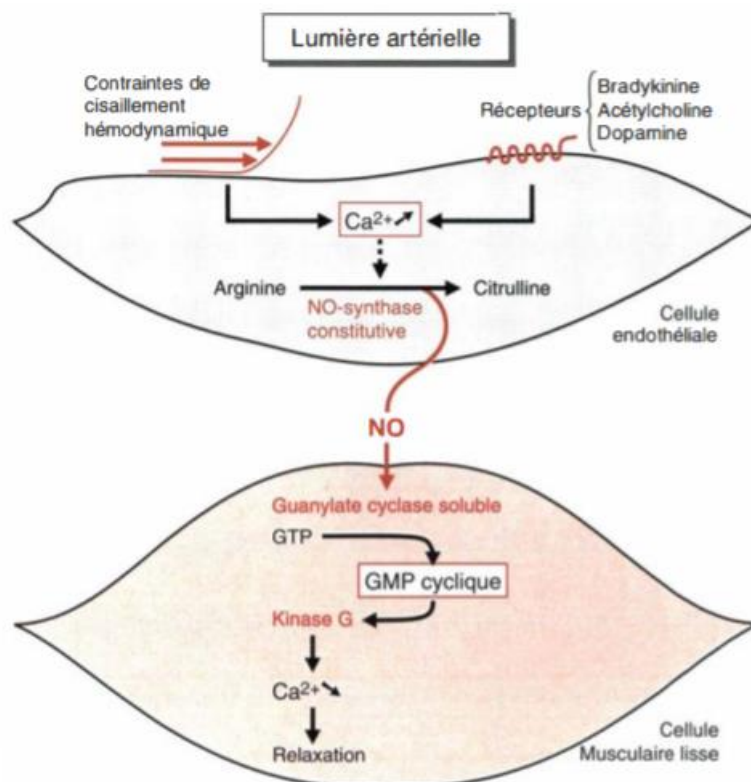
Ces phénomènes favorisent le passage de monocytes à travers l'endothélium qui peuvent ainsi atteindre les sites tissulaires inflammés. Néanmoins, lorsque l'inflammation devient chronique, ils peuvent avoir des conséquences délétères sur l'endothélium et la paroi vasculaire.

L'intégrité de la barrière endothéliale est donc déterminée non seulement par les forces d'adhérence qui couplent les cellules endothéliales entre elles et à la matrice extracellulaire mais également par la forme des cellules endothéliales.

### II.2.1.2. Contrôle du tonus vasculaire

Les cellules endothéliales ont la capacité de contrôler le tonus des cellules musculaires lisses sous-jacentes et d'agir sur la vasomotricité artérielle, par la production et la sécrétion de facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs (Mallat *et al.*, 2017).

Les facteurs vasodilatateurs comprennent la prostacycline (PGI<sub>2</sub>), la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), le facteur hyperpolarisant (EDHF) et le monoxyde d'azote (NO). Le NO est généré par une enzyme, la NO synthase (eNOS dans l'endothélium) qui utilise comme substrats la L-arginine, l'oxygène et la NADPH pour aboutir à la formation du NO et de L-citrulline. Les deux co-facteurs clés pour son activité sont le calcium et la tétrahydrobioptérine. Une fois produit, le NO diffuse de l'endothélium vers les cellules musculaires lisses où il stimule la guanylate cyclase soluble (GC), entraînant la formation accrue de GMP cyclique (GMPc) qui lie et active la protéine kinase G (PKG). Cela entraîne une cascade de phosphorylation des protéines impliquées dans la mobilisation du calcium et des enzymes inhibant la contraction musculaire, notamment les phosphatases de la chaîne de myosine. Cela aboutit ainsi à la relaxation des cellules musculaires lisses et à la vasodilatation du vaisseau sanguin (Ghimire *et al.*, 2017) (**Figure 7**).



**FIGURE 7 : VOIE DE SIGNALISATION DU NO ENTRAINANT LA VASODILATATION DES VAISSEAUX SANGUINS.**

*D'après Michel et Arnal, 1993.*

Ce phénomène de vasodilatation est constamment opposé aux facteurs vasoconstricteurs sécrétés par l'endothélium tel que le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou encore l'endothéline 1 (ET-1) qui est l'un des plus puissants vasoconstricteurs identifiés.

Tous ces facteurs agissent directement sur les cellules musculaires lisses mais ils peuvent également interagir avec les cellules sanguines telles que les plaquettes. C'est l'équilibre entre ces différents facteurs (vasodilatateurs et vasoconstricteurs) qui permet de maintenir un équilibre du tonus vasculaire.

### II.2.1.3. Contrôle de la réponse inflammatoire

L'endothélium est également un puissant régulateur de la réponse inflammatoire. En condition inflammatoire, les cellules du système immunitaire sécrètent des cytokines telles que le TNF $\alpha$  ou encore l'IL-1 $\beta$ . Ces dernières sont détectées par l'endothélium qui, en retour, augmente l'expression de molécules d'adhérence (ICAM, VCAM, Sélectine-E) et de chimiokines telles que MCP-1 (CCL2) (Michiels, 2003; Félétou, 2011). Ce mécanisme favorise le recrutement des leucocytes au niveau des sites inflammatoires.

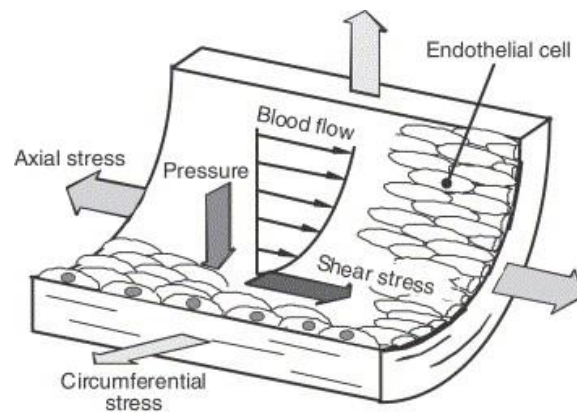
Le recrutement leucocytaire débute par le roulement (*rolling*) des leucocytes à la surface endothéliale. Les sélectines et les chimiokines endothéliales jouent un rôle capital dans ce phénomène (Bullard *et al.*, 1996; Ley *et al.*, 2007; Nourshargh and Alon, 2014). L'adhérence ferme des leucocytes à l'endothélium est un prérequis indispensable à leur diapédèse et les intégrines qu'ils expriment permettent cette interaction forte avec les *Cell Adhesion Molecules* endothéliales (notamment ICAM-1 et VCAM-1) (Ley *et al.*, 2007; Nourshargh and Alon, 2014). Le passage des leucocytes à travers l'endothélium par transmigration para- et transcellulaire fait également intervenir les intégrines (Ley *et al.*, 2007; Nourshargh and Alon, 2014). La transmigration paracellulaire est favorisée par des molécules localisées dans les jonctions cellulaires, la VE-cadhérine notamment.

### II.2.2. Forces de cisaillement

De manière physiologique, les cellules endothéliales sont constamment soumises à des forces hémodynamiques qui participent également au maintien de l'homéostasie.

Trois forces sont générées à la surface des cellules endothéliales : la pression hydrostatique (perpendiculaire au flux), la déformation périodique (liée aux pulsations cardiaques et aux variations de diamètre des vaisseaux) et la contrainte de cisaillement (générée par le flux sanguin) (Ohashi and Sato, 2005) à laquelle nous nous intéresserons plus particulièrement (**Figure 8**).





**FIGURE 8 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DIFFÉRENTES FORCES EXERCÉES À LA SURFACE ENDOTHÉLIALE.**

*D'après Ohashi et Masaaki, 2005.*

Les forces de cisaillement correspondent aux forces frictionnelles exercées par le flux sanguin à la surface des cellules endothéliales. Cette force tangentielle se mesure en dynes par centimètre carré ( $\text{dyn.cm}^2$ ) et est déterminée par le débit sanguin, la viscosité du sang ainsi que le diamètre du vaisseau sanguin. Elle est définie par la formule suivante :

$$\tau = \frac{4 \times Q \times \mu}{\pi \times r^3}$$

$\tau$  correspond à la force de cisaillement

$Q$  correspond au débit du flux sanguin

$\mu$  correspond à la viscosité du sang

$r$  correspond au rayon interne du vaisseau

En fonction du type de vaisseaux, les valeurs des forces de cisaillement sont extrêmement variables. Elles peuvent varier de  $1 \text{ dyn.cm}^2$  dans les veines, de  $10$  à  $40 \text{ dyn.cm}^2$  dans les artères (Resnick *et al.*, 2003) pour atteindre  $60$  à  $80 \text{ dyn.cm}^2$  dans les artérioles (Ballermann *et al.*, 1998).

Le flux sanguin peut être laminaire ou turbulent en fonction de la géométrie des vaisseaux. La nature pulsatile du flux sanguin, combinée à la configuration géométrique des vaisseaux, détermine différents types de forces de cisaillement, caractérisées par leur direction et leur amplitude :

- Les forces de cisaillement laminaires, retrouvées dans les artères saines et caractérisées par un flux laminaire et unidirectionnel.

- Les forces de cisaillement faibles, retrouvées généralement au niveau des zones de courbure. Elles résultent d'un flux turbulent et multidirectionnel.
- Les forces de cisaillement oscillatoires, retrouvées principalement au niveau des bifurcations artérielles et des ostiums. Elles sont caractérisées par des changements importants de direction du flux (deux directions majeures). Ces forces de cisaillement sont souvent très faibles, proches de 0.

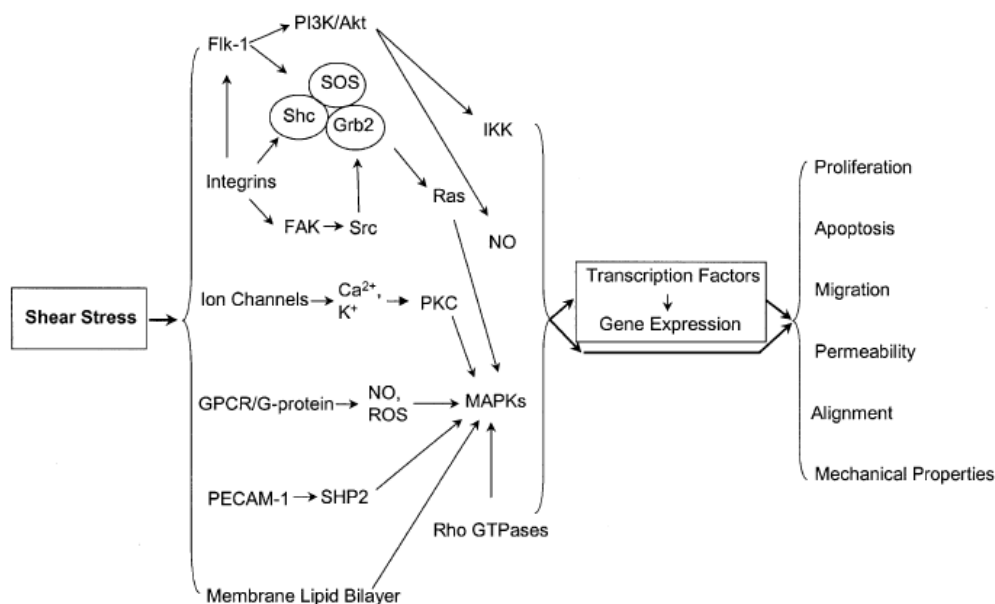
La surface des cellules endothéliales présente un nombre important de mécanorécepteurs, capables de détecter les variations de forces de cisaillement et d'établir une réponse appropriée à ces changements. Parmi eux, nous pouvons citer les intégrines, les récepteurs tyrosine-kinase, les protéines G et récepteurs couplés aux protéines G ou encore les protéines de jonctions cellulaires (Resnick *et al.*, 2003; Li, Haga and Chien, 2005; Zhou, Li and Chien, 2014; Chistiakov, Orekhov and Bobryshev, 2017). Nous pouvons aussi mentionner des canaux ioniques parmi lesquels des canaux de la famille des TRP.

En condition physiologique, les forces de cisaillement laminaires activent notamment la voie PI3K/Akt qui entraîne la production de NO par l'endothélium. En effet, la voie PI3K/Akt entraîne une phosphorylation de la eNOS menant à son activation et à la production de NO, délivré par la suite aux cellules musculaires lisses où il active la protéine kinase G. Une élévation des forces de cisaillement laminaires favorise ainsi une relaxation endothélium-dépendante des cellules musculaires lisses et, par conséquent, une modulation du tonus vasculaire (Dimmeler *et al.*, 1998; Boo *et al.*, 2002; Li, Haga and Chien, 2005; Chistiakov, Orekhov and Bobryshev, 2017).

Les forces de cisaillement agissent également sur la morphologie des cellules endothéliales grâce à la relation étroite entre mécanorécepteurs et cytosquelette d'actine. Par exemple, l'activation de la voie RAS/MAPK par les intégrines en réponse aux forces de cisaillement induit un remodelage des filaments d'actine et des microtubules dans le sens du flux et donc une élévation et un alignement des cellules dans ce même sens (Lehoux and Tedgui, 2004).

Les voies de signalisation déclenchées par les forces de cisaillement conduisent à la phosphorylation de nombreux facteurs de transcription. Ces derniers se lient aux éléments de réponse aux forces de cisaillement appelés *Shear Stress Response Elements* (SSRE), que l'on trouve dans les promoteurs de gènes codant pour des facteurs de croissance, des molécules d'adhérence, des substances vasomotrices ou encore des facteurs de coagulation (Li, Haga and Chien, 2005). Ces modifications influent également le remodelage du cytosquelette, la réponse au stress oxydatif, la sécrétion, la prolifération, la migration, l'apoptose des cellules endothéliales ainsi que toutes les propriétés de l'endothélium mentionnées précédemment. Elles permettent ainsi le maintien de la fonction

endothéliale et de l'homéostasie vasculaire (Li, Haga and Chien, 2005) (**Figures 9 et 10A**).



**FIGURE 9 : RÉSUMÉ SCHÉMATIQUE DES RÉPONSES ENDOTHÉLIALES MISES EN PLACE SUITE À LEUR EXPOSITION À DES FORCES DE CISAILLEMENT LAMINAIRES.**

*D'après Li, Haga et Chien, 2005.*

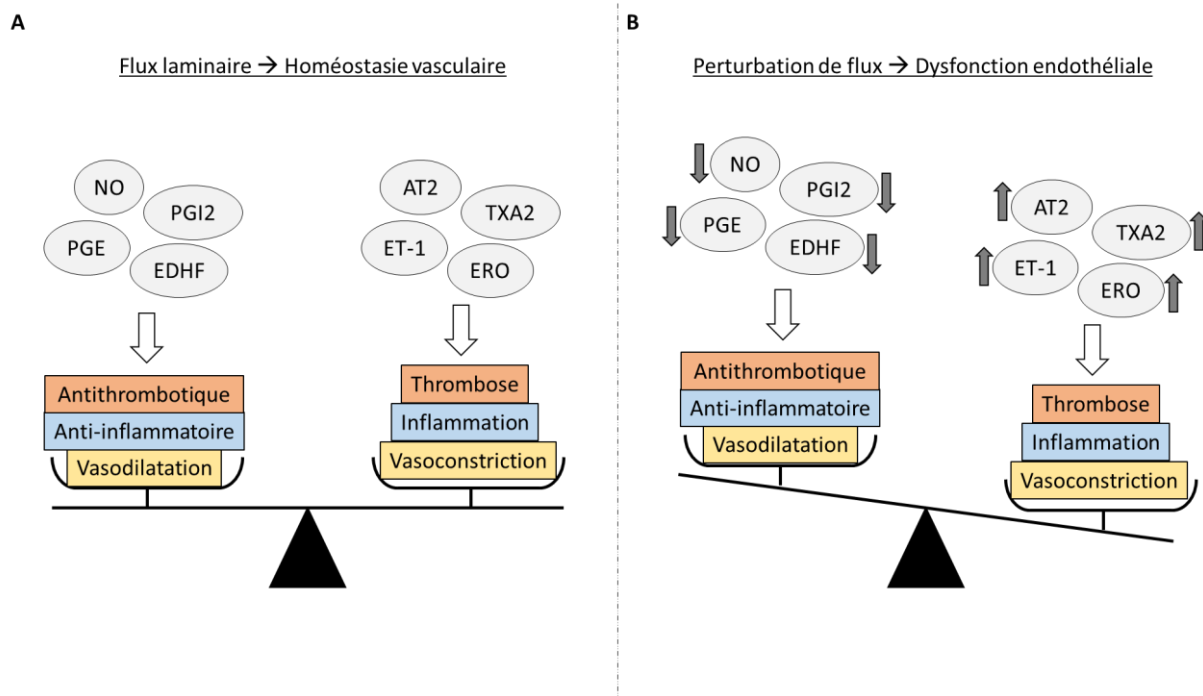
### II.2.2.1. Impact des modifications des forces de cisaillement sur la fonction endothéliale

Comme nous venons de le voir, l'endothélium est capable de maintenir un équilibre entre les facteurs vasodilatateurs, anti-inflammatoires et antithrombotiques d'un côté et les facteurs vasoconstricteurs, inflammatoires et thrombotiques de l'autre (**Figure 10A**).

La perturbation des forces de cisaillement, qu'elles deviennent faibles ou oscillatoires par exemple, peut déséquilibrer cette homéostasie vasculaire. En effet, une baisse des forces de cisaillement entraîne la diminution de la production de NO et de PGI<sub>2</sub> et l'augmentation de ET-1, des espèces réactives de l'oxygène et de la perméabilité endothéliale (Chistiakov, Orekhov and Bobryshev, 2017). Elle peut également favoriser des voies intracellulaires pro-inflammatoires via l'activation du facteur de transcription NF-κB (Chistiakov, Orekhov and Bobryshev, 2017).

Ces perturbations de l'homéostasie font alors pencher la balance en faveur d'un phénotype vasoconstricteur, pro-inflammatoire et prothrombotique, caractéristique de la dysfonction endothéliale (**Figure 10B**) (Gevaert *et al.*, 2017). Cette dysfonction ainsi engendrée est étroitement

associée à différentes pathologies telles que l'athérosclérose (Davignon Jean and Ganz Peter, 2004) ou l'insuffisance cardiaque (Gevaert *et al.*, 2017).

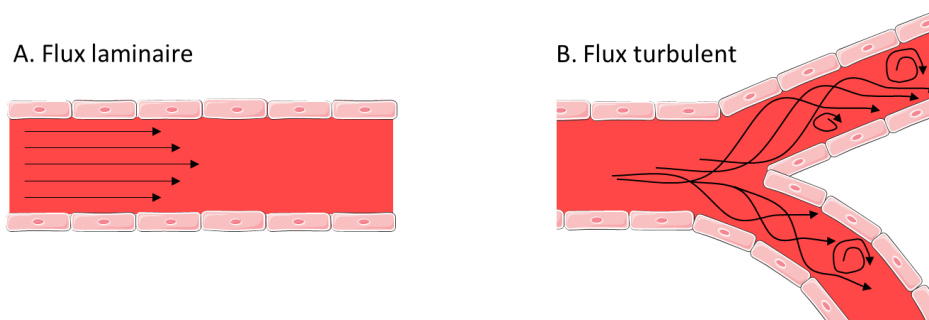


**FIGURE 10** : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES CONSÉQUENCES D'UN FLUX LAMINAIRE (A) ET D'UN FLUX PERTURBÉ (B) SUR LA FONCTION ENDOTHÉLIALE.

*Inspiré de Gevaert et al, 2017.*

### II.2.2.2. Hétérogénéité thermique liée à la morphologie du vaisseau

Les vaisseaux sanguins non ramifiés permettent un écoulement laminaire du sang, ce qui signifie que les lignes de courant des particules du sang sont parallèles (**Figure 11A**). Dans un tel flux, la vitesse de ces particules est maximale au centre du vaisseau (Najmi and Irtiza Ali Shah, no date). Les forces de cisaillement ralentissent le flux et c'est pourquoi la vitesse des particules diminue lorsque l'on se rapproche de la paroi vasculaire. Cependant, les vaisseaux sanguins présentent de multiples géométries, certaines très complexes, pouvant entraîner des perturbations hémodynamiques. C'est le cas au niveau des ramifications, des bifurcations, des courbures ou encore des ostiums. Ces régions particulières sont associées à des régimes d'écoulement sanguin pouvant être très turbulents (Jamali and Ismail, 2019). A l'inverse du régime laminaire, l'écoulement turbulent est caractérisé par un mouvement irrégulier des particules du sang au sein du vaisseau (**Figure 11B**). La vitesse de ces particules est souvent élevée et subit continuellement des changements d'amplitude et de direction.



**FIGURE 11** : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE D'UN FLUX LAMINAIRE (A) ET D'UN FLUX TURBULENT (B) AU SEIN D'UN VAISSEAU SANGUIN.

D'après <https://smart.servier.com/>

De nombreuses études se sont intéressées à ces régions spécifiques, montrant que les perturbations hémodynamiques peuvent avoir des conséquences sur la répartition thermique. Ainsi, à l'hétérogénéité thermique que l'on peut observer le long de l'arbre vasculaire (d'un organe à un autre ou du noyau à la périphérie) peut s'ajouter une hétérogénéité thermique locale qui relève de la géométrie des vaisseaux et des régimes hémodynamiques associés.

En effet, les perturbations de flux entraînent des recirculations du sang et la formation de « tourbillons » au sein du vaisseau, provoquant ainsi la perte d'une grande quantité d'énergie cinétique (Uetz and Föhl, 1978). Ceci augmente localement la fréquence des collisions entre les éléments figurés du sang, les protéines plasmatiques et la paroi vasculaire (Welty, 2008). Ainsi, en vertu de la loi de conservation de l'énergie dans un système fermé comme l'est notre système vasculaire, l'énergie cinétique a été convertie en une autre énergie : l'énergie thermique. Les forces de friction entre le sang et l'endothélium sont responsables de cette conversion d'énergie. Une quantité significative de chaleur va ainsi pouvoir être produite localement et pourra être dissipée, par la suite, à travers le vaisseau et les tissus (Amiri and Khonsari, 2010). Ces considérations théoriques ont été élaborées par plusieurs études qui ont montré qu'une perturbation hémodynamique peut augmenter le transfert thermique entre le sang et la paroi vasculaire (Wei and Luo, 2003; Attia *et al.*, 2012), moduler localement la dissipation de la chaleur (Diamantopoulos *et al.*, 2003; Stefanadis *et al.*, 2003) et entraîner une modification locale de la température au sein de la paroi vasculaire (Diamantopoulos *et al.*, 2003).

Ces données, appuyées par des modèles mathématiques *in silico*, suggèrent une élévation locale de la température au sein des segments vasculaires complexes (Ley and Kim, 2007). De plus, elles soulignent

l'importance du flux sanguin et de son schéma d'écoulement dans la modulation locale de la température.

Comme mentionné plus haut, des températures augmentées ont été enregistrées dans les lésions vasculaires athéromateuses et ont été attribuées à l'activité métabolique des cellules immunitaires infiltrées dans ces lésions (Casscells *et al.*, 1996; Madjid *et al.*, 2002; Verheye *et al.*, 2002). Cependant, cette élévation de température pourrait être liée à la thermogenèse dépendante du régime d'écoulement puisque les plaques d'athérome se développent préférentiellement au niveau des bifurcations artérielles où le flux sanguin est perturbé (Verheye *et al.*, 2002; Ley and Kim, 2007).

### **II.2.3. Cellules endothéliales et température**

Les cellules endothéliales sont des cellules très importantes pour le maintien de l'homéostasie vasculaire et peuvent être soumises à des variations thermiques significatives. En effet, en étant directement en contact avec le sang, elles sont parmi les premières à être soumises aux diverses variations thermiques du compartiment sanguin. Cependant, l'impact qu'exerce la température sur leur fonctionnement n'a pas été analysé de façon détaillée.

Les cellules endothéliales expriment une vingtaine de TRP à leur surface, dont certains sont des thermo-TRP (Sullivan and Earley, 2013). Elles ont donc la capacité de percevoir les variations thermiques et d'y répondre. Les thermo-TRP peuvent moduler le fonctionnement des cellules endothéliales en agissant sur l'angiogenèse, la vasodilatation dépendante de l'endothélium mais aussi la perméabilité endothéliale (Earley and Brayden, 2015). En parallèle, certaines études ont montré que la chaleur augmente la perméabilité endothéliale à l'eau (Garrick, Ryan and Chinard, 1988) et aux LDL (Ghosn *et al.*, 2009) et que la température module l'efficacité du système immunitaire (Evans, Repasky and Fisher, 2015; Garami, Steiner and Romanovsky, 2018). Cependant, ces études ont pour la plupart été réalisées avec des lignées et à des plages de température bien supérieures aux plages physiologiques (Xu *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1999; Sawaji *et al.*, 2002).

Pour mieux comprendre les modifications possibles au sein des vaisseaux et les phases les plus précoces du développement de certaines pathologies, il nous semblait donc important de s'intéresser à l'impact des variations thermiques sur des cellules endothéliales primaires, en se plaçant dans des plages de températures physiologiques.

# OBJECTIFS

## OBJECTIFS

---

Nous avons choisi de travailler sur des cellules endothéliales primaires issues d'artères coronaires humaines (HCAEC, *Human Coronary Artery Endothelial Cells*). Ces cellules sont situées dans des régions vasculaires à géométrie complexe, qui sont fréquemment lésées et où le flux est perturbé, contribuant au développement des pathologies coronaires.

Nous avons effectué un travail *in vitro* dans le but de contrôler précisément les niveaux de température des cellules endothéliales. Cependant, ces cellules étant constamment soumises à des forces de cisaillement, des expériences en condition de flux ont été réalisées afin de valider nos observations dans des conditions proches des conditions physiologiques. Nous n'avons pas d'informations concernant l'effet de la température sur les HCAEC. Notre approche première a donc été d'analyser le transcriptome des cellules endothéliales en réponse à des variations de températures physiologiques (37°C versus 40°C). De manière inattendue, nous avons constaté que de très nombreux gènes étaient sur- ou sous-exprimés en réponse à l'augmentation de température. L'analyse de ces réseaux de gènes modulés nous a permis d'identifier les voies de signalisation mises en jeu au sein de la cellule endothéliale en réponse à une hyperthermie physiologique.

Dans un second temps, nous avons approfondi le rôle de ces voies de transduction. Des stratégies d'inhibition ciblant des éléments spécifiques à chaque voie nous ont permis d'affecter à chacune d'elle, les groupes de gènes régulés.

Ces deux premiers volets ont révélé le fait que la cellule réagissait de façon différente à 37°C et à 40°C. Dans un dernier temps, nous avons donc voulu déterminer si la température altérait les principales fonctions de l'endothélium. Pour cela, son intégrité à 37°C et à 40°C a été évaluée par différents tests fonctionnels.

Les trois premiers volets ont démontré que l'endothélium change profondément sa biologie lorsqu'on le soumet à une hyperthermie modérée telle que celle qui peut être observée lors des redistributions thermiques systémiques, lors des épisodes fébriles et inflammatoires, ou encore au sein de segments artériels à géométrie complexe. C'est dans ce dernier contexte que nous avons tenté d'apporter des perspectives aux résultats acquis. Nous avons tenté de mettre en place des dispositifs expérimentaux permettant de documenter l'élévation thermique en relation avec la perturbation des forces de cisaillement et l'acquisition de propriétés biologiques par l'endothélium. Ces travaux préliminaires ouvrent des perspectives importantes sur le rôle de la température dans les pathologies vasculaires.



# **MATÉRIELS ET MÉTHODES**

# MATÉRIELS ET MÉTHODES

## I. Culture cellulaire

Au cours de ce projet et en fonction des expériences réalisées, différents types cellulaires ont été utilisés : les HCAEC, les Telo-HAEC (*Human Aortic Endothelial Cells*) et les THP-1 DsRed. Pour une compréhension globale des expériences, chacun d'eux sera présenté ainsi que leurs conditions de culture associées.

### I.1. Caractéristiques des cellules

#### I.1.1. Les HCAEC

Les cellules endothéliales issues d'artères coronaires humaines (HCAEC) sont des cellules primaires commercialisées par Lonza (Ref. CC-2585). Ce sont des cellules adhérentes, à la morphologie arrondie et qui se multiplient en amas cellulaires. Ces cellules sont reçues à passage 3 et cultivées jusqu'à passage 7 afin de minimiser les effets de leur dérive phénotypique. Les expressions de la protéine CD31 et du facteur de Von Willebrand VIII ont été utilisées comme marqueur de spécificité. Différents donneurs d'HCAEC, dont les caractéristiques sont répertoriées dans le **Tableau 2**, ont été utilisés.

N°Lot HCAEC	Données du donneur					Efficacité d'ensemencement (en %)	Viabilité (en %)	Temps de doublement (en heures)
	Age (en années)	Sexe	OE	Prise d'alcool	Fumeur			
578213	51	F	H	Oui	Oui	41	91	18
584777	65	F	A	Oui	Oui	51	97	19
601559	51	M	C	Oui	Oui	43	93	22
18TL099144	54	M	C	Oui	Oui	54	91	30
18TL165227	55	F	H	Non	Non	80	91	46

**TABLEAU 2 : CARACTÉRISTIQUES DES DIFFÉRENTS DONNEURS D'HCAEC UTILISÉS.**

*Sexe* : F, Féminin. M, Masculin. *Origine ethnique (OE)* : A, Afro-américain noir. C, Caucasiens. H, Hispanique.

### I.1.2. Les Telo-HAEC

Les Telo-HAEC (Ref. CRL-4052, ATCC®) sont des cellules endothéliales issues d'aortes humaines, immortalisées par l'expression stable de la sous unité catalytique hTERT de la télomérase humaine. Ces cellules sont issues d'un donneur unique, reçues en tant que lignée cellulaire clonale et ne subissent pas d'arrêt du cycle cellulaire avec les passages. Cependant, pour toutes les expériences réalisées, elles n'ont pas été utilisées au-delà du passage 20. Ce sont des cellules adhérentes, ayant une morphologie semblable à celle des HCAEC avec des caractéristiques de cellules endothéliales primaires telles que l'expression du marqueur CD31 et l'absorption fonctionnelle de LDL-BODIPY.

### I.1.3. Les THP-1 DsRed

Les THP-1 (Ref. TIB-202™, ATCC®) constituent une lignée monocytaire humaine provenant du sang d'un patient atteint d'une leucémie monocytaire aiguë. Ces cellules se développent en suspension, ont une morphologie circulaire et se multiplient très rapidement.

Elles ont été transduites, de manière stable, avec le lentivirus « Incucyte® NuLight Red » (Ref. 4476, Essen BioScience®) de façon à ce que leurs noyaux soient marqués en rouge. En effet, les THP-1 transduites (THP-1 DsRed) expriment, de manière constitutive et nucléaire, la protéine mKate2. Cela facilite leur visualisation et les mesures en temps réel du nombre de cellules lors des expériences.

## I.2. Conditions de culture cellulaire

Ces trois types cellulaires ont été cultivés sous atmosphère humide, à 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C dans des milieux de culture spécifiques détaillés dans le **Tableau 3**.

Type cellulaire	Milieu complet	Milieu basal	Compléments ajoutés au milieu basal	Antibiotiques	Flasques de culture
<b>HCAEC</b>	EGM-2 MV (Ref. CC-3202, Lonza®)	EBM-2 (Ref. CC-3156, Lonza®)	EGM-2 MV Microvascular Endothelial SingleQuots™ Kit (Ref. CC-4147, Lonza®) : <ul style="list-style-type: none"> <li>• 5% de SVF</li> <li>• 0.04% d'hydrocortisone</li> <li>• 0.4% de hFGF-B</li> <li>• 0.1% de VEGF</li> <li>• 0.1% de R3-IGF-1</li> <li>• 0.1% d'acide ascorbique</li> <li>• 0.1% de hEGF</li> <li>• 0.1% de gentamycine et amphotericine-B</li> </ul>	0,5% d'antibiotiques/anti mycotiques (Ref. 15240096, Gibco®)	75 cm <sup>2</sup> coatées au collagène I (Ref. 354485, Corning®).
<b>Telo-HAEC</b>	« Endothelial Cell Growth Kit-VEGF » (Ref. PCS-100-041, ATCC®)	« Vascular Cell Basal Medium » (Ref. PCS-100-030, ATCC®)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2% de SVF</li> <li>• 1 µg/mL d'hémisuccinate d'hydrocortisone</li> <li>• 5 ng/mL de rhFGF-B</li> <li>• 5 ng/mL de rhVEGF</li> <li>• 15 ng/mL de rhIGF-1</li> <li>• 50 µg/mL d'acide ascorbique</li> <li>• 5 ng/mL de rhEGF</li> <li>• 10 mM de L-glutamine</li> <li>• 0.75 unités/mL d'héparine sulfate</li> </ul>	0,5% d'antibiotiques/anti mycotiques (Ref. 15240096, Gibco®)	150 cm <sup>2</sup>
<b>THP-1 DsRed</b>	RPMI 1640 + 10% SVF	RPMI 1640 (Ref. 11875093, Gibco®)	10% de SVF (Ref. 10082139, Gibco®).	0.5 µg/mL de puromycine (Ref. A1113803, Gibco®)	250 cm <sup>2</sup>

**TABLEAU 3 : MILIEUX DE CULTURE UTILISÉS POUR CHAQUE TYPE CELLULAIRE.**

### 1.3. Conditions d'amplification cellulaire

Concernant les HCAEC, le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours et les cellules sont repiquées une fois par semaine, lorsqu'elles ont atteint 85 à 95% de confluence. Pour cela, les cellules sont rincées à deux reprises avec du PBS 1X afin d'éliminer toute trace de sérum puis le détachement du tapis cellulaire est réalisé avec de la trypsine/EDTA 0.05% (Ref. 25300054, Gibco®). La trypsine est ensuite neutralisée par dilution dans du milieu de culture complet puis la suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 minutes à 250g. Le culot cellulaire est repris dans du milieu de culture complet et les cellules sont dénombrées par l'appareil Countess II (Ref. A27977, Applied Biosystems®), après dilution au demi dans du bleu trypan. Elles sont ensuiteensemencées dans un support et à une densité cellulaire appropriés en fonction de l'expérience réalisée.

Concernant les Telo-HAEC, le renouvellement du milieu de culture et le repiquage sont réalisés de la même manière que pour les HCAEC.

Enfin, concernant les THP-1 DsRed, elles sont repiquées lorsqu'elles dépassent les 20 millions de cellules. Pour cela, elles sont centrifugées pendant 5 minutes à 250g. Le culot cellulaire est ensuite repris dans du milieu de culture complet et les cellules sont dénombrées afin d'être à nouveauensemencées à la densité voulue selon l'expérience effectuée.

## **I.4. La culture cellulaire en condition de flux**

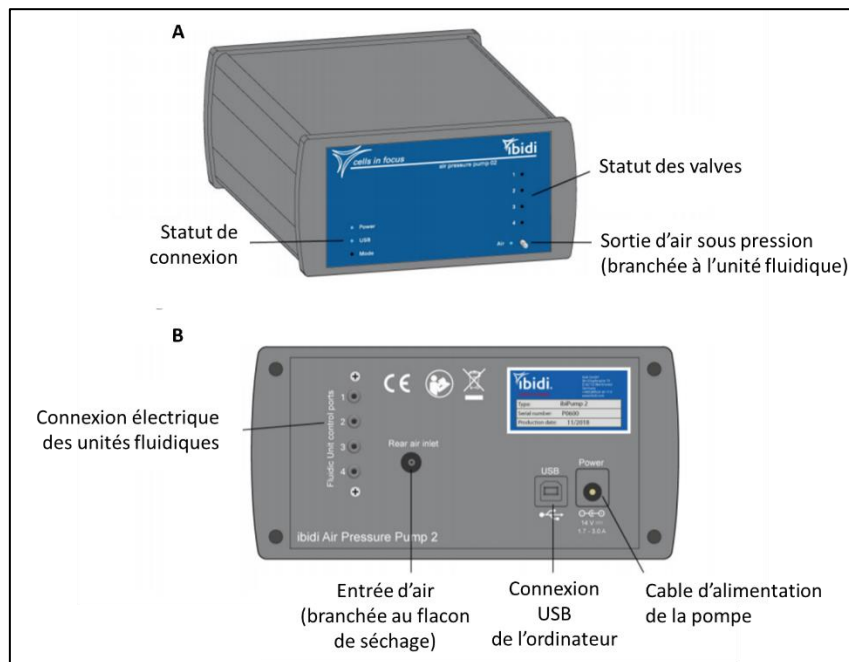
De manière physiologique, les cellules endothéliales sont soumises à un flux sanguin constant et unidirectionnel qui crée, à la surface des cellules, une force mécanique appelée contrainte de cisaillement. En condition statique, cette contrainte de cisaillement est nulle. Afin de placer les cellules endothéliales dans un environnement mécanique proche de leurs conditions physiologiques, le système de pompe Ibidi® (Ref. 10902, Ibidi®) a été utilisé dans certaines expériences.

### **I.4.1. Le système de pompe Ibidi®**

Ce système permet de cultiver les cellules en condition de flux et présente de nombreux avantages. Tout d'abord, le flux peut être maintenu pendant plusieurs semaines, permettant de réaliser des études à plus ou moins long terme. De plus, le débit du fluide ainsi que la contrainte de cisaillement appliquée à la surface des cellules peuvent être finement contrôlés. Enfin, plusieurs types de flux peuvent être imposés (laminaire, oscillatoire, etc.) et plusieurs applications sont possibles (imagerie pendant le flux, immunomarquage, western blot, RT-qPCR, etc.).

Ce système est constitué de différents composants ayant chacun un rôle bien précis pour la culture des cellules en flux. Pour une compréhension globale de son fonctionnement, chacun des composants sera présenté.

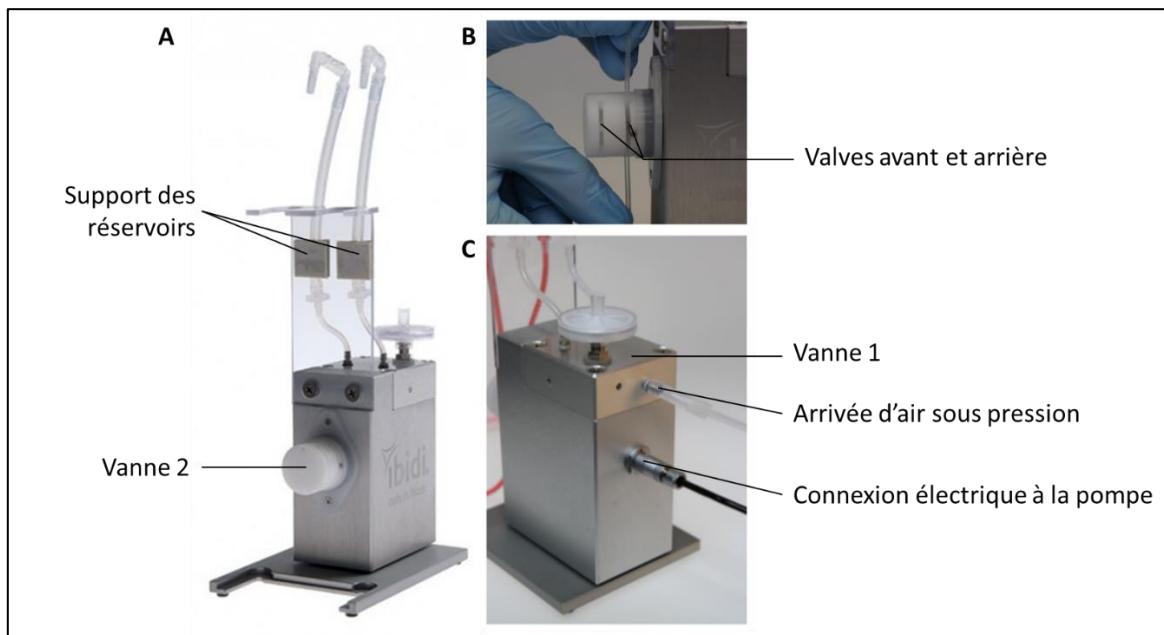
### I.4.1.1. La pompe



**FIGURE 12 : VUES AVANT (A) ET ARRIÈRE (B) DE LA POMPE.**

La pompe (Ref. 10905, ibidi®) est un composant central du système (**Figure 12**), relié à trois autres composants : l'ordinateur, l'unité fluide et le flacon de séchage. Son rôle est capital puisqu'elle permet de générer une pression allant de 5 à 100 mbar. Cette pression permet ainsi d'aspirer l'air présent dans l'incubateur et de l'envoyer au niveau de l'unité fluide afin de déclencher la circulation du fluide. La pompe est également capable de contrôler différents paramètres tels que la direction du flux d'air ou encore le temps de commutation des vannes au niveau des unités fluidiques. Une pompe peut gérer jusqu'à 4 unités fluidiques en parallèle.

### I.4.1.2. L'unité fluïdique



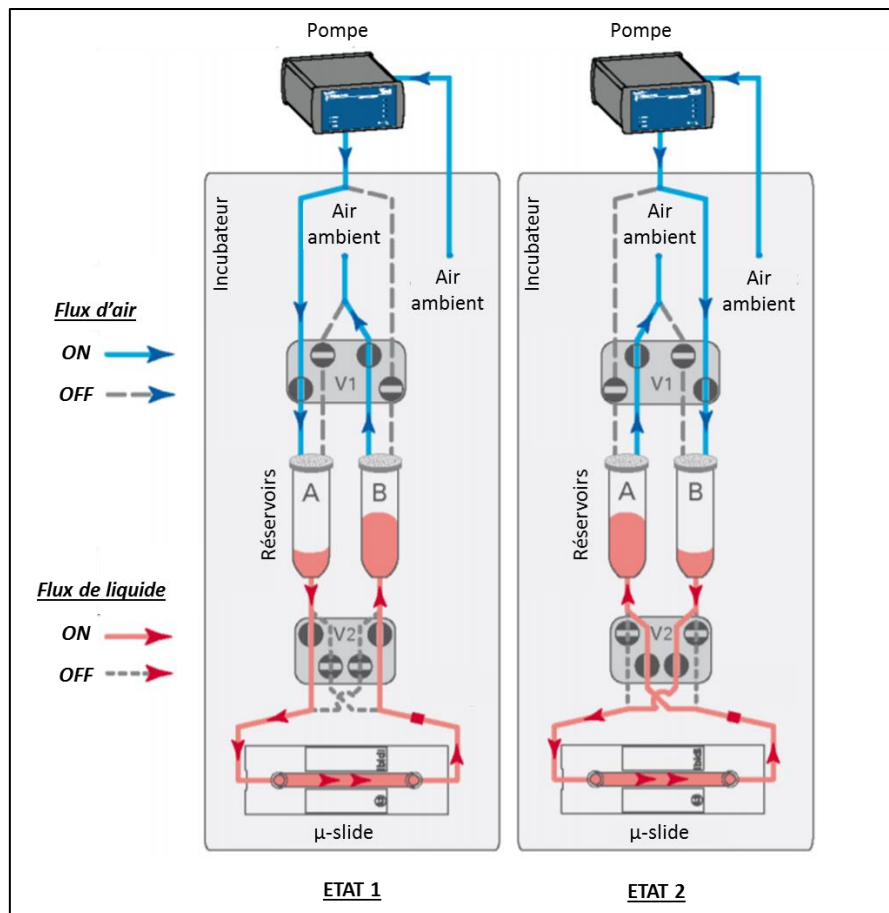
**FIGURE 13** : VUES AVANT (A), DE PROFIL (B) ET ARRIÈRE (C) DE L'UNITÉ FLUIDIQUE.

L'unité fluïdique (Ref. 10903, Ibdidi®) permet de maintenir en place réservoirs, *perfusion set* et *μ-slide*. Elle est constituée de deux vannes de commutation permettant de générer un flux unidirectionnel à la surface des cellules.

La vanne 1 (V1) est localisée à l'arrière de l'unité fluïdique (**Figure 13C**) et permet de guider la pression d'air vers le réservoir droit ou gauche.

La vanne 2 (V2), au contraire, est située sur le devant de l'unité fluïdique (**Figure 13A**). C'est une valve à pincement constituée de 4 fentes (2 avant et 2 arrière) dans lesquelles sont insérées les tubulures des *perfusion set* (**Figure 13B**). Cette vanne est commutée simultanément avec la vanne 1. Ainsi, en fonction de la position de la vanne 1, une barre mobile va être capable de pincer les deux fentes avant ou arrière afin de maintenir un flux unidirectionnel (**Figure 14**).

Cette unité fluïdique est reliée à la pompe par un câble électrique, pour le contrôle des vannes, mais également par un tube, permettant de recevoir l'air préalablement filtré pour rendre possible la circulation du fluïde.



**FIGURE 14 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DES VANNES POUR CRÉER UN FLUX UNIDIRECTIONNEL.**

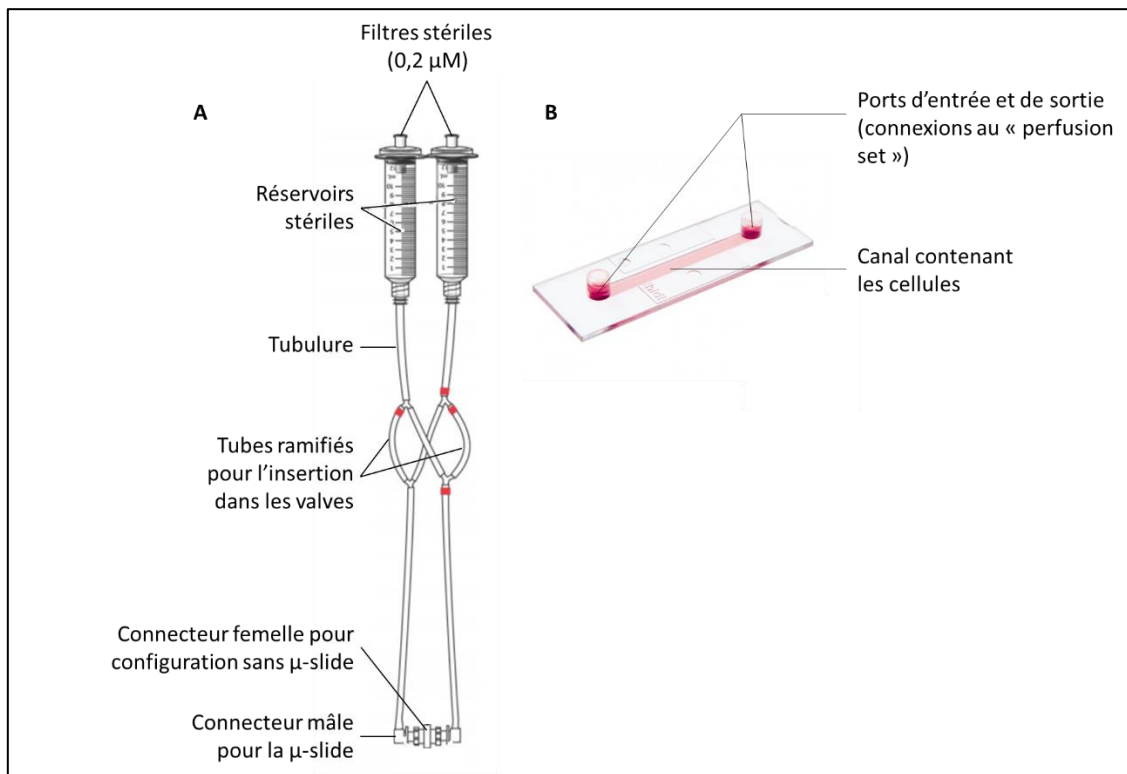
La capacité des réservoirs n'étant pas infinie, les vannes sont indispensables afin de passer d'un état 1 à un état 2 et de maintenir un flux unidirectionnel.

État 1 : La vanne 1 permet d'envoyer l'air dans le réservoir A et de pousser le liquide situé à l'intérieur. Ce liquide est donc mis en mouvement et circule à la surface des cellules de la gauche vers la droite pour remonter dans le réservoir B.

État 2 : Après commutation des vannes 1 et 2, la vanne 1 permet d'envoyer l'air dans le réservoir B et de pousser le liquide situé à l'intérieur. Ce liquide est ainsi mis en mouvement et circule à la surface des cellules toujours de la gauche vers la droite grâce à la commutation qui s'est établie au niveau de la vanne 2. Le liquide remonte ensuite dans le réservoir A puis la commutation de vanne s'effectue à nouveau pour permettre au système de revenir à l'état 1.



### 1.4.1.3. Perfusion set et $\mu$ -slide



**FIGURE 15 : DESCRIPTION D'UN PERFUSSION SET (A) ET D'UNE  $\mu$ -SLIDE (B).**

Le *perfusion set* est constitué de deux parties. D'une part, les réservoirs avec leur filtre, qui contiennent le liquide à faire circuler et d'autre part, la tubulure qui permet de faire passer ce liquide et qui s'adapte parfaitement à l'unité fluide, notamment au niveau de la connexion avec les valves à pincement (**Figure 15A**). Il existe plusieurs types de *perfusion set* qui varient en fonction de leur diamètre et de leur longueur. Ces *perfusion set* sont connectés à des  $\mu$ -slides.

Les  $\mu$ -slides sont des lames à l'intérieur desquelles des cellules peuvent êtreensemencées et cultivées en condition de flux (**Figure 15B**). Il existe différents types de  $\mu$ -slides qui varient en fonction de la hauteur (0.2 à 0.8 mm) et du nombre de canaux présents (1 à 6) sur la  $\mu$ -slide.

Ainsi, en jouant sur le diamètre du *perfusion set* et sur la hauteur du canal de la  $\mu$ -slide, il est possible d'appliquer différents débits et donc de modifier les contraintes de cisaillement appliquées à la surface des cellules. Si un *perfusion set* à faible diamètre est combiné avec une  $\mu$ -slide ayant une hauteur de canal importante, alors les contraintes de cisaillement appliquées aux cellules seront faibles et inversement.

Pour l'ensemble des expériences réalisées en flux, nous avons utilisé les *perfusion set* ayant un diamètre de 1.6 mm et une longueur de 15 cm (Ref. 10962, Ibidi®) et les  $\mu$ -slides I Luer contenant un canal, avec une hauteur de 0.4 mm et une longueur de 50 mm (Ref. 80176, Ibidi®).

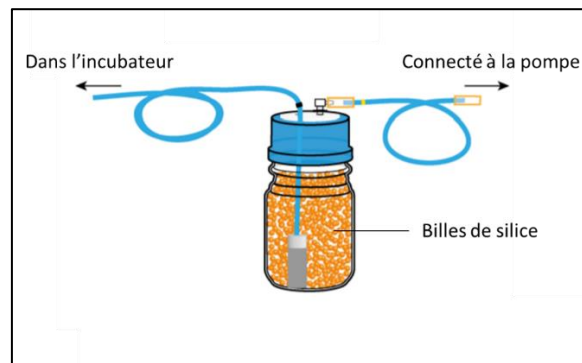
#### I.4.1.4. L'ordinateur et le logiciel de flux



**FIGURE 16** : LOGICIEL DE CONTRÔLE DES POMPES.

La pompe est contrôlée par le logiciel *PumpControl* qui permet de contrôler tous les paramètres de flux afin de se rapprocher au mieux des conditions physiologiques : débit, contraintes de cisaillement, pression, temps de commutation, durée de l'expérience, type de *perfusion set* et type de  $\mu$ -slide (Figure 16).

### I.4.1.5. Le flacon de séchage



**FIGURE 17 : FLACON DE SÉCHAGE.**

Le flacon de séchage est connecté à la pompe mais également à l'intérieur de l'incubateur où il va être capable d'aspirer l'air et de l'envoyer dans la pompe tout en la protégeant de l'humidité de l'incubateur. En effet, ce flacon contient des billes de silice qui vont permettre de capter l'humidité de l'air aspiré avant de le renvoyer dans la pompe (**Figure 17**). Ces billes ont un indicateur orange. Lorsqu'elles deviennent blanches, cela signifie qu'elles sont saturées en humidité et qu'il faut les remplacer.

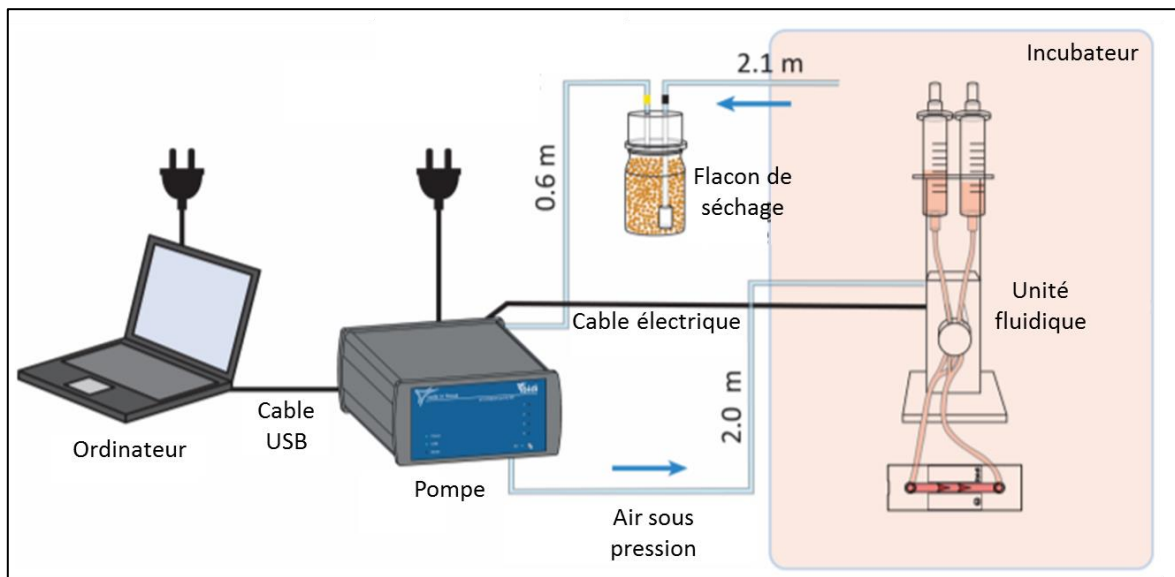
## I.4.2. Les grandes étapes de la culture en flux

### I.4.2.1. Ensemencement des cellules

Afin que les cellules adhèrent correctement aux  $\mu$ -slides, ces dernières sont préalablement coatées avec 100  $\mu$ g/mL de collagène de type I (Ref. A1048301, Gibco®) pendant 30 minutes à température ambiante. Les  $\mu$ -slides sont ensuite rincées trois fois avec du PBS 1X stérile avant d'être totalement vidées de leur contenu.

Par la suite, les cellules (HCAEC ou Telo-HCAEC) sontensemencées dans ces  $\mu$ -slides<sup>10.4</sup> Luer (Ref. 80176, Ibidi®) à raison de 250 000 cellules/ $\mu$ -slide. Elles sont incubées pendant 2h30 en condition statique à 37°C afin qu'elles aient le temps d'adhérer au support avant la mise en place du flux.

### I.4.2.2. Mise en flux



**FIGURE 18 : CONFIGURATION DU SYSTÈME DE POMPE IBIDI.**

La première étape est de réaliser le branchement des différents composants du système de pompe Ibidi®, sans les  $\mu$ -slides. 6 mL de milieu de culture complet sont ajoutés dans chaque réservoir afin que le système soit amorcé, de manière à évacuer les bulles pouvant perturber le flux par la suite.

Une fois le système amorcé et les bulles expulsées, les  $\mu$ -slides sont connectées aux perfusion set et le flux est lancé à l'aide du logiciel (**Figure 18**).

Pour l'ensemble des expériences réalisées, les cellules ont été cultivées en condition de flux laminaire à un débit de  $10 \text{ dyn.cm}^2$ , correspondant aux contraintes de cisaillement retrouvées communément dans les artères (Resnick *et al.*, 2003). Néanmoins, lors du lancement du flux et afin d'éviter tout décollement cellulaire, les cellules ont été, dans un premier temps, soumises à un flux de  $5 \text{ dyn.cm}^2$  pendant 30 minutes avant d'augmenter ce débit à  $10 \text{ dyn.cm}^2$  pour le reste de l'expérience.

### I.4.2.3. Traitement et devenir des cellules

Pour la plupart des expériences effectuées, les cellules ont été cultivées en condition de flux pendant 24h à  $37^\circ\text{C}$  puis elles ont été placées à  $37^\circ\text{C}$  ou à  $40^\circ\text{C}$  pendant 6h.

Après avoir subi un traitement par la température, le flux a été stoppé, les  $\mu$ -slides ont été rincées trois fois avec PBS 1X préchauffé à la bonne température puis des expériences d'immunomarquage, de western blot ou encore de RT-qPCR ont été réalisées.

## II. Étude de l'expression génique

L'effet de la température sur les cellules endothéliales a été étudié par une approche sans à priori, en réalisant des analyses transcriptomiques par *microarray*. Les résultats obtenus ont ensuite été validés par des techniques de TLDA (*Taqman Low Density Array*) et RT-qPCR (*real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*).

### II.1. Étude transcriptomique par *microarray*

#### II.1.1. Principe général

La technique de puce à ADN ou *microarray* permet d'étudier le transcriptome d'une population cellulaire, par l'observation simultanée de l'expression de plusieurs milliers de gènes. Cette technique repose sur le principe d'hybridation, c'est-à-dire sur la capacité de deux fragments d'acides nucléiques à s'associer par la formation de liaisons hydrogènes entre leurs bases complémentaires.

Une puce à ADN est un support physique, divisé en milliers de cases, contenant chacune une séquence d'ADN simple brin appelé « sonde ». Chaque sonde, constituée de 60 paires de bases et complémentaire de la partie 3' du gène, est connue et spécifique d'un seul et unique gène. Néanmoins, plusieurs sondes peuvent correspondre à un même gène. Dans certains cas, des sondes présentes à la surface de la puce à ADN ne codent pour aucun gène car les sondes sont générées à partir de tous les cadres de lecture possibles du génome.

Ces puces à ADN sont ensuite mises au contact d'ARN, extraits à partir d'une population cellulaire donnée et marqués par une molécule fluorescente. L'hybridation entre les oligonucléotides de la puce et les ARN issus de l'échantillon entraîne la formation d'un spot fluorescent localisé spécifiquement sur une position de la puce. Chaque spot reflète ainsi l'expression d'un gène dans la population cellulaire donnée et son intensité est proportionnelle au niveau d'expression du gène.

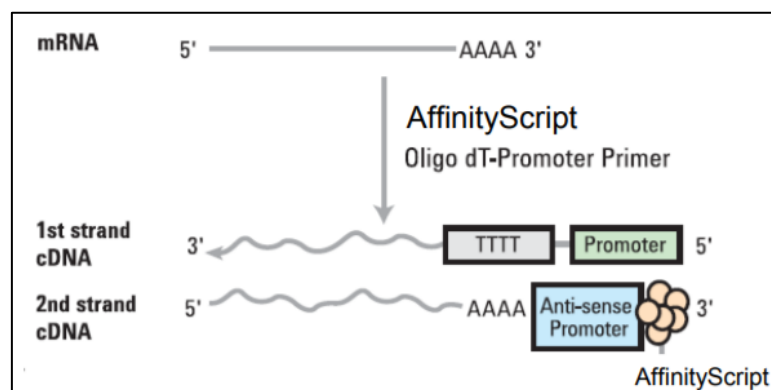
#### II.1.2. Extraction et dosage des ARN

Afin de déterminer l'effet de la température sur le transcriptome des cellules endothéliales, les HCAEC ont tout d'abord étéensemencées dans des plaques 6 puits à raison de 500 000 cellules par puits. Une fois à confluence, les cellules ont été placées à 37°C ou à 40°C pendant 6h, 12h ou 24h. Après chaque incubation, elles ont été rincées avec du PBS 1X préchauffé à la bonne température puis elles ont été lysées avec du QIAzol (Ref. 79306, Quiagen®). Par la suite, du chloroforme a été ajouté aux lysats cellulaires, qui ont ensuite été centrifugés pendant 15 minutes à 12 000g et à 4°C afin de séparer les

débris membranaires (phase organique inférieure), les protéines et l'ADN (interphase) et les ARN (phase aqueuse supérieure). La phase aqueuse a été récupérée puis les ARN totaux ont été extraits de manière automatisée à l'aide du kit miRNEasy Mini (Ref. 217004, Qiagen®) et du QIAcube (Qiagen®), selon les recommandations du fournisseur. Les ARN ont ensuite été dosés et leur concentration ajustée à 50 ng/μL.

### II.1.3. Synthèse d'ADN complémentaires (ADNc)

Les ARN ont ensuite été rétro-transcrits en ADNc double brin (**Figure 19**).



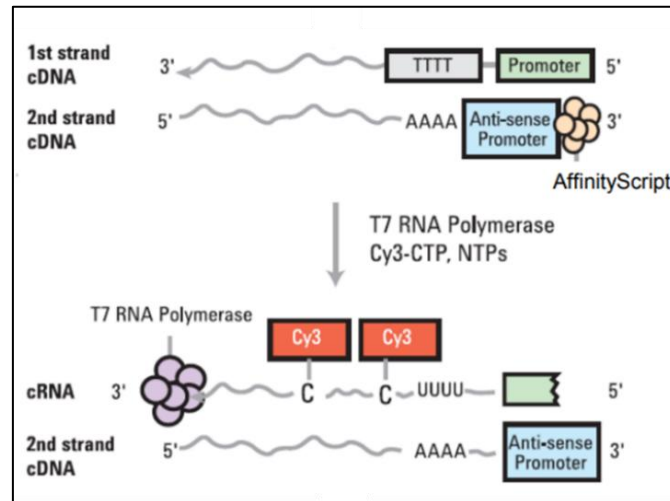
**FIGURE 19 : SYNTHÈSE DES ADNc DOUBLE BRIN À PARTIR DES ARN EXTRAITS.**

Dans un premier temps, les ARN extraits ainsi que des ARN contrôles appelés *spike* ont été incubés à 65°C pendant 10 minutes avec des amorces oligo-dT afin de dénaturer les ARN et permettre l'hybridation des amorces (**Figure 19**). Cette réaction a été stoppée en plaçant les échantillons à 4°C pendant 5 minutes.

Dans un second temps, un mélange réactionnel a été ajouté aux échantillons dénaturés. Ce mélange comprenait 0.1M de DTT, 10 mM de dNTP, du « First Strand Buffer 5X » et l'« Affinity Script RNase Block Mix » qui est un mélange d'enzymes. Le tout a été porté à 40°C pendant 2h pour permettre la synthèse des ADNc (**Figure 19**), à 70°C pendant 15 minutes afin d'inactiver les enzymes présentes dans le mélange puis à 4°C pendant 5 minutes pour stopper totalement la réaction.

### II.1.4. Transcription et marquage des ARN complémentaires

Les ADNc double brin amplifiés ont ensuite été à nouveau transcrits en ARN et marqués, sur leurs nucléotides C, avec le fluorochrome Cyanine 3 (**Figure 20**).



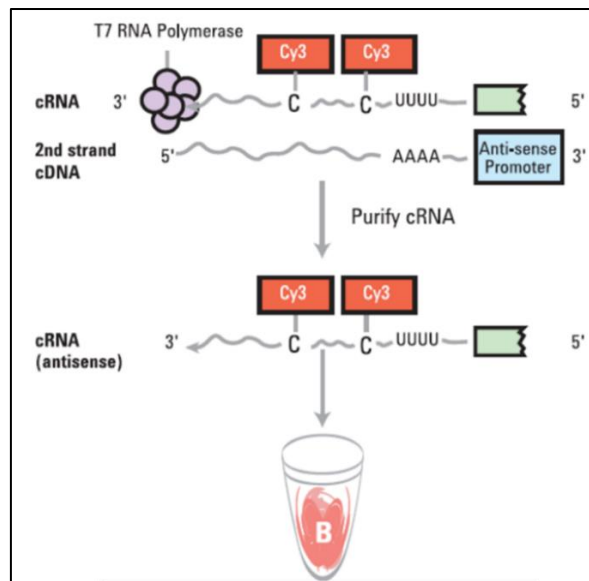
**FIGURE 20 : TRANSCRIPTION DES ADNc DOUBLE BRIN ET MARQUAGE DES ARN GÉNÉRÉS.**

Pour cela, un mélange réactionnel a été préparé et ajouté à chaque échantillon. Ce mélange comprenait de l'eau, le « transcription buffer 5X », 0.1M de DTT, un mélange de NTP, l'enzyme « T7 RNA Polymerase blend » et la cyanine3-CTP. Le tout a été porté à 40°C pendant 2h avant d'être placé à 4°C pour stopper la réaction.

### II.1.5. Purification et quantification des ARN amplifiés

Les ARN ont ensuite été purifiés à l'aide du RNEasy mini kit (Ref. 74014, QIAgen®) (**Figure 21**).

Pour cela, après avoir ajusté les concentrations des ARN amplifiés, du tampon de lyse RLT puis de l'éthanol absolu ont été ajoutés à chaque échantillon. Le tout a été transféré dans une colonne d'extraction et centrifugé à 8 000g pendant 15 secondes. Deux rinçages au tampon RPE ont ensuite été réalisés puis les membranes ont été séchées par centrifugation à 8 000g pendant 1 minute à sec. Les ARN marqués ont été élués avec 30 µL d'eau dépourvue de nucléases (*RNAse et DNase free*). Le marquage a été quantifié au Nanodrop 2000 (Ref. ND-2000, Thermo Scientific®) et la quantité d'ARN a été ajustée à 0.6 µg avant d'être hybridée sur les puces à ADN.



**FIGURE 21 : PURIFICATION DES ARN MARQUÉS.**

### II.1.6. Hybridation

La dernière étape des *microarrays* consiste à hybrider les ARN, amplifiés et marqués, sur les puces à ADN. Dans nos expériences, ce sont les puces « SurePrint G3 Human Gene Expression v3 8x60K Microarray Kit » (Ref. G4851C, Agilent®) qui ont été utilisées, permettant d'hybrider 8 échantillons par puce.

À l'aide du kit « Agilent Gene Expression Hybridization » (Ref. 5188-5242, Agilent®), les ARN ont été tout d'abord fragmentés en plus petits ARN. Pour cela, un mélange réactionnel de fragmentation (10X blocking reagent et 25X fragmentation mix) a été ajouté à chaque échantillon d'ARN amplifié et le tout a été incubé à 60°C pendant 30 minutes. La réaction a été stoppée par ajout de « 2X Hi-RPM Hybridization Buffer » puis les échantillons ont été placés à 4°C.

Du tampon d'hybridation a ensuite été ajouté à chaque échantillon et aux contrôles (*spike*) afin que chacun puisse être hybridé sur une puce à ADN. Cette étape d'hybridation a duré environ 17h à 65°C dans un four rotatif. Les puces à ADN ont ensuite été rincées à deux reprises puis les lames ont été scannées dans le Scanner de puce à ADN (Ref. G2565CA, Agilent®).

### II.1.7. Analyse des résultats de *microarray*

En tout, 27 échantillons ont été analysés par *microarray*. Les conditions de culture de chaque échantillon sont répertoriées dans le **Tableau 4**.



Type cellulaire	Température	Temps d'incubation	Nombre de passage
HCAEC	37°C	6h	3
HCAEC	37°C	12h	3
HCAEC	37°C	24h	3
HCAEC	37°C	6h	4
HCAEC	37°C	12h	4
HCAEC	37°C	24h	4
HCAEC	37°C	6h	5
HCAEC	37°C	12h	5
HCAEC	37°C	24h	5
HCAEC	40°C	6h	3
HCAEC	40°C	12h	3
HCAEC	40°C	24h	3
HCAEC	40°C	6h	4
HCAEC	40°C	12h	4
HCAEC	40°C	24h	4
HCAEC	40°C	6h	5
HCAEC	40°C	12h	5
HCAEC	40°C	24h	5

**TABLEAU 4** : LISTE DES CONDITIONS TESTÉES EN *MICROARRAY*.

L'analyse des résultats a été réalisée avec les logiciels Feature Extraction (Agilent®) et Array Studio® par l'équipe de génomique et biologie moléculaire de Sanofi. Cette analyse est propre à la plateforme et prend en compte un certain nombre de variables.

Dans un premier temps, les résultats obtenus sont exprimés sous forme de spots, représentant chacun l'expression d'un gène donné. Les images ont été analysées et les spots fluorescents convertis en valeurs brutes. Plusieurs variables ont ensuite été vérifiées à des fins de contrôle qualité (notamment grâce aux ARN contrôles hybridés sur les puces en même temps que nos échantillons). Des algorithmes ont également été utilisés afin de normaliser au mieux les données obtenues (soustraction du bruit de fond) puis ces dernières ont été filtrées afin d'éliminer les spots de mauvaises qualités et les sondes ne donnant aucun spot fluorescent (environ 25% des sondes).

Dans un deuxième temps, avec le logiciel Array Studio<sup>®</sup>, les données brutes ont été normalisées, transformées en *log2* afin d'obtenir des valeurs d'induction pour chaque gène et pour chaque condition. Une analyse statistique ANOVA a permis d'identifier les variations d'expression génique significatives (variation significative estimée pour une valeur d'induction supérieure ou égale à 2 et inférieure ou égale à -2 et une p-valeur corrigée inférieure ou égale à 0,05). L'analyse fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés a ensuite été réalisée à l'aide du logiciel *Ingenuity Pathway Analysis*<sup>®</sup> (IPA<sup>®</sup>) par l'équipe de bio-informatique de Sanofi afin d'identifier les voies de signalisation et les régulateurs de gènes possiblement impliqués dans la réponse cellulaire à la température, ou encore les fonctions biologiques susceptibles d'être altérées par cette variable.

## II.2. Étude de l'expression des ARN messagers (ARNm) par RT-QPCR

À partir des résultats de *microarray*, certains gènes d'intérêt ont été sélectionnés afin que leur expression soit vérifiée par RT-qPCR. Afin d'obtenir des échantillons d'ARN, les cellules endothéliales ont été cultivées à 37°C ou à 40°C en condition statique ou en condition de flux laminaire (10 dyn.cm<sup>2</sup>) pendant différents temps d'incubation. Dans certains cas, les cellules endothéliales ont également été traitées avec de la rapamycine (20 nM, Ref. R8781, Sigma<sup>®</sup>), inhibiteur sélectif de mTORC1, avec du B-109 (20 µM, Ref. 6009, Tocris<sup>®</sup>), inhibiteur de l'activité ribonucléasique de ERN1 ou avec de l'ADMA, (*Asymmetric Dimethylarginine*, 1mM, Ref. 311203, Sigma<sup>®</sup>), inhibiteur de NOS. Par la suite, les cellules ont été rincées avec du PBS 1X préchauffé à 37°C ou à 40°C selon les conditions et les ARN ont été extraits.

### II.2.1. Extraction des ARNm

#### II.2.1.1. À partir de cellules cultivées en condition statique

À l'aide de l'appareil QIAcube (Qiagen<sup>®</sup>) et du kit « RNEasy mini » (Ref. 74104, Qiagen<sup>®</sup>), les ARN totaux ont été extraits de manière robotisée selon les recommandations du fournisseur. Cette extraction nécessite une lyse préalable des cellules dans du tampon de lyse RLT (Qiagen<sup>®</sup>). Ce tampon contient du thiocyanate de guanidinium permettant l'inactivation des RNAses. Pour homogénéiser les lysats cellulaires, ces derniers ont été transférés sur colonne QIAshredder (Ref. 79654, Qiagen<sup>®</sup>) et centrifugés à 16 000g pendant 2 minutes. De l'éthanol 70% a ensuite été ajouté aux échantillons qui ont été transférés dans une colonne d'extraction puis centrifugés pendant 15 secondes à 8 000g et à 4°C. Le mélange tampon de lyse/éthanol permet de créer des conditions optimales pour la liaison

sélective des ARN au niveau des membranes de silice des colonnes d'extraction. L'éluat obtenu a été éliminé et du tampon RW1 a été ajouté avant de centrifuger à nouveau les colonnes pendant 15 secondes à 8 000g. Un traitement à la DNase I a été effectué pendant 15 minutes à température ambiante afin d'éliminer les possibles traces d'ADN restantes au niveau de la membrane. Du tampon RW1 a été à nouveau ajouté avant centrifugation à 8 000g pendant 15 secondes. Les colonnes ont ensuite été rincées à deux reprises avec du tampon RPE puis les membranes ont été séchées par centrifugation à 16 000g pendant 5 minutes. Les ARN ont ensuite été élués avec 30 µL d'eau dépourvue de ribonucléases (*RNAse et DNase free*). Une lecture de l'absorbance à 260 nm au Nanodrop 2000 (Ref. ND-2000, Thermo Scientific®) a permis de doser les ARN et déterminer leur concentration. En plus de cette absorbance, les rapports d'absorbance 260 nm/280 nm et 260 nm/230 nm ont également été mesurés pour contrôler la pureté de l'extraction. Ces deux ratios doivent être compris en moyenne entre 1.8 et 2.1, garantissant ainsi une absence de contaminations (protéines, phénols, sels, etc.).

#### II.2.1.2. À partir de cellules cultivées en condition de flux

Concernant les cellules cultivées en condition de flux, les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit « RNEasy micro » (Ref. 74004, Qiagen®) et de manière non robotisée. En effet, la quantité de cellules obtenue après culture en flux étant faible, l'extraction robotisée rendrait le rendement moins bon. Les étapes d'extraction sont exactement les mêmes celles décrites précédemment pour les cellules cultivées en condition statique, jusqu'au premier rinçage avec le tampon RPE. Par la suite, les colonnes ont été rincées une fois avec de l'éthanol 80% puis les membranes ont été séchées par centrifugation à 16 000g pendant 5 minutes. Les ARN ont ensuite été élués avec 14 µL d'eau dépourvue de ribonucléases (*RNAse et DNase free*) et dosés avec le NanoDrop 2000 de la même manière que précédemment.

#### II.2.1.3. À partir d'échantillons *in vivo*

D'autres expériences réalisées *in vivo* nous ont également permis d'obtenir des échantillons d'ARN et d'étudier différentes expressions géniques. Pour ces expériences, un manchon constrictif a été placé au niveau de la carotide gauche de souris C57Bl/6 anesthésiées. Après 24h, ces mêmes souris ont été mises à mort par surdose d'isoflurane. Un lavage intracardiaque a ensuite été effectué avec du PBS froid et les deux carotides ont été méticuleusement disséquées. Chaque section (en amont et en aval du manchon) a été individualisée puis les ARN totaux ont été isolés à l'aide du kit « PureLink RNA Mini kit » (Ref. 12183020, Invitrogen®) en suivant les recommandations du fournisseur. Les ARN ont ensuite été dosés au Nanodrop 2000 de la même manière que décrit précédemment.

## II.2.2. Transcription inverse

La transcription inverse est une étape indispensable permettant d'obtenir des brins d'ADN complémentaires à partir des ARN totaux préalablement extraits. Cette transcription inverse a été effectuée à l'aide du kit « SuperScript VILO synthesis » (Ref. 11754050, Invitrogen®). Ce kit est composé, d'une part, d'un tampon de réaction VILO (5X), contenant des amorces aléatoires, des dNTP et du MgCl<sub>2</sub> et, d'autre part, d'un mélange enzymatique (10X), contenant la « SuperScript III Reverse Transcriptase » et des inhibiteurs de ribonucléases.

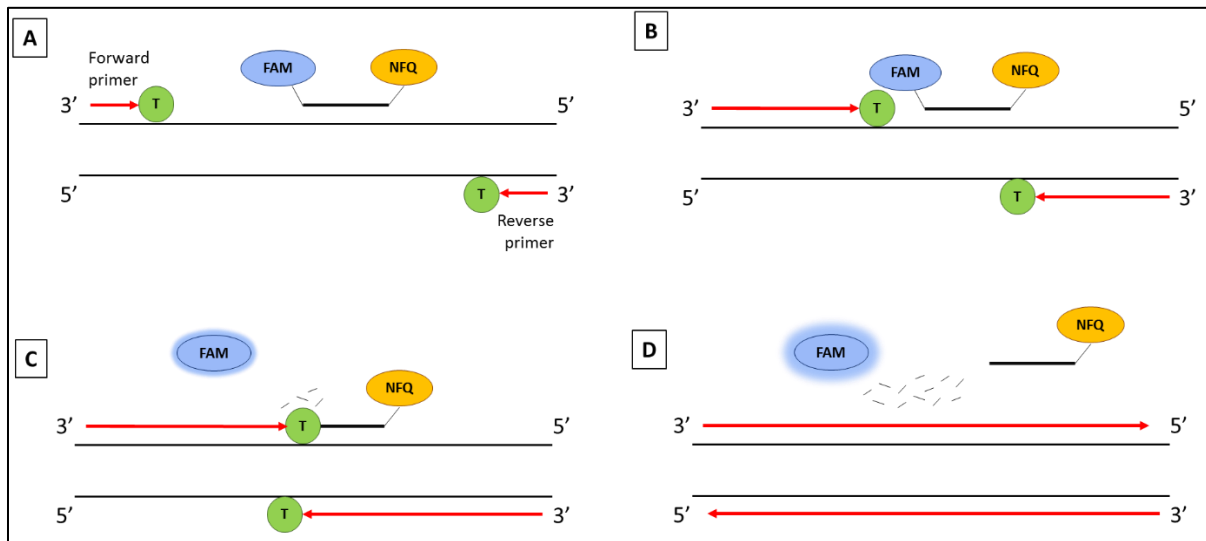
La transcription inverse a été réalisée en plaque avec un volume réactionnel final de 20 µL/puits. 500 ng d'ARN ont été utilisés et dilués dans de l'eau de telle sorte à obtenir un volume final de 14 µL/puits. Les deux produits du kit ont ensuite été mélangés en bonne proportion et ajoutés aux ARN (6µL/puits). La plaque a ensuite été scellée et placée au thermocycleur ProFlex PCR System (Applied Biosystems®) pour que la réaction de transcription inverse puisse être effectuée.

Cette réaction s'est déroulée en trois étapes : le mélange réactionnel a tout d'abord été incubé pendant 10 minutes à 25°C pour permettre l'hybridation des amorces aléatoires aux ARNm. Une incubation d'une heure à 42°C a ensuite été réalisée pour permettre la transcription inverse qui a été stoppée par une augmentation de la température à 85°C pendant 5 minutes. Puis, les ADNc obtenus ont été utilisés immédiatement ou conservés à -20°C.




## II.2.3. PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative (qPCR) permet le suivi en temps réel de l'amplification spécifique d'un gène d'intérêt, rendant ainsi possible la détermination des concentrations initiales d'acides nucléiques. C'est une technique puissante, quantitative et beaucoup plus sensible que la PCR classique. Cette technique se base sur une molécule fluorescente traduisant l'accumulation du produit PCR : la sonde TaqMan. C'est une sonde d'hydrolyse à double marquage augmentant ainsi la spécificité de la PCR. Elle est composée, en 5', d'un rapporteur fluorescent (FAM) et en 3', d'un quencher non fluorescent (NFQ) qui inhibe la fluorescence du fluorochrome lorsqu'il est situé à proximité. Ainsi, au cours de la PCR, lorsque les ADNc sont dénaturés et sous forme simple brin, les sondes TaqMan vont s'y hybrider (**Figure 22A**). Dans cet état, aucune fluorescence n'est émise. Cependant, durant l'élongation (**Figure 22B**), la Taq polymérase va hydrolyser cette sonde grâce à son activité 5' exonucléase ce qui libère le fluorochrome du quencher (**Figure 22C et 22D**). Un signal lumineux peut ainsi être émis. Au cours de chaque cycle PCR, l'intensité de fluorescence augmente proportionnellement à la quantité de sondes hydrolysées

et donc au nombre de copies de l'ADN cible.



Légende :

-  Taq Polymérase
-  Rapporteur fluorescent
-  Quencher non fluorescent

**FIGURE 22 : PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE LA TECHNOLOGIE TAQMAN.**

Les réactions de PCR ont été effectuées en plaque 96 puits (Ref. 021970, Dutscher®) en utilisant le kit « TaqMan Gene Expression Master Mix » (Ref. 4369016, Invitrogen®). Ce kit contient notamment la polymérase AmpliTaq Gold DNA et un mélange de dNTP. Pour chaque gène d'intérêt, les sondes (**Cf. Annexe I, Tableau 18**) ont été diluées au  $1/10^6$  dans le *Master Mix* puis elles ont été mélangées à 10 ng d'ADNc pour un volume réactionnel final de 20  $\mu$ L. L'amplification a ensuite été réalisée à l'aide du thermocycleur 3000mxc (Agilent®).

La réaction de PCR s'est effectuée en plusieurs étapes. La première étape a consisté en l'activation de la Taq Polymérase pendant 2 minutes à 50°C. La deuxième étape a permis la pré-dénaturation de l'ADN pendant 10 minutes à 95°C. Cette étape a été suivie de 40 cycles. Chacun de ces cycles incluait une phase de dénaturation de l'ADN (15 secondes à 95°C) et une phase d'hybridation des amorces et de synthèse du brin complémentaire (1 minute à 60°C).

Les résultats de PCR apparaissent sous forme de courbes d'amplification qui représentent la fluorescence émise progressivement au cours des cycles. Le profil de ces courbes peut se décomposer en trois étapes :

- Une phase de bruit de fond où la quantité de fragments amplifiés est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond.
- Une phase exponentielle de croissance caractérisée par une efficacité d'amplification élevée et constante, où le produit PCR est doublé à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase représente une droite.
- Une phase de plateau où la réaction est ralentie ou stoppée car certains composants de la réaction deviennent limitants.

Ces courbes permettent ainsi de déterminer le nombre de cycles à partir duquel la fluorescence devient détectable. Cette valeur seuil est appelée *Cycle Threshold* (Ct) et est directement proportionnelle à la quantité initiale d'acides nucléiques. Plus le Ct est faible, moins il aura fallu de cycles pour atteindre le seuil et donc plus la quantité d'ADNc présente initialement était importante, et inversement.

Lors de chaque PCR, trois gènes de ménage, dont l'expression est en théorie constante, ont été utilisés afin de normaliser les résultats : TBP (*TATA-Box Binding Protein*), HPRT1 (*Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*) et ARN 18S (Acide ribonucléique ribosomique 18S).

Les Ct des gènes d'intérêt sont ensuite normalisés par rapport aux Ct des gènes de ménage et une valeur de  $\Delta Ct$  est ainsi obtenue. Cela permet une correction de la concentration de matériel de départ.

$$\Delta Ct = Ct (\text{Gène d'intérêt}) - Ct (\text{Gène de ménage}).$$

Ensuite, pour chaque gène, les  $\Delta Ct$  sont comparés à la condition contrôle. Une valeur de  $\Delta \Delta Ct$  est ainsi obtenue. Cela permet de rapporter le niveau d'expression du gène d'intérêt dans chaque échantillon à son niveau d'expression basale dans l'échantillon contrôle.

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct (\text{échantillon}) - \Delta Ct (\text{échantillon contrôle})$$

Enfin, le facteur d'induction est calculé et permet de déterminer la différence d'expression du gène entre les conditions d'études et la condition contrôle.

$$\text{Fold Change} = 2^{(-\Delta \Delta Ct)}$$

### II.3. Étude de l'expression des ARNm par TLDA

Afin de réaliser une analyse ciblée à haut débit du transcriptome et une validation des résultats obtenus par *microarray*, la technologie TLDA (*Taqman Low Density Array*) a été utilisée. C'est une technique très sensible, robuste et reproductible qui permet une quantification simultanée de l'expression de 16 à 384 gènes en utilisant peu de matériel biologique. Chacune des plaques TLDA est préchargée en sondes Taqman lyophilisées spécifiques des gènes d'intérêt que nous avons sélectionné.

Un panel de 91 gènes a été sélectionné initialement pour valider les résultats de *microarray* (Cf. **Annexe I, Tableau 19**). Par la suite, une analyse plus restreinte a été effectuée sur un panel de 42 gènes (Cf. **Annexe I, Tableau 20**) afin d'étudier plus précisément leur expression dans différentes conditions. Sur chacune des plaques (une contenant 91 gènes et l'autre 42), trois gènes de ménage ont été utilisés afin de normaliser les résultats : TBP, HPRT1 et ARN 18S.

En plus de ces analyses, un panel de 34 gènes connus pour être modulés par les forces de cisaillement a également été sélectionné (Cf. **Annexe I, Tableau 21**) afin de vérifier le bon fonctionnement du système de culture en flux.

Ainsi, pour réaliser cette étude par TLDA, un mélange réactionnel de 100 µL a été préparé pour chaque échantillon. Ce mélange était composé de 50 µL de « Taqman Universal PCR Master Mix » (2X) et de 50 µL d'ADNc (125 ng) dilués dans de l'eau dépourvue de ribonucléases (*RNAse et DNAse free*). Chaque réservoir de la plaque a été chargé avec ce mélange réactionnel. La plaque a ensuite été centrifugée à deux reprises à 250g pendant 1 minute puis scellée avant d'être placée dans l'appareil ABI PRISM® 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems®). La réaction de PCR a ainsi été réalisée selon le même protocole que décrit précédemment.

Les résultats apparaissent également sous forme de courbes d'amplification et les valeurs de Ct sont déterminées par le logiciel Data Assist®. Par la suite, l'analyse a été réalisée comme décrit précédemment.

Les gènes ayant un taux d'induction supérieur ou égal à 2 et inférieur ou égal à 0,5 ont été considérés comme respectivement induits ou réprimés par la température et ainsi validés si leur expression allait dans le même sens que dans les analyses de *microarray*. Au contraire, les gènes ayant un taux d'induction compris entre 0,6 et 1,9 ont été considérés comme ayant une expression inchangée en réponse à la température et donc non validés.

## III. Mesure de l'expression protéique

### III.1. Le Western Blot

Le western blot est une technique permettant d'identifier et de quantifier la quantité d'une ou plusieurs protéines spécifiques dans un échantillon. Elle s'appuie sur une électrophorèse qui sépare les protéines en fonction de leur poids moléculaire puis ces protéines sont détectées spécifiquement à l'aide d'anticorps. Cette technique se décompose en plusieurs étapes.

#### III.1.1. Préparation des lysats

Après avoir réalisé un traitement par la température et/ou par la rapamycine (20 nM, Ref. R8781, Sigma®), les cellules endothéliales ont été rincées deux fois avec du PBS 1X préchauffé à la bonne température (37°C ou 40°C) avant de les placer sur glace de sorte à ralentir leur métabolisme et stopper toutes réactions ayant lieu au sein de celles-ci. Les cellules ont ensuite été lysées avec un tampon de lyse spécifique (**Tableau 5**) afin de détruire les membranes et libérer l'ensemble du contenu cellulaire, notamment les protéines.



Composant du tampon de lyse	Référence / Fournisseur	Composition/Concentration finale utilisée
<b>Cell Extraction Buffer</b>	Ref. FNN0011 / Invitrogen®	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10mM Tris, pH 7.4</li> <li>• 100 mM NaCl</li> <li>• 1 mM EGTA</li> <li>• 1 mM NaF</li> <li>• 20 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub></li> <li>• 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub></li> <li>• 1% Triton X-100</li> <li>• 10% Glycérol</li> <li>• 0.1% SDS</li> <li>• 0.5% Déoxycholate</li> </ul>
<b>DTT</b>	Ref. D9163 / Sigma®	1 mM
<b>PMSF</b>	Ref. 93482 / Sigma®	1 mM
<b>β-glycerophosphate</b>	Ref. G6251 / Sigma®	10 mM
<b>Protéase Inhibitor Cocktail 1X</b>	Ref. P8340 / Sigma®	Utilisé au 1X (concentration non référencée par le fournisseur)
<b>Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 1X</b>	Ref. P5726 / Sigma®	Utilisé au 1X (concentration non référencée par le fournisseur)
<b>Phosphatase Inhibitor Cocktail 3 1X</b>	Ref. P0044 / Sigma®	Utilisé au 1X (concentration non référencée par le fournisseur)
<b>Orthovanadate</b>	Ref. S6508, Sigma®	0.5 mM À préchauffer 5 minutes à 75°C avant utilisation

**TABLEAU 5 : COMPOSITION DU TAMPON DE LYSE UTILISÉ EN WESTERN BLOT.**

### III.1.2. Dosage des protéines

Le dosage BCA (*bicinchoninic acid*) est une méthode permettant de mesurer la concentration des protéines présentes dans un échantillon. Chaque lysat cellulaire est centrifugé pendant 20 minutes à 16 000g et à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Les surnageants sont ensuite récupérés et dosés avec le kit de dosage BCA (Ref. 23225, Thermo Scientific®) selon les recommandations du fournisseur. C'est un dosage colorimétrique basé sur l'acide bicinchoninique. En milieu alcalin, les protéines réduisent l'ion cuivrique Cu<sup>2+</sup> en ion cuivreux Cu<sup>+</sup>. Cela permet à l'acide bicinchoninique, hautement spécifique pour le Cu<sup>+</sup>, de réagir avec ce dernier pour former un complexe pourpre ayant une absorption optique maximale à 562 nm. L'absorbance étant proportionnelle à la concentration de protéines, la quantité de protéines totales dans les échantillons a été déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée en parallèle avec une gamme de BSA (*Bovine Serum Albumin*).

### III.1.3. Migration

Afin de pouvoir migrer dans un gel d'électrophorèse, les protéines doivent être sous forme linéaire et chargées négativement. Pour cela, pour chaque échantillon, 10 µg de protéines ont été chargées avec un mélange de « Laemmli Sample Buffer 2X » (Ref. 1610737, BioRad®) et DTT (Ref. D9163, Sigma®, 0.1M). Le « Laemmli Sample Buffer 2X » contient du β-mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures, du détergent SDS qui linéarise les protéines et les charge négativement, du bleu de bromophénol qui sert de colorant pour le front de migration et du glycérol qui augmente la densité des échantillons et qui facilite ainsi leur dépôt dans les puits. Le DTT, quant à lui, est un agent réducteur qui permet également de réduire les liaisons disulfures. Les protéines ont été dénaturées pendant 5 minutes à 97°C. Les échantillons ainsi qu'un marqueur de taille (Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards, Ref. 1610373, BioRad®) ont ensuite été déposés dans les puits d'un gel « NuPAGE™ Tris-Acetate 3-8%, 1.0 mm » (Ref. EA0375PK2, Invitrogen®), préalablement placé dans une cuve contenant du tampon de migration « NuPAGE™ Tris-Acetate SDS Running Buffer 1X » (Ref. LA0041, Invitrogen®). Un champ électrique de 80V a été appliqué pendant 30 minutes afin que les protéines passent le gel de concentration, suivi de 200V pendant environ 1h. Sous l'effet du champ magnétique, les protéines migrent vers le pôle positif (anode) permettant une séparation en fonction de leur poids moléculaire. Ainsi, les plus petites protéines sont moins retenues par le maillage et migrent rapidement contrairement aux grosses protéines qui migrent plus difficilement et se retrouvent piégées en haut du gel.

### III.1.4. Transfert sur membrane

La migration des protéines a été suivie d'un transfert sur membrane. Pour cela, le gel a été rincé à l'eau et déposé sur une couche d'éponges surmontée d'une membrane PVDF 0,2 µM (Ref. 1704156, Biorad®). Un courant de 13 mA a ensuite été appliqué pendant 12 minutes à l'aide de l'appareil TransBlot Turbo Transfer System (Ref. 1704150, Biorad®). Une fois de plus, grâce au champ électrique, les protéines chargées négativement migrent vers l'anode et sont piégées par la membrane suivant la même disposition que dans le gel.

### III.1.5. Immuno-détection

Après transfert sur membrane, cette dernière a été placée pendant 1h dans une solution de saturation contenant du TBS 1X (Ref. T6664, Sigma®) et 10% de lait (Ref. 1706404, BioRad®). Cette étape est indispensable pour masquer les sites de liaisons aspécifiques présents sur la membrane. Cette dernière

a ensuite été rincée sous agitation rapide avec du TBS-Tween 0.1% puis incubée une nuit, sous agitation lente, à 4°C dans une solution de TBS-Tween 0.05% + 5% BSA (Ref. A7030, Sigma®) contenant les anticorps primaires (**Cf. Partie III.1.7, Tableau 6**). La membrane a de nouveau été rincée afin d'éliminer les excès d'anticorps puis hybridée pendant 1h, à l'obscurité, à température ambiante et sous agitation lente avec une solution de TBS-Tween 0.05% contenant 1% de lait et les anticorps secondaires (**Cf. Partie III.1.7, Tableau 7**) couplés à la peroxydase de raifort (HRP). L'excès d'anticorps a été éliminé par des lavages consécutifs au TBS-Tween 0.1%.

### III.1.6. Révélation

La révélation a été réalisée à l'aide d'un substrat chimio-luminescent : l'ECL (*Enhanced Chemiluminescence*, Ref. GERPN2109, Sigma). Ce dernier réagit avec les anticorps secondaires couplés à l'HRP et produit un signal lumineux visible. Les membranes ont ainsi été incubées 1 minute 30 avec l'ECL puis placées dans un système G:Box Chemi XL 1.4 (Syngene®) qui permet l'acquisition quantitative de la lumière émise grâce à une caméra de haute résolution et au logiciel Genesys®. Les bandes d'intérêt ont été ensuite identifiées par comparaison avec le marqueur de poids moléculaire et les images obtenues ont été analysées par densitométrie avec le logiciel GeneTools V4.03 (Syngene®). Cela a permis de quantifier les protéines en fonction de l'intensité de la bande révélée. La quantification de la  $\beta$ -actine a permis de normaliser les échantillons pour corriger les écarts de dépôts.

### III.1.7. Liste des anticorps utilisés en western blot

Lors des différentes expériences de western blot, plusieurs anticorps primaires et secondaires ont été utilisés. Leurs caractéristiques ont été répertoriées dans les **Tableaux 6 et 7** respectivement.

Nom de l'anticorps	Monoclonal [clone] / Polyclonal	Référence	Fournisseur	Dilution
p-HSF1 (S326)	Monoclonal [EP1713Y]	Ab76076	Abcam®	1/1000 <sup>e</sup>
HSF1 total	Monoclonal [EP1710Y]	Ab52757	Abcam®	1/1000 <sup>e</sup>
p-ERN1 (S724)	Polyclonal	Ab48187	Abcam®	1/1000 <sup>e</sup>
ERN1 total	Monoclonal [14C10]	#3294	Cell Signaling®	1/1000 <sup>e</sup>
XBP1s	Monoclonal [D2C1F]	#12782	Cell Signaling®	1/1000 <sup>e</sup>
p-p70-S6 Kinase (Thr389)	Monoclonal [108D2]	#9234	Cell Signaling®	1/1000 <sup>e</sup>
p70 S6 Kinase	Polyclonal	#9202	Cell Signaling®	1/1000 <sup>e</sup>
p-eNOS	Monoclonal [C9C3]	#9570	Cell Signaling®	1/1000 <sup>e</sup>
eNOS	Polyclonal	#9572	Cell Signaling®	1/1000 <sup>e</sup>
β-actine	Monoclonal [AC-15]	#A5441	Sigma®	1/10 000 <sup>e</sup>

**TABLEAU 6 : LISTE ET CARACTÉRISTIQUES DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISÉS EN WESTERN BLOT.**

Nom de l'anticorps	Monoclonal [clone] / polyclonal	Référence	Fournisseur	Dilution
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Polyclonal	111-035-045	Jackson ImmunoResearch®	1/10 000 <sup>e</sup>
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Polyclonal	115-035-003	Jackson ImmunoResearch®	1/10 000 <sup>e</sup>

**TABLEAU 7 : LISTE ET CARACTÉRISTIQUES DES ANTICORPS SECONDAIRES UTILISÉS EN WESTERN BLOT.**

## III.2. L'immunomarquage cellulaire

Afin d'observer visuellement des protéines d'intérêt à la surface ou à l'intérieur des cellules, la technique d'immunomarquage a été utilisée. Elle permet d'identifier une protéine d'intérêt grâce à un anticorps spécifique couplé à un fluorochrome, de manière à être visible par microscopie à fluorescence. Tout comme le western blot, cette technique se décompose en plusieurs étapes.

### III.2.1. Fixation et perméabilisation

Dans un premier temps, après traitement à différentes températures, les cellules ont été rincées trois fois avec du PBS 1X préchauffé (à 37°C ou à 40°C) afin d'éliminer toutes traces de milieu de culture complet. Puis, les cellules ont été fixées et perméabilisées avec le kit « fixation/permeabilization solution » (Ref. 554714, Becton Dickinson®). Ce kit contient, d'une part, une solution de fixation et perméabilisation simultanée nommée *cytofix/cytoperm* (contenant formaldéhyde et saponine) et, d'autre part, un tampon de lavage nommé *perm/wash* (contenant SVF et saponine). Ainsi, les cellules ont d'abord été incubées avec la solution de *cytofix/cytoperm* pendant 10 minutes à 4°C puis lavées à trois reprises avec la solution de *perm/wash* 1X.

### III.2.2. Marquage

Les anticorps peuvent établir des liaisons avec des protéines via des interactions ne passant pas par leur partie hypervariable. Ces sites de liaison dits « aspécifiques » ont été bloqués avec une solution de saturation, contenant 2% de BSA diluée dans du *perm/wash* 1X, pendant 30 minutes à température ambiante puis les cellules ont été rincées trois fois avec du *perm/wash* 1X. Les cellules ont été ensuite incubées avec une solution d'anticorps primaire (diluée dans du *perm/wash* 1X) une nuit à 4°C (Cf. **Partie III.2.4, Tableau 9**). Après trois rinçages avec la solution de *perm/wash* 1X, les cellules ont été incubées avec une solution d'anticorps secondaire (diluée dans du *perm/wash* 1X) pendant 1h à température ambiante et à l'obscurité (Cf. **Partie III.2.4, Tableau 10**). Les cellules ont été rincées puis incubées 10 minutes avec du Hoeschst 33342 (8 µg/mL, Ref. H3570, Invitrogen®). Cette molécule est un intercalant de l'ADN qui permet la mise en évidence des noyaux. Les cellules ont été ensuite rincées une dernière fois avant acquisition des images.

### III.2.3. Acquisition des images

Les marquages ont été révélés grâce à l'INCell 2200 (GE Healthcare Life Sciences®) à l'objectif x20. C'est un imageur cellulaire ultra-rapide et sensible qui est capable d'utiliser différents filtres d'excitation pour mettre en évidence les différents fluorochromes du marquage. Lors de nos expériences, trois filtres ont été utilisés et répertoriés dans le **Tableau 8**. Les images ont ensuite été analysées avec le logiciel INCell Developer®.

Nom du filtre / Fluorochrome observé	Longueur d'onde d'excitation	Longueur d'onde d'émission	Couleur observée
DAPI	350 nm	455 nm	Bleu
FITC	490 nm	525 nm	Vert
Cy3	543 nm	605 nm	Rouge

**TABLEAU 8 : CARACTÉRISTIQUES DES FILTRES UTILISÉS LORS DE L'ACQUISITION DES IMAGES À L'INCELL 2200.**

### III.2.4. Liste des anticorps utilisés en immunomarquage

Lors des différentes expériences d'immunomarquage, plusieurs anticorps primaires et secondaires ont été utilisés. Leurs caractéristiques ont été répertoriées dans les **Tableaux 9** et **10** respectivement.

Nom de l'anticorps	Monoclonal [clone] / Polyclonal	Référence	Fournisseur	Dilution
HSPA1A	Polyclonal	GTX111088	Genetex®	1/400 <sup>e</sup>
HSP90	Polyclonal	GTX109753	Genetex®	1/400 <sup>e</sup>
p-HSF1 (S326)	Monoclonal [EP1713Y]	Ab76076	Abcam®	1/100 <sup>e</sup>
HSF1 total	Monoclonal [EP1710Y]	Ab52757	Abcam®	1/100 <sup>e</sup>
VE-cadhérine	Polyclonal	Ab33168	Abcam®	1/200 <sup>e</sup>
CIRBP	Monoclonal [EPR18783]	Ab191885	Abcam®	1/100 <sup>e</sup>
Ki67	Monoclonal [D3B5]	9129	Cell Signaling®	1/200 <sup>e</sup>

**TABLEAU 9 : LISTE ET CARACTÉRISTIQUES DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISÉS EN IMMUNOMARQUAGE.**

Nom de l'anticorps	Monoclonal [clone] / Polyclonal	Référence	Fournisseur	Dilution
Alexa Fluor 488	Polyclonal	A-11008	Invitrogen®	1/500 <sup>e</sup>
Alexa Fluor 555	Polyclonal	A-21425	Invitrogen®	1/500 <sup>e</sup>

**TABLEAU 10** : LISTE ET CARACTÉRISTIQUES DES ANTICORPS SECONDAIRES UTILISÉS EN IMMUNOMARQUAGE.

### III.3. L'immunohistochimie

Afin d'observer visuellement des protéines d'intérêt dans des cellules d'une coupe de tissu, la technique d'immunohistochimie a été utilisée.

#### III.3.1. Prélèvement et coupe du tissu

Notre biobanque (Inserm U1148) contient de nombreuses artères coronaires prélevées à partir de cœurs explantés de patients. Une fois prélevées, ces artères ont été placées dans de l'OCT et congelées à -80°C. L'OCT est un cryoconservateur permettant de préserver les tissus, notamment en évitant la formation de cristaux au sein de ces derniers lors de la phase de congélation. Des coupes transversales de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées à l'aide d'un cryostat puis chacune d'elle a été immunomarkuée.

#### III.3.2. Fixation et immunomarquage

Dans un premier temps, les coupes ont été fixées avec une solution de PFA (4%, Ref. 18814-10, Polysciences®) puis les sites aspécifiques ont été saturés avec une solution de PBS 1X contenant 2,5% de BSA et 0,05% de gélatine de poisson (Ref. G7041, Sigma®) pendant 1h à température ambiante. Après plusieurs lavages au PBS 1X, les coupes ont été incubées pendant une nuit à 4°C avec une solution de PBS 1X contenant les anticorps primaires (Cf. **Partie III.3.3, Tableau 11**). Par la suite, les coupes ont été rincées à trois reprises avec du PBS 1X avant d'être à nouveau incubées pendant 2h à température ambiante et à l'obscurité dans une solution contenant les anticorps secondaires (Cf. **Partie III.3.3, Tableau 12**). Enfin, les noyaux ont été marqués à l'aide du Hoeschst 33342 (8 µg/mL, Ref. H3570, Invitrogen®) pendant 10 minutes et l'acquisition des images a été effectuée avec le microscope Axio Observer Z7 (Zeiss®) à l'objectif x20.

### III.3.3. Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie

Lors des différentes expériences d'immunohistochimie, plusieurs anticorps primaires et secondaires ont été utilisés. Leurs caractéristiques ont été répertoriées dans les **Tableaux 11** et **12** respectivement.

Nom de l'anticorps	Monoclonal [clone] / Polyclonal	Référence	Fournisseur	Dilution
TRPM3	Polyclonal	NB100-98864	Novus Biologicals®	1/100 <sup>e</sup>
TRPV1	Polyclonal	Ab150742	Abcam®	1/200 <sup>e</sup>

**TABLEAU 11 : LISTE ET CARACTÉRISTIQUES DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISÉS EN IMMUNOHISTOCHIMIE.**

Nom de l'anticorps	Monoclonal [clone] / Polyclonal	Référence	Fournisseur	Dilution
Alexa Fluor 488	Polyclonal	A-11008	Invitrogen®	1/500 <sup>e</sup>
Alexa Fluor 555	Polyclonal	A-21425	Invitrogen®	1/500 <sup>e</sup>

**TABLEAU 12 : LISTE ET CARACTÉRISTIQUES DES ANTICORPS SECONDAIRES UTILISÉS EN IMMUNOHISTOCHIMIE.**

## IV. Transfection

### IV.1. Principe de la transfection

La transfection est une technique qui consiste à ajouter de l'ADN étranger dans une cellule eucaryote afin que cette dernière exprime un gène d'intérêt. La transfection peut être stable, lorsque le matériel génétique s'incorpore directement dans le génome de la cellule, ou transitoire, lorsqu'il demeure sous forme épisomique, non intégré au génome. Les molécules d'ADN étant chargées négativement, il est nécessaire de les complexer préalablement avec un vecteur lipidique chargé positivement tel que la lipofectamine. Ces complexes forment alors des liposomes qui, par fusion avec la membrane plasmique, peuvent faire pénétrer leur contenu au sein des cellules cibles.



## IV.2. Conditions expérimentales

Au cours de ces expériences de transfection, les Telo-HAEC ont été utilisées car ce sont des cellules moins fragiles et plus résistantes que les HCAEC. Les traitements effectués générant un stress cellulaire important, les cellules immortalisées étaient donc plus à même de résister à ce type de stress.

Les Telo-HAEC ont été transfectées de manière transitoire avec un plasmide d'intérêt (pGL4.41 ou pGL4.39) et un plasmide GFP (*Green Fluorescent Protein*) (Cf. **Partie IV.4**). 24h avant la transfection, les Telo-HAEC ont étéensemencées dans des plaques 96 puits blanches à fonds plats transparents (Ref. 3610, Corning®) à raison de 30 000 cellules/puits. La transfection a été réalisée en diluant séparément l'ADN plasmidique et la lipofectamine (Ref. 11668019, Invitrogen®) dans du milieu Opti-MEM sans sérum (Ref. 51985-026, Gibco®). Ces deux solutions ont été incubées séparément pendant 5 minutes avant d'être mélangées et incubées pendant 20 minutes à température ambiante. Pendant cette étape, les plasmides d'ADN forment des complexes avec les lipides cationiques. Ce mélange a ensuite été ajouté aux cellules (0.2 µg/puits d'ADN plasmidique d'intérêt + 0.02 µg/puits de vecteur GFP), préalablement rincées avec de l'Opti-MEM sans sérum. La transfection a été stoppée après 4h d'incubation à 37°C par rinçage des cellules et ajout de milieu de culture complet supplémenté de 18% de SVF. Cette étape permet de limiter la souffrance des cellules et de favoriser leur prolifération. 24h plus tard, le milieu a été remplacé par 100 µL de milieu complet classique (contenant 2% de SVF) et les cellules ont été soumises à 37°C ou à 40°C pendant 2h, 4h ou 6h. Après chaque temps d'incubation, l'intensité de fluorescence de la GFP, utilisée comme un contrôle qualité de la transfection pour chaque condition, a été mesurée au spectrophotomètre pour des longueurs d'onde d'excitation et d'émission égales à 470 nm et 515 nm respectivement. Par la suite, les cellules ont été lysées et de la luciférine a été ajoutée. Pour cela, 50µL de réactif Tropix® Luc-Screen Buffer 1 (Ref. T2300, Thermofisher®) ont été ajoutés à chaque puits et incubés pendant 10 minutes à température ambiante et à l'obscurité. 50 µL de réactif Tropix® Luc-Screen Buffer 2 (Ref. T2302, Thermofisher®) ont ensuite été ajoutés et incubés pendant 3 minutes dans les mêmes conditions. La luminescence a ensuite pu être mesurée au spectrophotomètre (CLARIOstar Plus, Bmg Labtech®) afin de véritablement quantifier l'activité du promoteur d'intérêt dans chaque condition.

## IV.3. Analyse des résultats de transfection

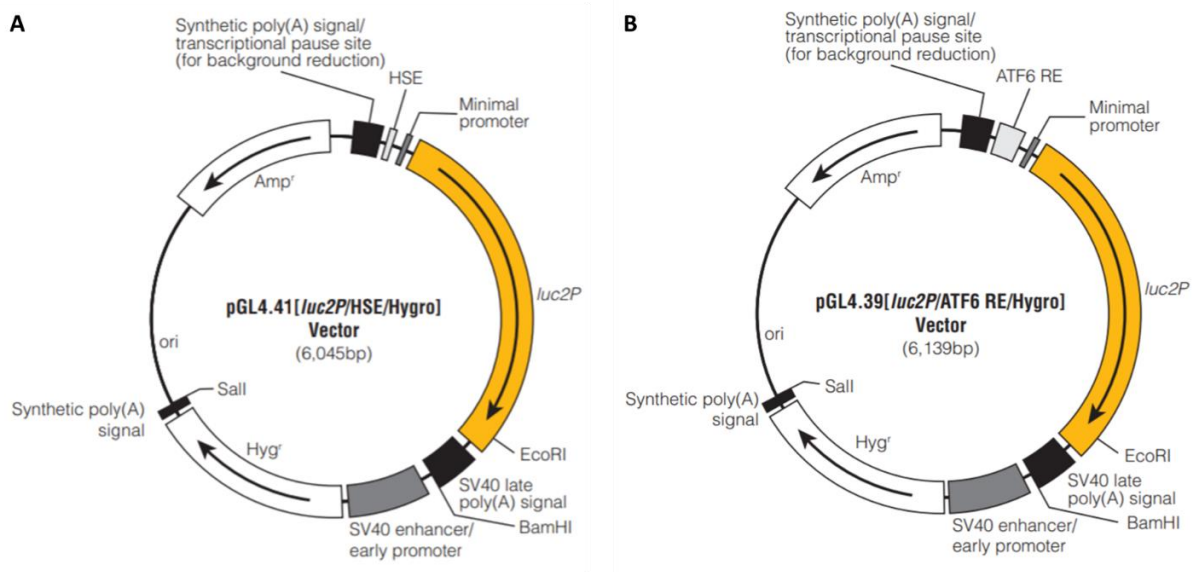
Pour chaque condition, des contrôles sans transfection ont également été effectués et ont servi de contrôles négatifs de l'expérience. Les valeurs de fluorescence et de luminescence obtenues ont été soustraites avec les valeurs des conditions contrôles (sans transfection) pour chaque temps d'incubation et pour chaque condition testée. Par la suite, un ratio luminescence/fluorescence a été

effectué et multiplié par 1000 pour obtenir une valeur traduisant de façon proportionnelle l'activité du promoteur du gène d'intérêt pour chaque condition.

#### IV.4. Plasmides utilisés

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé les plasmides décrits ci-dessous :

- pGL4.41[luc2P/HSE/Hygro] Vector (Ref. E375A, Promega®) : ce vecteur contient 4 copies des éléments de réponse au choc thermique (HSE) qui contrôle la transcription du gène rapporteur luciférase Luc2P (**Figure 23A**). Il a été utilisé à une concentration de 8 ng/μL.
- pGL4.39[luc2P/ATF6 RE/Hygro] Vector (Ref. E3661, Promega®) : ce vecteur contient 5 copies des éléments de réponse de ATF6 (ATF6 RE) qui contrôle la transcription du gène rapporteur luciférase Luc2P (**Figure 23B**). Il a été utilisé à une concentration de 8 ng/μL.
- pmax GFP™ Vector (Lonza®) : il a été utilisé à une concentration de 0,8 ng/μL et pour toutes les conditions de transfection afin de servir de contrôle qualité de la transfection.



**FIGURE 23 : CARTES DES PLASMIDES UTILISÉS.**

**(A)** Plasmide contenant un promoteur enrichi en séquences HSE. **(B)** Plasmide contenant un promoteur enrichi en séquences ATF6 RE.

## V. Adhérence des monocytes

Afin d'évaluer l'effet de la température sur la capacité des cellules endothéliales à réguler la réponse inflammatoire, les THP-1 DsRed ont été mises en circulation sur les HCAEC et leur adhérence sur les tapis endothéliaux a été évaluée.

Les cellules endothéliales ont été cultivées en condition de flux pendant 24h selon le protocole décrit dans la **Partie I.4.2** (10 dyn/cm<sup>2</sup>). Par la suite, elles ont été traitées ou non avec de l'IL-1 $\beta$  (10 ng/mL) pendant une nuit avant d'être incubées à 37°C ou à 40°C pendant 6h, toujours en condition de flux. Après les 6h de pré-conditionnement thermique, le flux a été stoppé et les cellules ont été incubées pendant 10 minutes à température ambiante avec du Hoeschst 33342 (8  $\mu$ g/mL, Ref. H3570, Invitrogen®) de façon à marquer leurs noyaux. Après marquage des noyaux et quel que soit le pré-conditionnement thermique réalisé (37°C ou 40°C), les THP-1 DsRed ont été mises en circulation sur les tapis endothéliaux pendant 1h à 37°C, à 5 dyn/cm<sup>2</sup> et à une concentration de 500 000 cellules/mL. Le système de flux a ensuite été stoppé, les cellules endothéliales ont été rincées trois fois avec du PBS 1X et directement observées à l'INCell 2200.

L'analyse des images a été effectuée à l'aide du logiciel INCell Developer® et a permis de dénombrer les monocytes (marqués en rouge) ainsi que les cellules endothéliales (marquées en bleu). Cette analyse a également permis de calculer le pourcentage de THP-1 DsRed adhérentes aux tapis endothéliaux dans chaque condition testée et ainsi d'évaluer l'effet du pré-conditionnement thermique sur l'adhérence monocyttaire.

## VI. Transmigration

Le test de transmigration est une technique permettant de reproduire, *in vitro*, l'étape de diapédèse des leucocytes à travers la monocouche endothéliale.

### VI.1. Passage de dextran-FITC à travers la monocouche d'HCAEC

L'indice de perméabilité de la monocouche endothéliale, c'est-à-dire sa capacité à « retenir » des molécules, a été estimée en réponse à différentes températures en mesurant le passage de molécules de dextran marquées à travers le tapis endothélial.

À cette fin, nous avons utilisé des inserts de culture (Ref. 734-1567, Transwell®), munis d'un filtre d'une porosité de 0.4  $\mu$ m de diamètre et placés dans les puits de deux plaques 24 puits. Pour convenance,

les inserts de culture seront nommés ici « chambres supérieures » et mimeront la lumière du vaisseau sanguin alors que les puits de la plaque, ou « chambres inférieures », mimeront les tissus adjacents. Les HCAEC ont étéensemencées dans la chambre supérieure, à raison de 175 000 cellules/puits. Le même milieu de culture a été ajouté dans la chambre inférieure afin d'éviter les variations de pression osmotique. Après 48h de culture, un pré-conditionnement thermique des HCAEC a été effectué pendant 24h à 37°C ou à 40°C. Du dextran 70 kDa marqué au FITC, dilué dans de l'EBM-2 supplémenté de 1% de BSA, à une concentration de 1 mg/mL, a ensuite été ajouté dans la chambre supérieure. Le même milieu EBM-2/BSA 1% (sans dextran) a été ajouté dans la chambre inférieure puis les cellules ont été replacées à 37°C, quel que soit leur pré-conditionnement thermique. Toutes les 30 minutes pendant 6h, 100 µL de milieu présent dans la chambre inférieure ont été prélevés et la fluorescence a été mesurée (longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 485 nm et 528 nm respectivement).

Afin de calculer la quantité de dextran dans la chambre inférieure, une gamme de concentration de dextran-FITC a été réalisée en parallèle. Ceci a permis d'établir une courbe standard de la fluorescence mesurée en fonction de la concentration de dextran-FITC. Cette courbe standard a permis d'estimer précisément la quantité de dextran passée à travers la monocouche dans nos conditions expérimentales et ce en fonction du temps et de la température.

## **VI.2. Passage des THP-1 DsRed à travers la monocouche endothéliale**

Afin de modéliser l'étape de transmigration des monocytes à travers la monocouche endothéliale, nous avons réalisé des expériences de diapédèse avec les cellules THP-1 DsRed. Au cours de ces expériences, ce sont des plaques 96 puits « insert » et « réservoir » (Ref. 4582, Essen Bioscience®) qui ont été utilisées, jouant les mêmes rôles que précédemment : chambre supérieure et inférieure respectivement. Néanmoins, les inserts ont ici une porosité plus importante, de 8 µm de diamètre, permettant le passage de cellules telles que les THP-1 DsRed.

Les HCAEC ont tout d'abord étéensemencées dans les inserts, pré-coatés au collagène I, à raison de 6 000 cellules par insert. Puis, les inserts ont été disposés sur des réservoirs, remplis de PBS 1X et placés à 37°C pendant 24h. Un pré-conditionnement thermique de 6h a ensuite été effectué à 37°C ou à 40°C.

Les cellules endothéliales ont été rincées à deux reprises avec du PBS 1X préchauffé à la bonne température puis une suspension cellulaire de THP-1 DsRed a été ajoutée dans l'insert, au-dessus des HCAEC. Les plaques ont ensuite été placées dans l'Incucyte® S3 (Ref. 4763, Incucyte®) à 37°C pendant 24h. Des images du réservoir ont été prises toutes les 30 minutes pendant toute la durée de

l'expérience. Les THP-1 DsRed étant fluorescents, ils ont ensuite été dénombrés sur chaque image et en fonction des conditions afin de quantifier l'effet du pré-conditionnement thermique sur la transmigration des THP-1 DsRed à travers la monocouche endothéliale.

## VII. Test de prolifération

Afin d'étudier l'effet de la température sur la prolifération des cellules endothéliales, nous avons évalué la présence de Ki67 au sein des HCAEC cultivées à 37°C ou à 40°C. En effet, Ki67 est une protéine présente dans toutes les cellules en prolifération. Elle est notamment retrouvée pendant les phases G1, S, G2 mais également pendant la mitose. A l'inverse, elle n'est pas présente au sein des cellules quiescentes. C'est pourquoi Ki67 est utilisée comme marqueur de prolifération.

Au cours de ces expériences, les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C puis une « blessure » a été créée au milieu du tapis cellulaire afin de stimuler la prolifération cellulaire. Les cellules ont ensuite été placées à 37°C ou à 40°C pendant 24h. Elles ont ensuite été fixées avec une solution de PFA (4%, Ref. 18814-10, Polysciences®) puis immunomarquées avec un anticorps dirigé contre le marqueur de prolifération Ki67 (Ref. 9129, Cell Signaling®). Les étapes de l'immunomarquage sont les mêmes que celles décrites précédemment dans la **Partie III.2.2**. L'acquisition des images a ensuite été réalisée à l'objectif x20 à l'aide du microscope Axio Imager Z7 (Zeiss®) et la quantification de la protéine Ki67 a été effectuée à l'aide du logiciel Image J® et de son extension Fiji®.

## VIII. Mesure de la température par différentes méthodes

Dans cette partie, nous avons voulu déterminer si la température pouvait varier localement dans des zones de perturbations hémodynamiques. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi de travailler sur des modèles *ex vivo*, *in vitro* et *in vivo* comprenant une bifurcation.

### VIII.1. Mesure *ex vivo* de la température par caméra thermique infrarouge

Au cours de ces expériences, réalisées sur des systèmes microfluidiques linéaires ou branchés, les variations thermiques liées au flux ont été cartographiées à l'aide d'une caméra thermique infrarouge (Ref. A310, FLIR®).

Une solution aqueuse a été mise en circulation à 10 dyn.cm<sup>2</sup> dans des  $\mu$ -slides laminaires ou comprenant une bifurcation. Les images ont été enregistrées pendant toute la durée de l'expérience

à l'aide de la caméra thermique infrarouge. Les températures de surface au sein des deux  $\mu$ -slides ont ensuite été comparées.

La même expérience a également été réalisée avec une bifurcation imprimée en trois dimensions à partir des données 3D obtenues par imagerie par résonance magnétique (IRM) d'une carotide humaine. Cette fois-ci, les températures de la partie laminaire et de la zone de bifurcation ont été comparées.

## VIII.2. Mesure de la température par IRM

Pour définir de manière plus précise les variations thermiques pouvant avoir lieu au sein des bifurcations artérielles *ex vivo*, nous avons eu recours à la technique d'IRM en collaboration avec la plateforme d'imagerie FRIM (Hôpital Bichat) et l'aide du Dr. Sinkus. Pour cela, la bifurcation 3D reproduisant la géométrie d'une carotide humaine a été utilisée et intégrée dans un tube externe rempli d'une solution riche en eau et en lipides. Cet ensemble est appelé « fantôme ».

Lors de nos expériences, ce fantôme a été réchauffé à 37°C puis une solution aqueuse, préchauffée à cette même température, a été injectée dans le système à l'aide d'une pompe thermostatique. Une cartographie de température a ensuite été établie par spectroscopie par résonance magnétique (SRM) à l'aide d'un scanner préclinique T7 (Bruker®). Pour ce faire, nous avons utilisé le décalage qui existe entre la fréquence de résonance du groupement méthylène (-CH<sub>2</sub>), qui est thermo-insensible, et la fréquence de résonance des protons H<sup>+</sup> de l'eau, qui est thermosensible (Liu *et al.*, 2014). Le calibrage du décalage permet d'obtenir une température absolue dans un large champ de vision, avec une résolution importante et de surmonter les problèmes d'inhomogénéités de champ, présentes dans les méthodes classiques d'IRM.

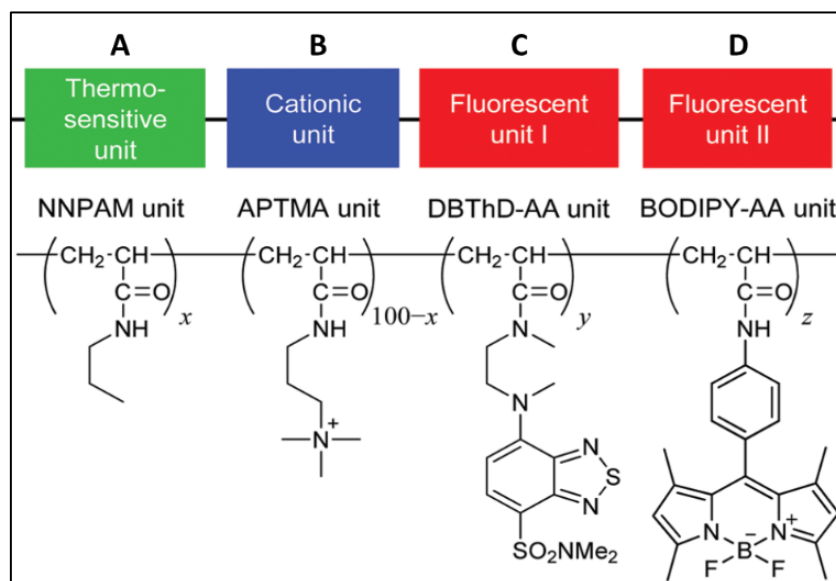
Parallèlement à ces expériences *ex vivo*, nous avons également réalisé les mêmes expériences *in vivo* en tentant d'établir des cartographies de température au niveau du sinus carotidien de souris C57Bl/6 anesthésiées à l'isofluorane. En effet, le méthylène est un groupement moléculaire omniprésent et hautement représenté dans les tissus des mammifères, nous permettant d'effectuer ces expériences d'IRM *in vivo*.

## VIII.3. Utilisation d'une sonde thermique

### VIII.3.1. Structure de la sonde

Des hétérogénéités thermiques existent à l'échelle subcellulaire. Afin d'étudier ces hétérogénéités, une sonde thermique (Ref. FDV-0005, Funakoshi®) a été utilisée *in vitro*. Cette sonde est constituée de quatre sous-unités (**Figure 24**) :

- Une sous-unité lui conférant une sensibilité à la température (**Figure 24A**).
- Une sous-unité cationique (**Figure 24B**).
- Une sous-unité fluorescente dont l'intensité de fluorescence est dépendante de la température (**Figure 24C**).
- Une sous-unité fluorescente dont l'intensité de fluorescence est indépendante de la température (**Figure 24D**).



**FIGURE 24** : STRUCTURE DE LA SONDE THERMIQUE UTILISÉE *IN VITRO*.

Ainsi, en évaluant le ratio des fluorescences des deux sous-unités thermo-dépendante et thermo-indépendante, nous pouvons établir une cartographie thermique relativement précise.

### VIII.3.2. Traitement des cellules

Les cellules endothéliales (HCAEC ou Telo-HCAEC) ont étéensemencées en plaque 96 puits (Ref. 655096, Greiner®) et placées à 37°C. Après 24h de prolifération, les cellules ont été rincées à deux

reprises dans une solution de glucose 5% ou de KCl 150 mM puis elles ont été placées en contact avec une solution contenant la sonde thermique pendant 10 minutes à température ambiante. Différentes concentrations ainsi que différentes solutions de dilution de la sonde ont été testées et sont répertoriées dans le **Tableau 13**. Par la suite, les cellules ont été rincées trois fois avec du milieu de culture complet.

Concentration de la sonde testée	Solution de dilution de la sonde testée	Condition de culture testée	Type cellulaire testé	Température testée
10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Glucose 5%	Statique	HCAEC	De 25°C à 45°C avec un pas de 2°C
5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	KCl 150 mM	Flux laminaire (10 dyn.cm <sup>2</sup> )	Telo-HAEC	
2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Milieu de culture complet			
1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$				

**TABLEAU 13** : RÉSUMÉ DES CONDITIONS TESTÉES LORS DE L'UTILISATION DE LA SONDE THERMIQUE.

### VIII.3.3. Lecture de fluorescence

Afin de vérifier le bon fonctionnement de la sonde thermique, les fluorescences ont été enregistrées en réponse à une gamme de température. Pour cela, la plaque de culture a été placée dans l'INCell 2200 sur un chauffe-plaque. La température a été réglée tout d'abord sur 25°C et la plaque a été maintenue pendant 30 minutes sur le chauffe-plaque. Après stabilisation complète de la température, les images ont été acquises avec une longueur d'ondes d'excitation de 458 nm et des longueurs d'ondes d'émission égales à 510 nm et 580 nm. Une augmentation progressive de la température a ensuite été appliquée avec stabilisation de chaque température pendant 30 minutes avant acquisition des images. Les ratios de fluorescence ont ensuite été calculés afin de valider le fait que la température ainsi calculée correspondait bien à la température imposée à nos cellules.

La même expérience a également été menée en condition de flux laminaire (10 dyn.cm<sup>2</sup>) pour déterminer le bon fonctionnement de la sonde dans ces conditions.



## IX. Organes isolés

### IX.1. Prélèvement des artères iliaques et montage

Des rats mâles Wistar Han ont été anesthésiés par voie intrapéritonéale avec un mélange de kétamine (80mg/kg) et xylazine (20mg/kg) puis exsanguinés. Les artères iliaques ont été rapidement prélevées puis placées dans une solution de Krebs, constamment oxygénée avec du carbogène (95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub>). La composition de cette solution est décrite dans le **Tableau 14**. Les artères iliaques ont été soigneusement nettoyées et découpées afin d'obtenir des anneaux de 2 mm environ. Ces anneaux ont ensuite été placés entre deux crochets : un crochet fixé à la cuve, permettant la stabilité de l'anneau et un crochet mobile, relié à un capteur et permettant de mesurer la tension développée par l'artère au cours de l'expérience. Cet ensemble crochet/capteur a ensuite été placé à l'intérieur d'une cuve de 10 mL remplie de solution de Krebs, disposant d'un système de gestion des liquides. Cela afin de vider et remplir les cuves facilement et de maintenir la température à 37°C tout au long de l'expérience.

Composant de la solution de Krebs	Concentration
NaCl	119 mM
KCl	4.7 mM
MgSO <sub>4</sub>	1.2 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2 mM
CaCl <sub>2</sub>	2.5 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25 mM
D-Glucose	11 mM

**TABLEAU 14 : COMPOSITION DE LA SOLUTION DE KREBS.**

### IX.2. Protocole de réactivité vasculaire et sélection des vaisseaux

Une fois dans les cuves, les anneaux ont été soumis à une tension de 1g. Une phase de stabilisation d'une heure a ensuite été effectuée avant de réaliser un protocole de réactivité vasculaire. Dans un premier temps, afin de tester la qualité des cellules musculaires lisses, une solution de KCl (50 mM final) a été injectée dans la cuve entraînant ainsi la contraction des cellules musculaires lisses. Une fois la contraction maximale obtenue (après environ 15 minutes), un lavage de 30 minutes a été effectué afin d'éliminer toute trace de KCl. La tension des vaisseaux est alors revenue peu à peu à la valeur de

base. Dans un second temps, une solution de phényléphrine (1  $\mu$ M final) a été injectée dans la cuve entraînant ainsi une nouvelle contraction. Afin de tester la viabilité et la fonctionnalité de l'endothélium, des concentrations croissantes d'acétylcholine (de  $10^{-10}$  M à  $10^{-6}$  M) ont été injectées dans la cuve toutes les 2 minutes. L'acétylcholine est connue pour stimuler la eNOS, permettant ainsi de libérer du NO et d'induire une vasorelaxation des vaisseaux, concentration dépendante. Les vaisseaux qui ont été pré-contractés à la phényléphrine et dont la réponse vasorelaxante est supérieure ou égale à 50% ont été retenus pour la suite du protocole.

### IX.3. Conditions expérimentales

Au début de l'expérience, les artères ont été placées à 37°C ou à 40°C pendant 4h. Par la suite, le pourcentage de vasorelaxation en réponse à l'acétylcholine a été mesuré comme expliqué précédemment afin de déterminer si la température a un effet sur cette vasorelaxation.

## X. Analyses statistiques

Tous les résultats présentés dans ce manuscrit sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  l'erreur standard de la moyenne (SEM). L'analyse statistique des résultats d'expression génique obtenus par TLDA a été réalisée par l'équipe de « Statistiques » de Sanofi sur le site de Chilly-Mazarin. L'analyse de tous les autres résultats a été effectuée avec le logiciel GraphPad Prism 8. Pour la comparaison entre deux groupes, le test-t de Student a été utilisé. Les différences ont été considérées significatives lorsque le résultat du test statistique utilisé indiquait  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*),  $p \leq 0.0005$  (\*\*\*),  $p \leq 0.0001$  (\*\*\*\*) et non significatives si  $p > 0.05$ .

# RÉSULTATS

# RÉSULTATS

---

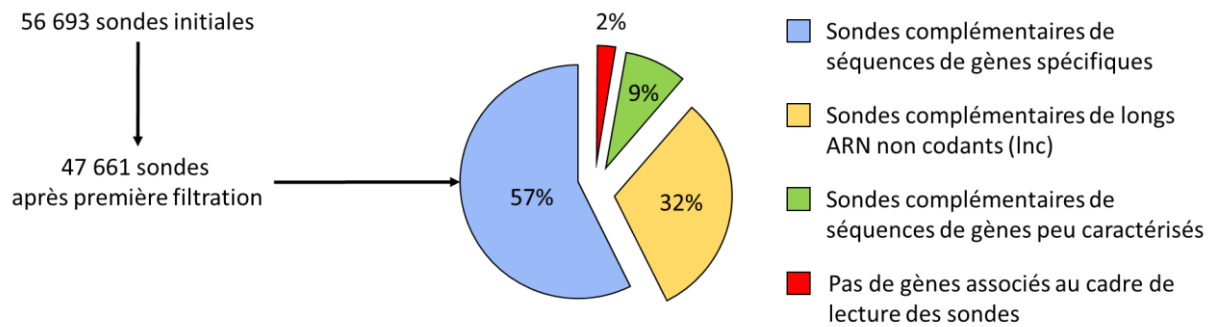
## I. Réponse thermique des cellules endothéliales

Dans cette première partie, nous avons tenté d'identifier et d'explorer les voies de signalisation déclenchées par les cellules endothéliales en réponse à une augmentation de température. Nous nous sommes tout d'abord concentrés sur le transcriptome de ces cellules puis nous avons tenté d'explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents par l'intermédiaire de différentes méthodes.

### I.1. Voies de signalisation modulées en réponse à une augmentation de la température

#### I.1.1. Analyse de l'expression génique par microarray

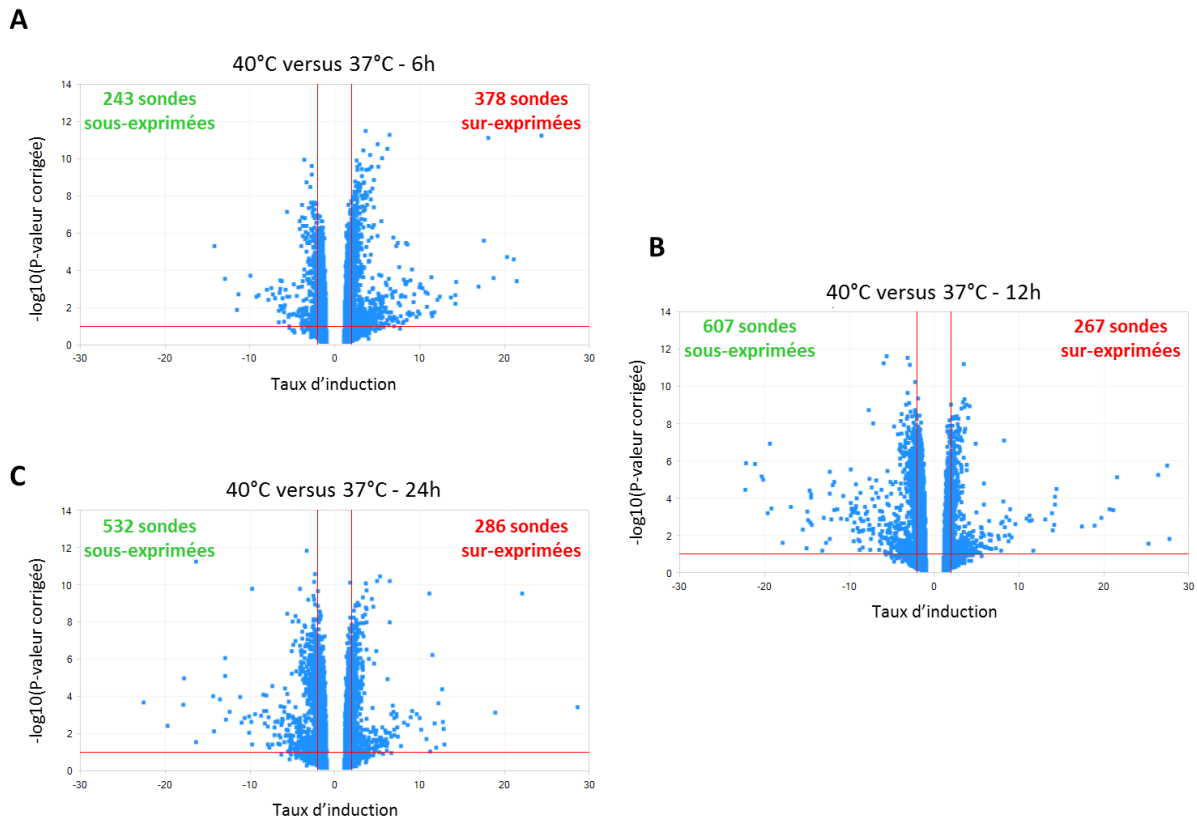
Nous avons commencé par analyser en *microarray* le transcriptome des HCAEC en réponse à une augmentation de température. Le but étant d'identifier des cibles potentielles permettant de décrypter au mieux la signalisation mise en place par ces cellules pour s'adapter au stress thermique. Les puces à ADN utilisées contenaient près de 57 000 sondes permettant de suivre l'expression d'environ 50 000 gènes. Afin de faciliter l'analyse des données, une première filtration des résultats a été effectuée afin de retirer toutes les sondes non annotées et non validées dans les bases de données NCBI et *Ensembl*. Parmi les sondes restantes (**Figure 25**), 57% étaient complémentaires de séquences de gènes spécifiques, connus et bien décrits dans la littérature. 32% des sondes étaient complémentaires des longs ARN non codants (lnc), c'est-à-dire des ARN issus de la transcription de l'ADN mais non traduits en protéines. Enfin, 9% des sondes étaient complémentaires de séquences de gènes encore peu caractérisés dans la littérature et 2% étaient complémentaires de séquences ne codant aucun gène.



**FIGURE 25 : RÉPARTITION DES GÈNES EXPRIMÉS PAR LES HCAEC EN RÉPONSE À LA TEMPÉRATURE.**

*Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 6h, 12h et 24h. Leurs ARN totaux ont été extraits et des microarrays ont été effectués avec les puces à ADN « SurePrint G3 Human Gene Expression v3 8x60K ». Ces données ont été générés à partir des expressions géniques obtenues en microarray et du logiciel ArrayStudio®.*

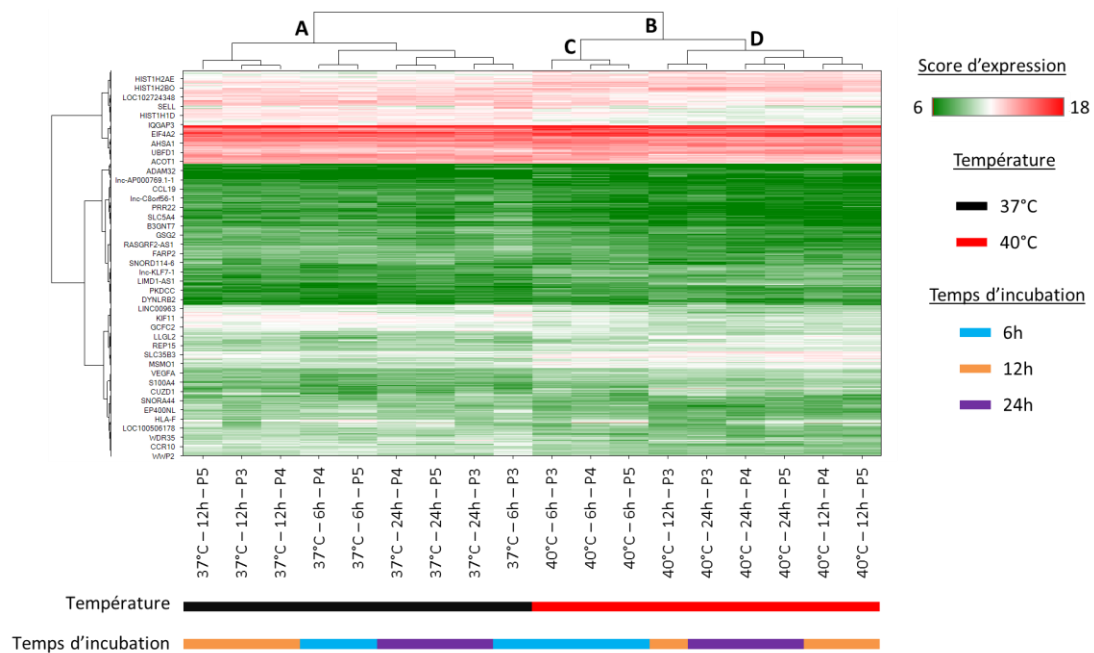
Une normalisation ainsi qu'une deuxième filtration des données ont été effectuées afin de ne garder que les gènes dont l'expression est fortement modulée par la température. Des analyses statistiques ANOVA ont été réalisées et les résultats ont été exprimés sous forme de volcano plot (**Figure 26**), permettant de combiner effet statistique et effet biologique pour chaque gène. Nous avons donc pu identifier les gènes différemment exprimés entre 37°C et 40°C pour chaque temps d'incubation.



**FIGURE 26 : VOLCANO PLOT ISSUS DES ANALYSES STATISTIQUES ANOVA.**

Chaque analyse a été réalisée avec le logiciel ArrayStudio®, en comparant les échantillons soumis à 40°C avec ceux soumis à 37°C pendant 6h (A), 12h (B) ou 24h (C) et en définissant des taux d'induction  $\geq 2$  ou  $\leq -2$  et une P-valeur corrigée  $\leq 0,05$ . L'axe des ordonnées des volcano plot représente  $-\log_{10}$  (P-valeur corrigée). Si ces valeurs sont supérieures à 0,05, l'effet de la température est considéré comme étant statistiquement significatif. L'axe des abscisses représente le niveau d'induction des gènes. Plus les valeurs s'éloignent de 0, plus les gènes sont différentiellement exprimés et inversement. Lorsque les valeurs sont inférieures ou égales à -2, l'expression des gènes diminue à 40°C alors que des valeurs supérieures ou égales à 2 indiquent une augmentation de leur expression à 40°C. Pour des valeurs comprises entre -2 et 2, l'expression des gènes est considérée comme inchangée.

Le nombre de gènes dont l'expression est modulée varie en fonction du temps d'incubation des cellules à 40°C (6h, 12h ou 24h). Après 6h à 40°C (Figure 26A), le nombre de gènes sur-exprimés est plus élevé qu'après 12h (Figure 26B) ou 24h (Figure 26C). Au contraire, le nombre de gènes sous-exprimés est plus faible. Combinées ensemble, ces analyses ont permis d'isoler un total de 1526 gènes uniques que nous avons ensuite compilés dans un arbre hiérarchique (Figure 27) afin de regrouper les échantillons en fonction de leur profil d'expression génique.



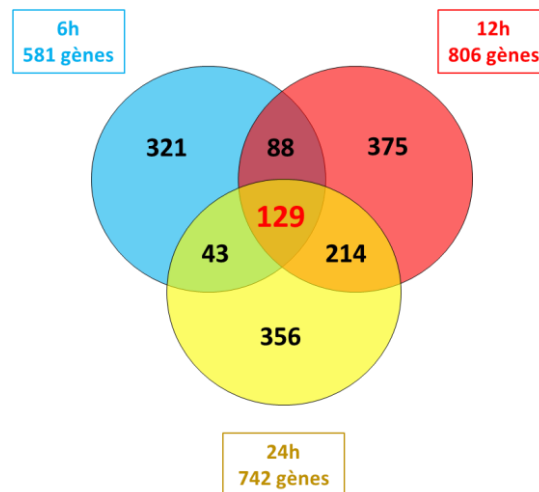
**FIGURE 27 : ANALYSE HIÉRARCHIQUE NON SUPERVISÉE DES DONNÉES DE MICROARRAY.**

Ce dendrogramme a été généré par le logiciel ArrayStudio®. Il représente, en colonne, chaque échantillon et, en ligne, chacun des 1526 gènes. Cette représentation permet de déterminer les liaisons existantes entre les échantillons et entre les gènes et leur niveau de proximité, grâce à la hauteur des branches. Plus la hauteur est faible et plus les échantillons/gènes sont proches et inversement. L'analyse hiérarchique non supervisée a permis d'identifier deux grands clusters et deux sous-clusters. Le cluster **(A)** regroupe les échantillons ayant été soumis à 37°C et le cluster **(B)** ceux soumis à 40°C. Le sous-cluster **(C)** regroupe les échantillons ayant été soumis à 40°C pendant 6h alors que le sous-cluster **(D)** regroupe ceux soumis à 40°C pendant 12h et 24h.

Au sein de cet arbre hiérarchique, nous observons la formation de deux grands clusters (**Figure 27A et 27B**). Chaque cluster regroupe les échantillons ayant été soumis à une température donnée, 37°C d'une part et 40°C d'autre part. Concernant les différents temps d'incubation, davantage de variabilité est observée. Néanmoins, à 40°C, les échantillons correspondant au temps d'incubation 6h (**Figure 27C**) sont regroupés dans un seul et même cluster alors que ceux correspondant aux temps d'incubation 12h et 24h (**Figure 27D**) sont regroupés dans un cluster différent. Cela conforte les analyses ANOVA effectuées précédemment dans lesquelles nous avons noté une différence d'expression génique entre 6h d'une part et 12h et 24h d'autre part.

Si l'on s'intéresse à la répartition de ces gènes en fonction des différents temps d'incubation (**Figure 28**), nous pouvons noter que la grande majorité d'entre eux est spécifique d'un seul et même temps. Certains sont communs deux à deux et seulement 129 gènes sont communs aux trois temps

d'incubation. Nous pouvons également observer qu'il y a davantage de gènes communs (214) entre les temps d'incubation 12h et 24h qu'entre les autres temps, pris deux à deux.



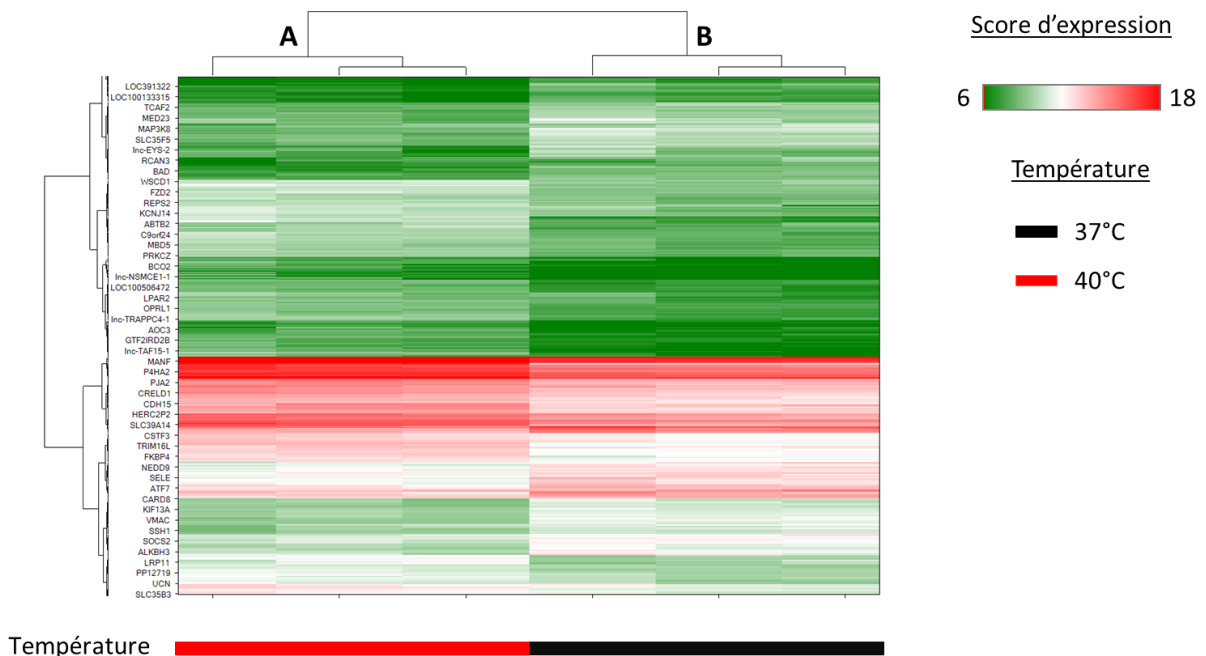
**FIGURE 28 : DIAGRAMME DE VENN REGROUPANT LES 1526 GÈNES DIFFÉRENTIELLEMENT EXPRIMÉS ENTRE 37°C ET 40°C.**

Le diagramme de Venn a été généré par le logiciel ArrayStudio®. C'est une représentation permettant d'établir des relations entre différents groupes. Ici, le cercle bleu représente les gènes différentiellement exprimés à 6h, le cercle rouge, à 12h et le cercle jaune, à 24h. Les régions où les cercles se chevauchent représentent les gènes communs aux cercles correspondants et donc, aux temps d'incubation associés.

Lorsque nous analysons les gènes différentiellement exprimés après 12h et 24h à 40°C, nous notons une forte induction des gènes codants les histones (notamment les gènes HIST1, HIST2 et HIST3, Cf. **Annexe II, Tableau 30**). Ces gènes codent pour des protéines associées à l'ADN, permettant notamment la condensation et de la décondensation de la chromatine (Pardal, Fernandes-Duarte and Bowman, 2019). Elles contrôlent donc l'accès de certains facteurs de transcription au niveau des promoteurs géniques, permettant d'induire ou de réprimer l'expression de nombreux gènes. A ces temps tardifs, nous pouvons notamment observer une diminution de l'expression des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et dans la prolifération, tels que les *Cell Division Cycle* (CDC) ou le marqueur de prolifération Ki67. Nous observons également une modulation de quelques gènes liés à la mort cellulaire, notamment *Bcl-2 Associated Agonist of Cell Death* (BAD). Ces modulations géniques suggèrent qu'à des temps d'incubation tardifs, les HCAEC semblent arrêter leur cycle cellulaire, bloquer leur prolifération et entrer en état de quiescence et/ou de mort cellulaire.



Après 6h à 40°C, ce sont les HSP qui sont majoritairement induites. Les HSP sont des protéines chaperonnes, intervenant majoritairement dans le repliement protéique. En effet, en cas de stress cellulaire tel que le choc thermique, la structure des protéines peut être dénaturée. Le rôle des HSP est alors de prévenir les dommages qui pourraient potentiellement être causés par ce mauvais repliement tridimensionnel (Ellis, van der Vies and Hemmingsen, 1989). A ce temps précoce, les HCAEC semblent donc mettre en place un profil d'expression génique spécifique permettant d'induire des mécanismes d'adaptation au stress thermique. Nous avons donc décidé de nous concentrer exclusivement sur ce temps d'activation précoce 6h et de travailler avec une base de 581 gènes (**Figure 28**), dont l'expression est bien modulée par la température (**Figure 29**).



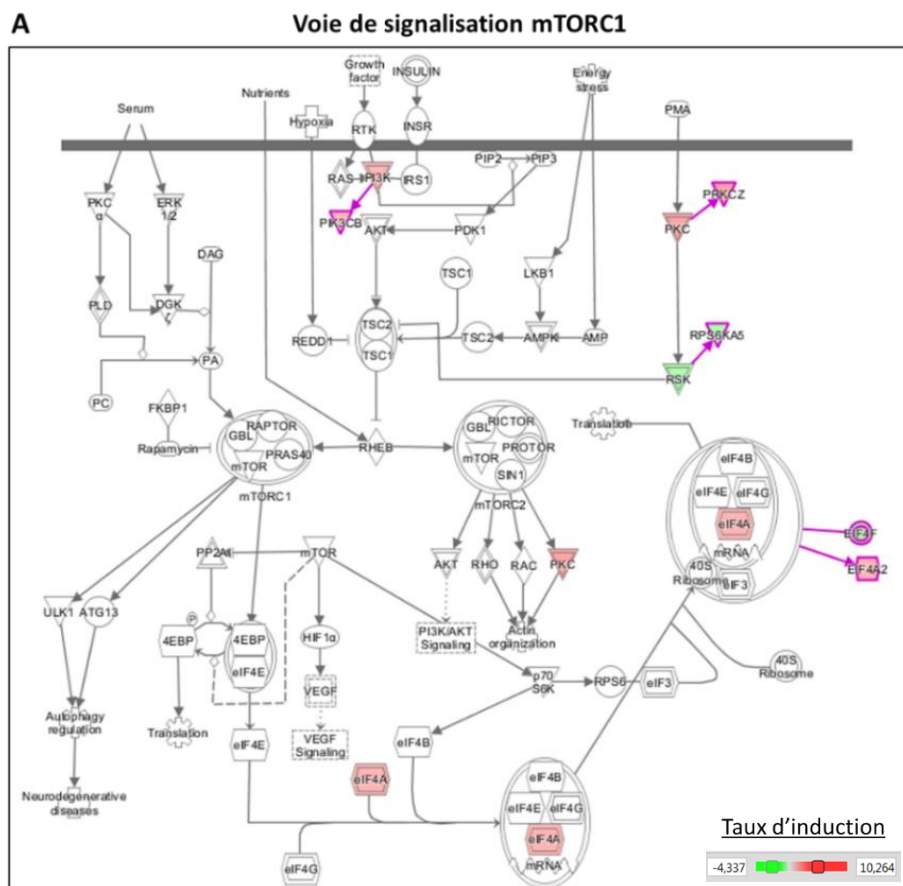
**FIGURE 29 : ANALYSE HIÉRARCHIQUE NON SUPERVISÉE DES 581 GÈNES MODULÉS À 6H.**

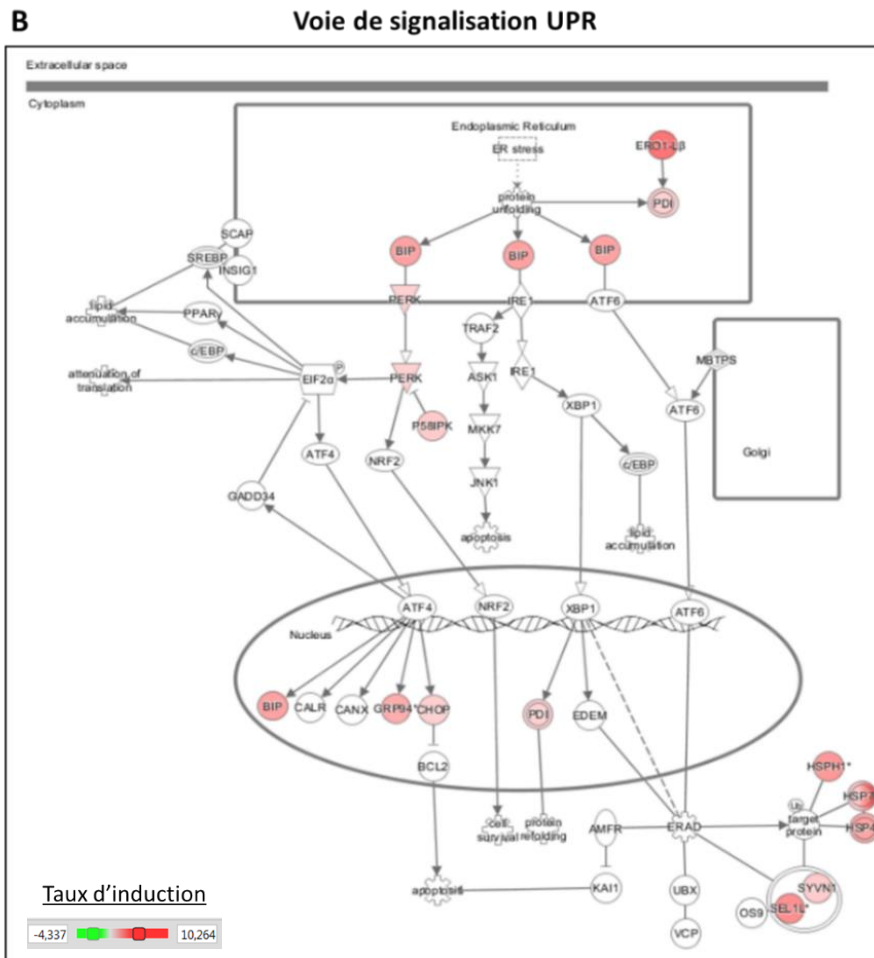
Ce dendrogramme a été généré par le logiciel ArrayStudio®. Il représente, en colonne, chaque échantillon et, en ligne, chacun des 581 gènes modulés après 6h à chaque température. Cette représentation permet de déterminer les liaisons existantes entre les échantillons et entre les gènes et leur niveau de proximité, grâce à la hauteur des branches. Plus la hauteur est faible et plus les échantillons/gènes sont proches et inversement. Cette analyse hiérarchique non supervisée a permis d'identifier deux clusters : le cluster **(A)** regroupant les échantillons ayant été soumis à 40°C pendant 6h et le cluster **(B)** regroupant ceux soumis à 37°C pendant 6h.

## I.1.2. Identification des voies de signalisation

Le logiciel *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) permet de modéliser les données transcriptomiques en analysant et en intégrant les données d'expression obtenues en différentes voies de signalisation. Sur la base des 581 gènes modulés par la température, ce type d'analyse a permis d'identifier deux voies de signalisation principales :

- La voie *mammalian Target Of Rapamycin Complex 1* (mTORC1) (**Figure 30A**)
- La voie *Unfolded Protein Response* (UPR) (**Figure 30B**).





**FIGURE 30** : VOIES DE SIGNALISATION PRÉDITES POUR ÊTRE IMPLIQUÉES DANS LA RÉPONSE CELLULAIRE À LA TEMPÉRATURE.

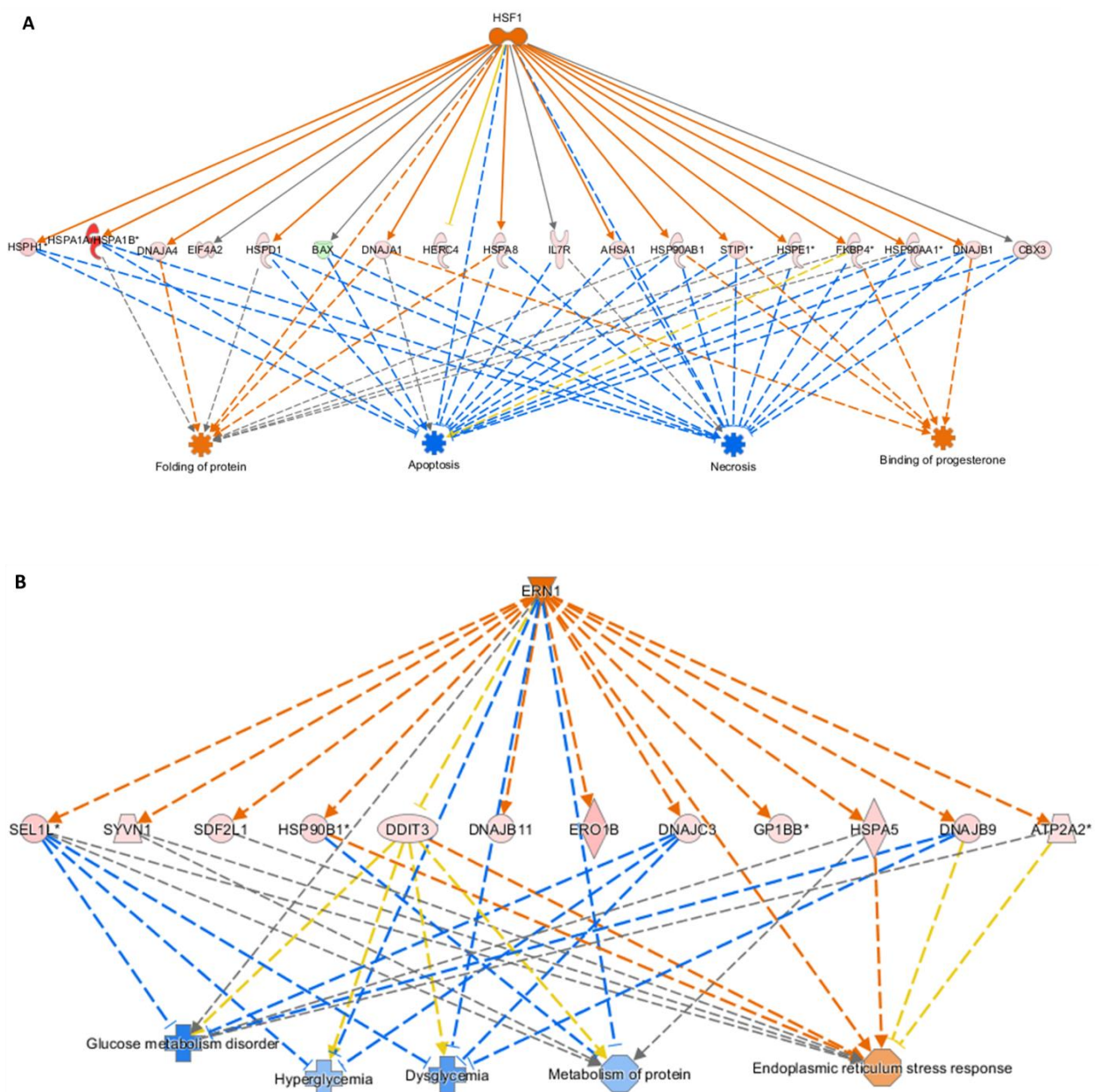
Les 581 gènes ont été intégrés dans le logiciel IPA, permettant de mettre en évidence les voies de signalisation mTORC1 (A) et UPR (B). Les gènes différemment exprimés au sein de ces voies de signalisation sont annotés en rouge lorsque leur expression est augmentée en réponse à la température ou en vert, lorsque leur expression est diminuée.

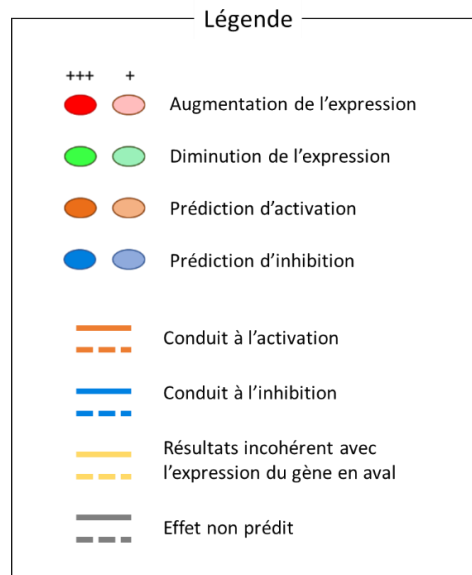
L'expression des gènes modulés par la température et impliqués au sein de la voie de signalisation UPR (Figure 30B) est systématiquement augmentée. Au sein de la voie de signalisation mTORC1 (Figure 30A), la majorité des gènes modulés a également une expression qui augmente mais quelques-uns ont une expression qui est diminuée à 40°C. Pour aller plus loin dans l'exploration de ces voies de signalisation, nous avons analysé quels étaient les facteurs communs à ces différents marqueurs de température.

### I.1.3. Mise en évidence de régulateurs géniques

À partir des expressions obtenues en *microarray* et des bases de données établies grâce aux données de la littérature, le logiciel IPA a permis de prédire, de manière théorique, les interactions qu'il pouvait y avoir entre les différents éléments. Il a notamment permis de mettre en évidence deux régulateurs géniques, placés en amont des voies altérées par la température :

- Le régulateur *Heat Shock Factor 1* (HSF1) (**Figure 31A**)
- Le régulateur *Endoplasmic Reticulum to Nucleus signaling 1* (ERN1) (**Figure 31B**).





**FIGURE 31** : RÉGULATEURS GÉNIQUES PRÉDITS POUR ÊTRE IMPLIQUÉS DANS LA RÉPONSE CELLULAIRE À LA TEMPÉRATURE.

Les 581 gènes intégrés dans le logiciel IPA ont permis de mettre en évidence les régulateurs géniques HSF1 (**A**) et ERN1 (**B**). Les régulateurs ainsi que les différentes fonctions biologiques sont prédits comme étant activés (en orange) ou inhibés (en bleu). Les données d'expression obtenues en microarray sont représentées en rouge lorsque les gènes sont sur-exprimés ou en vert, lorsqu'ils sont sous-exprimés en réponse à une augmentation de température. Plus la couleur est intense, plus l'effet est prononcé et inversement. Les flèches indiquent des interactions connues dans la littérature entre les différents éléments. Leur couleur indique la cohérence entre les données issues de la littérature et les expressions géniques obtenues en microarray.

HSF1 et ERN1 peuvent réguler l'expression de plusieurs gènes, conduisant à la modulation de leur voie de signalisation et des fonctions cellulaires associées. En réponse à la modulation des gènes régulés par HSF1, les mécanismes de mort cellulaire devraient être inhibés tandis que les mécanismes garantissant le repliement correct des protéines devraient être favorisés (**Figure 31A**). En réponse à la modulation des gènes régulés par ERN1, c'est la réponse au stress du réticulum endoplasmique qui devrait être mobilisée (**Figure 31B**).

L'ensemble des données générées par le logiciel IPA est issu d'une analyse bio-informatique et constitue des données théoriques qu'il est nécessaire de vérifier. Néanmoins, elles nous ont fourni un grand nombre de pistes de travail à explorer concernant la réponse des cellules endothéliales à la température, tant au niveau des voies de signalisation impliquées, des régulateurs clés ou encore des nombreux gènes d'intérêt.

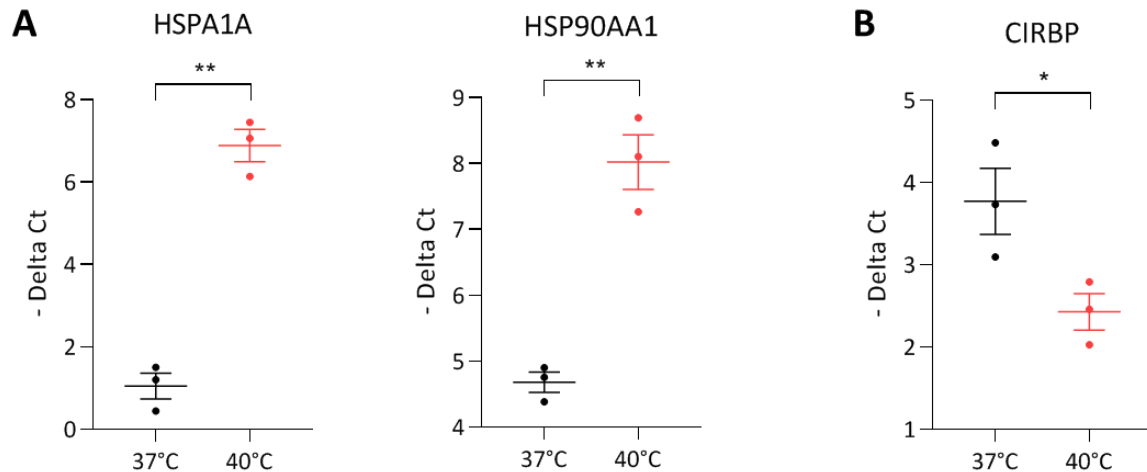
## I.1.4. Confirmation des gènes régulés par la température à 6h

### I.1.4.1. Validation globale des résultats de *microarrays*

La technique de *microarray* est une approche globale et sans à priori permettant d'obtenir une quantification relative des expressions géniques. Pour vérifier la robustesse de cette approche et valider les résultats de manière plus précise, nous avons sélectionné un panel restreint de gènes. Nous nous sommes tout d'abord focalisés sur les 129 gènes communs aux trois temps d'incubation (**Figure 28**). En effet, ces gènes semblent être fortement et durablement impactés par la température étant donné que la variation de leur expression est maintenue dans le temps. À partir de ces 129 gènes et en fonction de la disponibilité des sondes PCR, un panel de 91 gènes a été sélectionné pour être validé par TLDA (**Cf. Annexe I, Tableau 19**). Parmi eux, 41 gènes étaient sur-exprimés en réponse à la température lors des analyses en *microarray* et 50 étaient sous-exprimés (**Cf. Annexe II, Tableau 22**).

Lors des validations par TLDA, l'expression d'un gène a été considérée comme validée si le sens de sa modulation était le même que celui obtenu lors des *microarrays* et si son niveau d'induction était suffisant. Concernant les gènes sur-exprimés en *microarray*, ils ont été considérés comme confirmés lorsque leur niveau d'induction était supérieur ou égal à 2 en TLDA. Pour les gènes sous-exprimés en *microarray*, ils ont été considérés comme confirmés lorsque leur niveau d'induction était inférieur ou égale à 0,5 (expression diminuée de 50%).

Parmi les 91 gènes, près de 59% d'entre eux ont été confirmés (**Cf. Annexe II, Table 22**). De manière générale, nous constatons que les HSP font partie des gènes les plus induits (**Figure 32A**), confirmant les résultats obtenus par *microarray*. Parmi les gènes réprimés, nous retrouvons notamment le gène *Cold Inducible RNA Binding Protein* (CIRBP) codant pour une protéine induite dans la réponse au froid (**Figure 32B**).



**FIGURE 32 : LES HSP ET CIRBP FONT PARTIE DES GÈNES RESPECTIVEMENT LES PLUS INDUITS ET RÉPRIMÉS APRÈS 6H À 40°C.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 6h. Leurs ARN totaux ont été extraits et l'expression de plusieurs gènes a été étudiée par TLDA. Les résultats sont exprimés en – Delta (Ct) en fonction de la température où chaque point représente une expérience. Les valeurs d'expression à 40°C ont été comparées à celles obtenues à 37°C. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM. \*P<0.05 et \*\*P<0.01 entre les groupes indiqués.

Les données générées par *microarray* ont été majoritairement validées par TLDA et ont donc pu être exploitées dans la suite de nos travaux.

#### 1.1.4.2. Détermination d'un panel génique de référence et validation en condition statique

Afin de constituer un ensemble de marqueurs pouvant être utilisé en routine pour monitorer la réponse cellulaire à la température, un panel plus restreint de 42 gènes a été sélectionné (Cf. **Annexe I, Tableau 20**), en se basant essentiellement sur les gènes répartis dans les différentes voies de signalisation identifiées (mTORC1 et UPR) et/ou régulés par les facteurs HSF1 et ERN1. Nous avons également voulu intégrer à ce panel des gènes modulés dans l'analyse des *microarrays* et impliqués dans des fonctions endothéliales importantes telles que la vasoréactivité, l'adhérence, la coagulation ou encore l'apoptose afin de déterminer si la température pouvait avoir un effet sur ces fonctions. Ce panel de 42 gènes est regroupé en 8 familles (**Tableau 15**).

Gènes régulés par HSF1	Gènes impliqués dans la voie de signalisation UPR et régulés par ERN1	Gènes impliqués dans la voie de signalisation mTORC1	Gènes impliqués dans l'adhérence
AHSA1	ATP2A2	CACYBP	CCL2
BAX	DDIT3	CORO1A	SELE
CBX3	DNAJB9	IDI1	SELPLG
EIF4A2	ERN1	P4HA1	
FKBP4	HSP90B1	PDK1	<b>Autres gènes</b>
HERC4	HSPA5	STARD4	CIRBP
HSF1	SDF2L1	TES	HIST1H2BK
HSP90AA1	<b>Gènes impliqués dans la vasodilatation ou dans la voie de signalisation eNOS</b>	<b>Gènes impliqués dans la coagulation</b>	HSPA4L
HSPA1A			KDM5B
HSPA1B		F2RL2	KLF2
HSPH1		<b>Gènes impliqués dans l'apoptose</b>	PRKACB
IL7R			BAD
STIP1			

**TABLEAU 15 : PANEL GÉNIQUE DE RÉFÉRENCE REGROUPANT LES MARQUEURS DE TEMPÉRATURE.**

42 gènes ont été sélectionnés pour constituer un panel de référence. Ces gènes sont présents dans différentes voies de signalisation (UPR, mTORC1, eNOS), sont régulés par des facteurs spécifiques (HSF1, ERN1) et/ou interviennent dans des fonctions cellulaires spécifiques (adhérence, coagulation, apoptose).

Parmi ces 42 gènes et lors de l'analyse en *microarray*, 25 avaient une expression augmentée en réponse à la température, 12 avaient une expression diminuée et 5 gènes, dont l'expression ne variait pas, ont été ajoutés à notre panel à des fins exploratoires (Cf. Annexe II, Tableau 23).

Lors des vérifications d'expression par TLDA, plus de la moitié des gènes a été validée (Cf. Annexe II, Tableau 23). Parmi eux, nous retrouvons majoritairement les gènes régulés par HSF1, ERN1 et impliqués dans la coagulation. Parmi les gènes les plus induits et réprimés par la température, nous retrouvons à nouveau les HSP et CIRBP respectivement.

À l'inverse, les gènes impliqués dans les voies de signalisation eNOS et mTORC1 ainsi que dans l'apoptose ne sont pas modulés par la température. Dans la limite des gènes que nous avons testés, nous n'avons donc pas pu mettre en évidence l'implication de ces voies de signalisation.

Concernant les gènes impliqués dans l'adhérence, nous remarquons qu'ils ne sont pas majoritairement modulés par la température, ne validant pas les résultats obtenus par *microarray*. Cependant, une tendance à la diminution de l'expression des gènes CCL2 et SELE est observée. Ces gènes codent respectivement pour une chimiokine (MCP-1) et une protéine d'adhérence (Sélectine E), favorisant toutes les deux l'adhérence des monocytes à la surface endothéliale (Nourshargh and Alon, 2014). La



diminution possible de leur expression suggère donc une éventuelle diminution des fonctions d'adhérence des HCAEC à 40°C.

Toutes ces données constituent une première confirmation des prédictions théoriques du logiciel IPA, à savoir l'implication des régulateurs géniques HSF1 et ERN1 dans la réponse cellulaire à la température.

#### I.1.4.3. Validation du panel de référence en condition de flux laminaire

De manière physiologique, les cellules endothéliales sont constamment soumises à un flux sanguin et leur biologie est fortement impactée par les signaux transmis par les multiples récepteurs aux forces de cisaillement qu'elles expriment à leur surface (Davies, 1995). Or, les *microarrays* ainsi que les validations par TLDA ont été effectués en cultivant les cellules en condition statique. Nous avons donc réalisé des expériences complémentaires avec des cellules endothéliales soumises à un flux laminaire pour explorer l'effet de la température dans ces conditions.

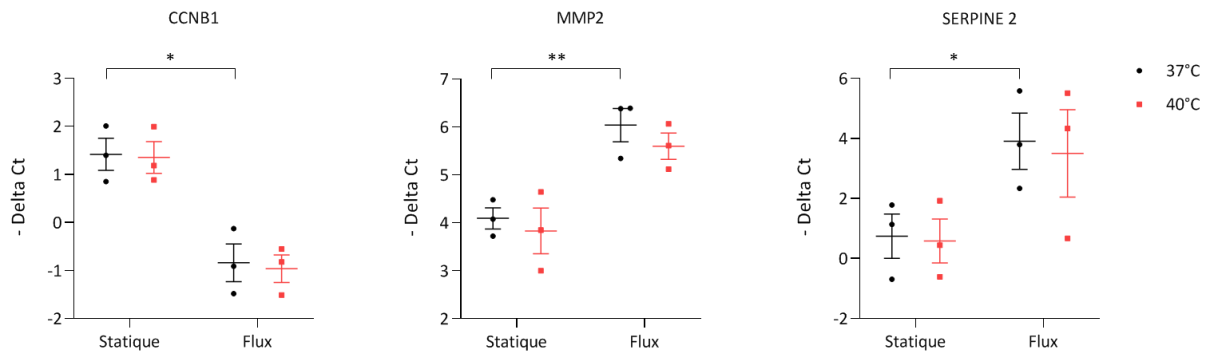
Dans un premier temps, nous avons vérifié que le système permettant de cultiver les cellules endothéliales en flux modulait correctement les gènes connus pour être induits par les forces de cisaillement (Cf. **Annexe I, Tableau 21**). Pour cela, nous nous sommes appuyés sur les travaux de Wasserman et al. (Wasserman *et al.*, 2002) et de Chien Shu et al. (Chien Shu, Li Song and Shyy John Y-J., 1998) qui ont identifié plusieurs gènes modulés par les forces de cisaillement (à 10 dyn.cm<sup>2</sup>). Parmi eux, nous en avons sélectionné 28, appartenant à différentes familles et différentes voies de signalisation (**Tableau 16**), pour vérifier que les expressions géniques obtenues dans nos conditions de flux coïncidaient bien avec les données publiées.

<b>Gènes impliqués dans la vasomodulation</b>	<b>Gènes impliqués dans l'adhérence / l'inflammation</b>	<b>Gènes impliqués dans la coagulation</b>
EDN1	CXCR4	SERPINE1
EDNRA	ICAM1	SERPINE2
EDNRB	IL1RL1	THBD
NOS3	SELE	
	VCAM1	<b>Autres gènes</b>
<b>Facteurs de croissance</b>	<b>Gènes impliqués dans le stress cellulaire</b>	BMP6
ANGPT2	NDRG1	CCNB1
ENG	NQO1	HEY2
PGF	PPP1R15A	ID3
TGFB1	SOD1	JAG2
<b>Prostaglandines</b>		MMP2
PTGS2		SNAI1

**TABLEAU 16** : PANEL DE GÈNES RÉGULÉS PAR LES FORCES DE CISAILLEMENT D'APRÈS WASSERMAN ET AL. ET CHIEN SHU ET AL.

28 gènes ont été sélectionnés pour vérifier l'impact des conditions de flux sur leur expression. Ces gènes font partie de plusieurs familles (facteurs de croissance, prostaglandines) et sont impliqués dans différentes fonctions cellulaires (vasomodulation, adhérence, inflammation, coagulation, stress cellulaire).

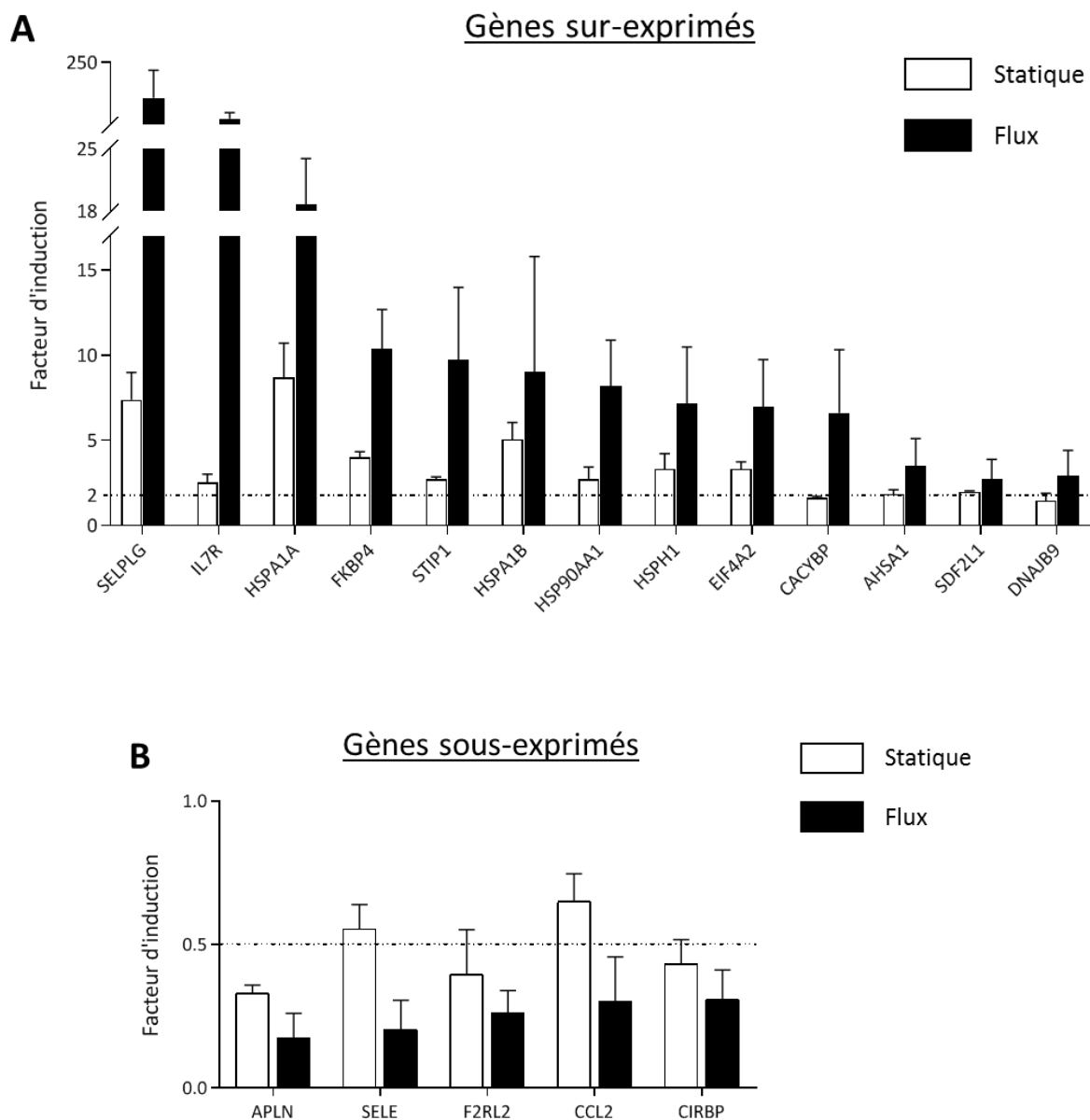
Après 24h en condition de flux, 71% des gènes présélectionnés sont modulés en réponse aux forces de cisaillement conformément aux données de la littérature (Cf. **Annexe II, Tableau 24**). Sur ces mêmes gènes, nous avons étudié l'effet de la température et nous avons constaté que la majorité d'entre eux n'était pas modulés à 40°C (Cf. **Annexe II, Tableau 24** et **Figure 33**), validant nos conditions de flux et confirmant également la spécificité de la réponse cellulaire à la température.



**FIGURE 33 : LES GÈNES MODULÉS PAR LES FORCES DE CISAILLEMENT NE SONT PAS MODULÉS PAR LA TEMPÉRATURE.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique ou en condition de flux laminaire ( $10 \text{ dyn.cm}^2$ ) pendant 24h puis soumises à  $37^\circ\text{C}$  ou à  $40^\circ\text{C}$  pendant 6h. Leurs ARN totaux ont été extraits et l'expression de plusieurs gènes a été étudiée par TLDA. Les résultats sont exprimés en  $-\Delta\text{Delta Ct}$  en fonction des conditions de culture (statique ou flux) où chaque point représente une expérience. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM. \* $P < 0.05$  et \*\* $P < 0.01$  entre les groupes indiqués.

Nous avons ensuite constaté que les gènes induits par la température en condition statique étaient également induits par la température en condition de flux (Cf. **Annexe II, Tableau 23**). Les gènes qui étaient sur-exprimés en condition statique à  $40^\circ\text{C}$  le sont davantage en condition de flux (**Figure 34A**) et inversement pour les gènes qui étaient sous-exprimés (**Figure 34B**).



**FIGURE 34** : LE FLUX EXACERBE LES DIFFÉRENCES D'EXPRESSION GÉNIQUE EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE.

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique ou en condition de flux laminaire ( $10 \text{ dyn.cm}^2$ ) pendant 24h puis soumises à  $37^\circ\text{C}$  ou à  $40^\circ\text{C}$  pendant 6h. Leurs ARN totaux ont été extraits et l'expression de plusieurs gènes a été étudiée par TLDA. Chaque valeur d'expression obtenue à  $40^\circ\text{C}$  a été normalisée avec celle obtenue à  $37^\circ\text{C}$ , en condition statique ou en condition de flux. Les résultats sont donc exprimés en facteur d'induction en fonction des conditions de culture (statique ou flux) pour chaque gène. **(A)** Gènes dont l'expression est augmentée à  $40^\circ\text{C}$ . **(B)** Gènes dont l'expression est diminuée à  $40^\circ\text{C}$ . Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences  $\pm$  SEM.

Parmi les gènes validés et modulés par la température en condition de flux, nous retrouvons à nouveau les gènes régulés par HSF1 et ERN1. Nous remarquons également que les gènes impliqués dans la voie de signalisation mTORC1, non modulés en condition statique, le sont en condition de flux (notamment CACYBP, CORO1A, IDI1 et STARD4), suggérant une implication de cette voie dans la réponse cellulaire à la température et validant les prédictions établies par le logiciel IPA. Il en est de même pour les gènes impliqués dans l'adhérence (notamment CCL2 et SELE), dont l'expression est modulée en flux à 40°C (Cf. **Annexe II, Tableau 23**).

L'ensemble de ces données consolident le fait que dans des conditions plus physiologiques et en réponse à une augmentation de température, les expressions géniques sont modulées dans le même sens qu'en condition statique, excepté pour mTORC1 où les gènes sont quasi uniquement induits en condition de flux. Néanmoins, par praticité technique, les expériences suivantes ont été majoritairement réalisées en condition statique.

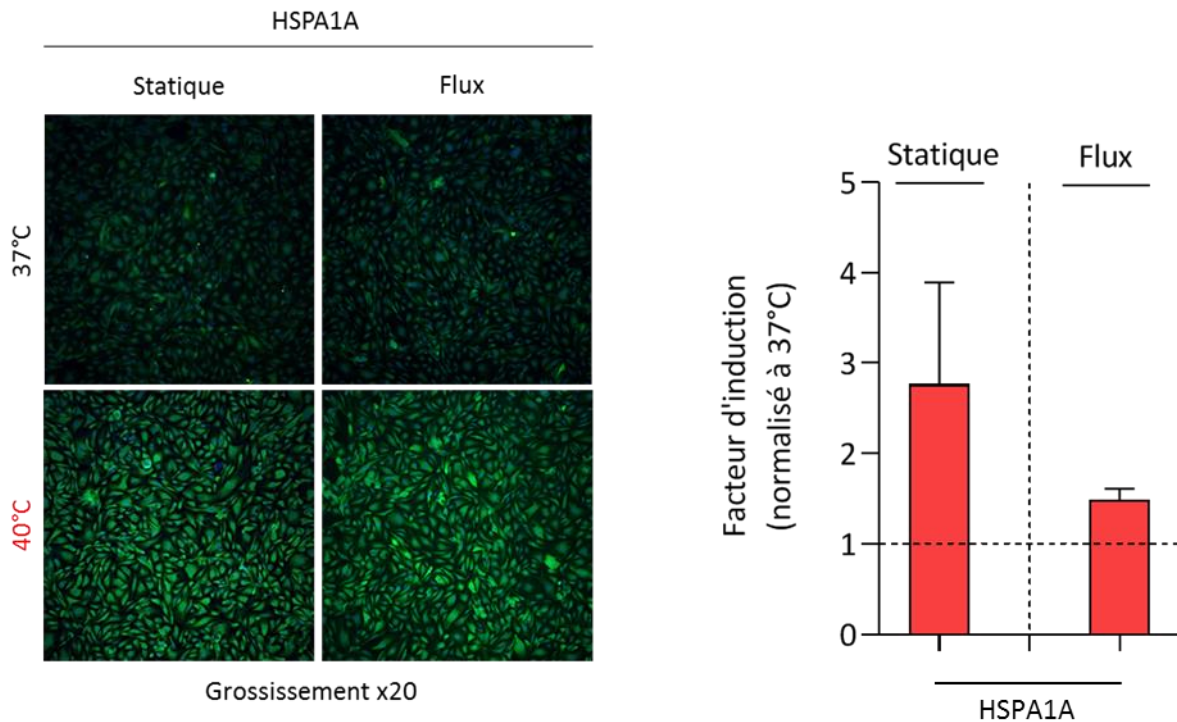
Combinés ensemble, les résultats d'expression génique obtenus en statique et en flux suggèrent une implication des régulateurs HSF1 et ERN1 dans la réponse déclenchée par les HCAEC suite à une augmentation de la température. Ces deux régulateurs ainsi que les voies de signalisation sous-jacentes seront donc étudiés en détail dans les prochains chapitres, tout comme la voie de signalisation mTORC1 qui semble également être impliquée, notamment lorsque les HCAEC sont soumises à des forces de cisaillement.

En ce qui concerne les gènes impliqués dans l'adhérence endothéliale, leur expression diminue, notamment en condition de flux. Ces résultats suggèrent donc une possible diminution de l'adhérence à 40°C. Cette hypothèse a donc été étudiée en **partie II des Résultats**.

Suite aux différentes données obtenues en condition statique et en flux, nous avons pris la décision de retirer du panel de référence tous les gènes n'étant pas validés dans les deux conditions de culture. Dans la suite de l'étude, ce panel de 42 gènes a donc été réduit à 26 gènes.

#### **I.1.4.4. Validation de l'expression protéique des HSP**

Que ce soit lors des analyses de *microarray* ou lors des validations d'expression par TLDA, nous avons pu constater que les HSP faisaient partie des gènes les plus induits à 40°C, en statique comme en flux. C'est pourquoi nous avons voulu vérifier, par immunomarquage, si une différence d'expression protéique était observable entre 37°C et 40°C en condition statique et en condition de flux (**Figure 35**).



**FIGURE 35 : LE NIVEAU D'EXPRESSION PROTÉIQUE DES HSP EST AUGMENTÉ EN CONDITION STATIQUE ET EN CONDITION DE FLUX APRÈS 6H À 40°C.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique ou en condition de flux laminaire ( $10 \text{ dyn.cm}^2$ ) pendant 24h puis soumises à 37°C ou à 40°C pendant 6h. Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et marquées avec des anticorps polyclonaux dirigés contre l'HSPA1A. Pour chaque HSP, l'intensité de fluorescence obtenue a été quantifiée à 40°C et normalisée avec les intensités de fluorescence obtenues à 37°C. Les résultats obtenus sont donc exprimés en facteur d'induction en fonction de chaque HSP. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 2 expériences +/- SEM.

Nous nous sommes focalisés sur HSPA1A qui avait un fort niveau d'induction et nous remarquons qu'en réponse à une élévation de la température, le niveau d'expression protéique de cette HSP augmente, en condition statique comme en condition de flux. Ces résultats confirment donc les données obtenues précédemment et consolident, une fois de plus, l'implication centrale des HSP dans la réponse des cellules endothéliales placées à 40°C.

## I.2. Étude des voies de signalisation mises en place par les cellules endothéliales

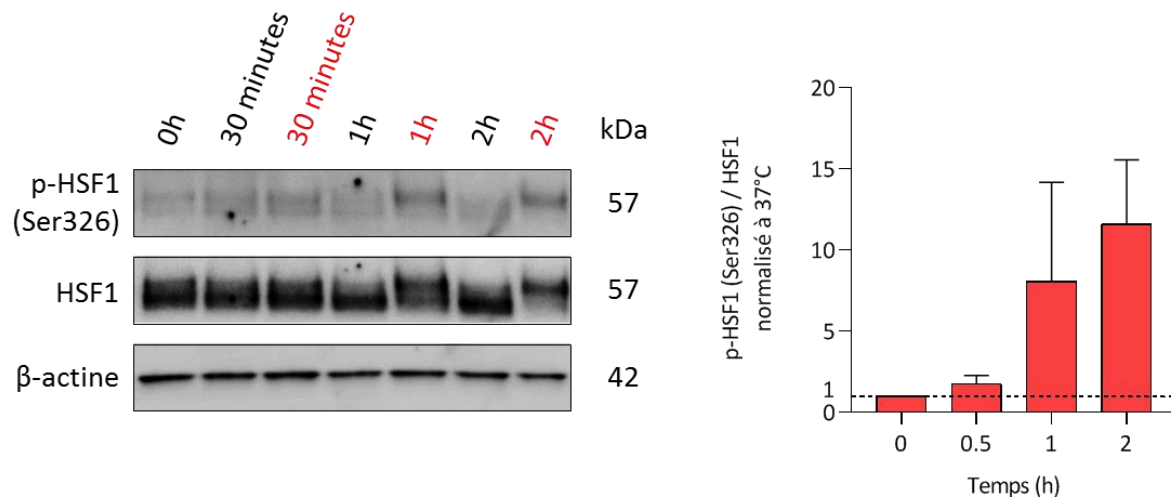
### I.2.1. Implication du régulateur HSF1

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à HSF1 et à son implication dans la réponse cellulaire. L'objectif a été de confirmer que ce régulateur génique était activé suite à une augmentation de température et qu'il jouait un rôle dans la signalisation mise en place par les cellules endothéliales.

HSF1 est un facteur transcriptionnel séquestré dans le cytosol par des interactions avec plusieurs HSP (notamment HSP70 et HSP90). La phosphorylation de certains acides aminés le libère de cette interaction, lui permet d'entrer dans le noyau et de se fixer sur des éléments de réponse HSE (*Heat Shock Elements*) présents sur les promoteurs de nombreux gènes (Dayalan Naidu and Dinkova-Kostova, 2017).

#### I.2.1.1. Étude de la phosphorylation de HSF1

L'activation du facteur HSF1 peut être déclenchée par la phosphorylation de sa sérine 326 (Guettouche *et al.*, 2005). Nous avons étudié cette phosphorylation par western blot en cinétique et en réponse à une augmentation de température (**Figure 36**).



**FIGURE 36 : LA PROTÉINE HSF1 EST PHOSPHORYLÉE EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 0h, 30 minutes, 1h ou 2h. L'expression des protéines p-HSF1, HSF1 et β-actine a été quantifiée par western blot à partir de 9 µg de protéines ayant migré sur un gel « NuPAGE™ Tris-Acetate 3-8% » et ayant été transférés sur une membrane PVDF 0,2 µm. L'expression des protéines p-HSF1 et HSF1 a été normalisée à celle de la β-actine pour s'affranchir des possibles écarts de dépôts puis le rapport de ces deux expressions a permis d'établir une quantification p-HSF1/HSF1 en fonction de la température et du temps d'incubation des HCAEC à chaque température. Les valeurs obtenues à 40°C ont ensuite été normalisées avec celles obtenues pour la condition 37°C pour chaque temps d'incubation. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 5 expériences +/- SEM.

Dans d'autres expériences réalisées séparément, il n'y avait plus de phosphorylation significative de HSF1 après 6h, par rapport aux conditions basales. La phosphorylation de HSF1 augmentant après 2h à 40°C est donc transitoire, suggérant une activation de cette protéine de manière précoce après augmentation de la température.

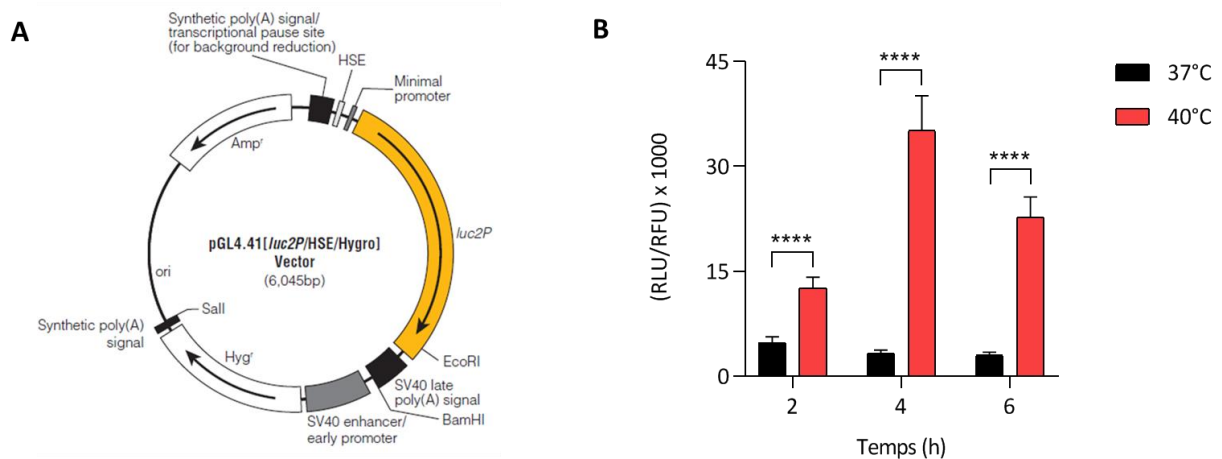
#### 1.2.1.2. Étude de l'activité protéique de HSF1

Nous avons ensuite étudié l'activité promotrice de HSF1, toujours en réponse à une augmentation de température. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser les Telo-HAEC car ces cellules sont plus résistantes que les cellules primaires dans les expériences de transfection que nous devons mener.

Préalablement à cette expérience, nous avons donc vérifié que les Telo-HAEC avaient une réponse à la température similaire à celle des HCAEC, en étudiant l'expression des gènes du panel de référence. Au total, 65% des gènes sont modulés de la même façon dans les Telo-HAEC et dans les HCAEC (Cf. **Annexe II, Tableau 25**). Parmi ces gènes, nous retrouvons bien ceux régulés par HSF1 et ERN1.



Nous avons alors transfecté les Telo-HAEC avec une construction plasmidique dans laquelle l'expression du gène rapporteur luciférase est contrôlée par un promoteur contenant des séquences HSE (**Figure 37A**). La mesure de la luminescence dans ce système expérimental est donc un indicateur de l'activité de HSF1. Les résultats obtenus sont illustrés **Figure 37B**.



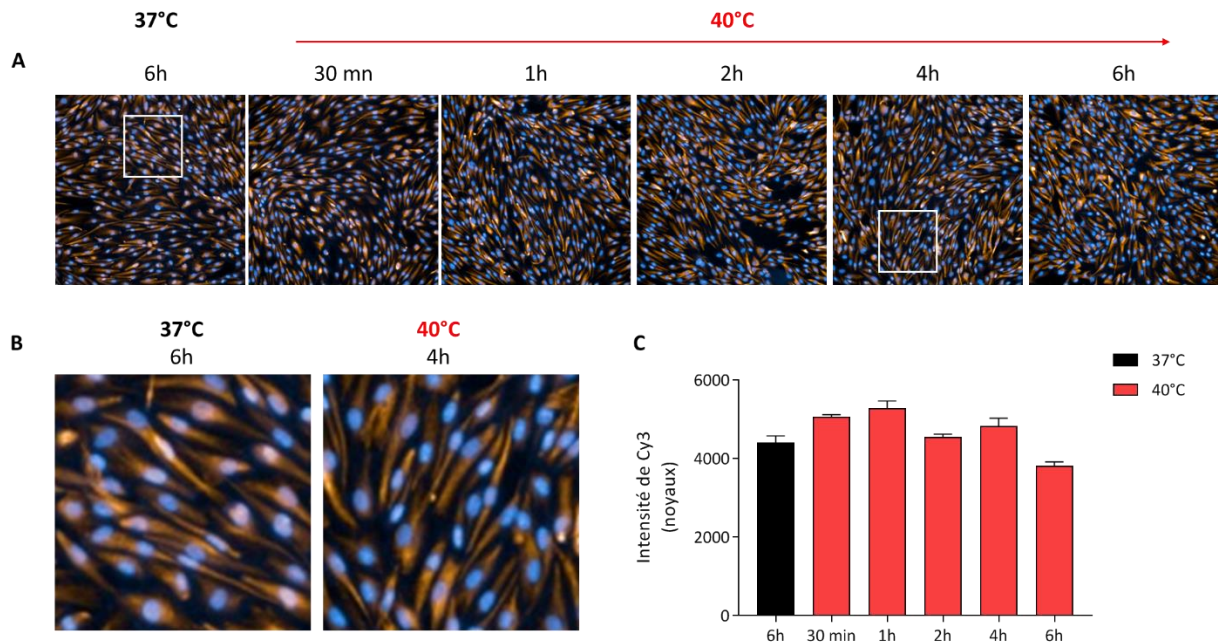
**FIGURE 37 : L'EXPRESSION DE LUCIFÉRASE, SOUS CONTRÔLE DES ÉLÉMENTS DE RÉPONSE À HSF1, EST FORTEMENT ACTIVÉE EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DE LA TEMPÉRATURE.**

Les Telo-HAEC ont été transfectées avec les plasmides pGL4.41 (**A**) et pmaxGFP puis cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 2h, 4h ou 6h. Après chaque temps d'incubation, l'intensité de fluorescence de la GFP a été mesurée afin d'évaluer la qualité de la transfection. Les cellules ont ensuite été lysées et de la luciférine (125  $\mu$ M) a été ajoutée avant mesure de la luminescence. Un ratio luminescence/fluorescence a été effectué afin d'obtenir une valeur traduisant de façon proportionnelle l'activité de HSF1 (**B**). Plus ce ratio augmente et plus l'activité est élevée et inversement. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 5 expériences +/- SEM. \*\*\*\* $P < 0.0001$  entre les groupes indiqués.

Après élévation de la température à 40°C, l'activité du promoteur qui répond à l'activation de HSF1 est augmentée en continu sur 6h, avec un pic d'activité à 4h, en comparaison avec l'activité à 37°C. Ces résultats corrént avec les résultats précédents de phosphorylation (**Figure 36**) et suggèrent que la protéine HSF1 est activée après augmentation de la température, qu'elle est fonctionnelle puisqu'elle est capable d'assurer son activité promotrice et qu'elle est impliquée dans la signalisation mise en place par les cellules endothéliales.

### I.2.1.3. Étude de la translocation nucléaire de HSF1

Pour confirmer cette signalisation, la translocation nucléaire de HSF1 a été étudiée par immunomarquage (**Figure 38**).



**FIGURE 38 : ÉTUDE DE LA TRANSLOCATION NUCLÉAIRE DE HSF1 EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 30 minutes, 1h, 2h, 4h ou 6h. **(A)** Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps monoclonal dirigé contre HSF1. Ce marquage est visible en orange (Cy3) sur les photos. Les noyaux cellulaires ont également été marqués grâce au Hoechst 33342 et sont visibles en bleu. **(B)** Zoom des marquages pour les conditions 37°C 6h et 40°C 4h. **(C)** Le co-marquage a permis de quantifier l'intensité de fluorescence Cy3 présente dans le noyau de chaque cellule. Ces résultats ont été obtenus sur une moyenne de 2 expériences +/- SEM.

À 37°C, l'immunomarquage de la protéine HSF1 indique que cette dernière est à la fois présente dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules endothéliales (**Figure 38A et 38B**). Lorsque les cellules sont placées à 40°C, ce marquage ne semble pas être modifié et aucune translocation nucléaire significative n'est observée (**Figure 38A et 38B**). Ces observations sont confirmées par les analyses mesurant la fluorescence présente dans le noyau des cellules en fonction des différentes conditions (**Figure 38C**).

Cependant, la protéine HSF1 étant phosphorylée après 2h à 40°C et son activité promotrice étant augmentée, il est fortement probable que la protéine soit transloquée dans le noyau en réponse à une augmentation de température. Nous avons donc essayé d'optimiser cette technique pour observer

une translocation nucléaire. L'ensemble des conditions testées est regroupé dans le **Tableau 17**.

Conditions de culture		Conditions de marquage	
<b>Cellules utilisées</b>	<b>Temps d'incubation</b>	<b>Fixation (10 minutes à 4°C)</b>	<b>Anticorps primaires</b>
HCAEC	30 minutes	PFA 4%	Anti-HSF1 monoclonal (ab52757, abcam®)
Telo-HAEC	1h	Méthanol	Anti-HSF1 (phospho 326) polyclonal (ab115702, abcam®)
<b>Culture cellulaire</b>	2h	Cytoperm/Cytofix	<b>Dilution des anticorps primaires</b>
Statique	3h	<b>Perméabilisation</b>	1/100 <sup>e</sup>
Flux (10 dyn.cm <sup>2</sup> )	4h	Triton X-100 - 0,5%	1/1000 <sup>e</sup>
<b>Température</b>	6h	<i>Cytofix/Cytoperm</i>	1/5000 <sup>e</sup>
34°C	<b>Traitement</b>	<b>Temps d'incubation avec l'anticorps primaire</b>	
37°C	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (pendant 3h)	2h	
40°C		Une nuit	
42°C			

**TABLEAU 17 : RÉSUMÉ DES CONDITIONS TESTÉES POUR VISUALISER LA TRANSLOCATION NUCLÉAIRE DE HSF1.**

Dans un premier temps, différents types de fixation cellulaire ont été testés afin de déterminer celle permettant d'obtenir les meilleures images, avec un bruit de fond le plus faible possible. Dans un second temps, différents anticorps ciblant la forme totale ou la forme phosphorylée de HSF1 ont également été testés, chacun à différentes concentrations afin d'optimiser la détection de la protéine. Dans un dernier temps, différents temps d'incubation des cellules ont été testés ainsi que différentes conditions de culture. En effet, la translocation nucléaire n'étant pas observable en condition statique, les cellules ont été cultivées en condition de flux afin de se rapprocher le plus possible de leurs conditions physiologiques. De plus, des températures plus élevées (42°C) ont été testées afin de voir si la translocation pouvait être davantage observable dans ces conditions.

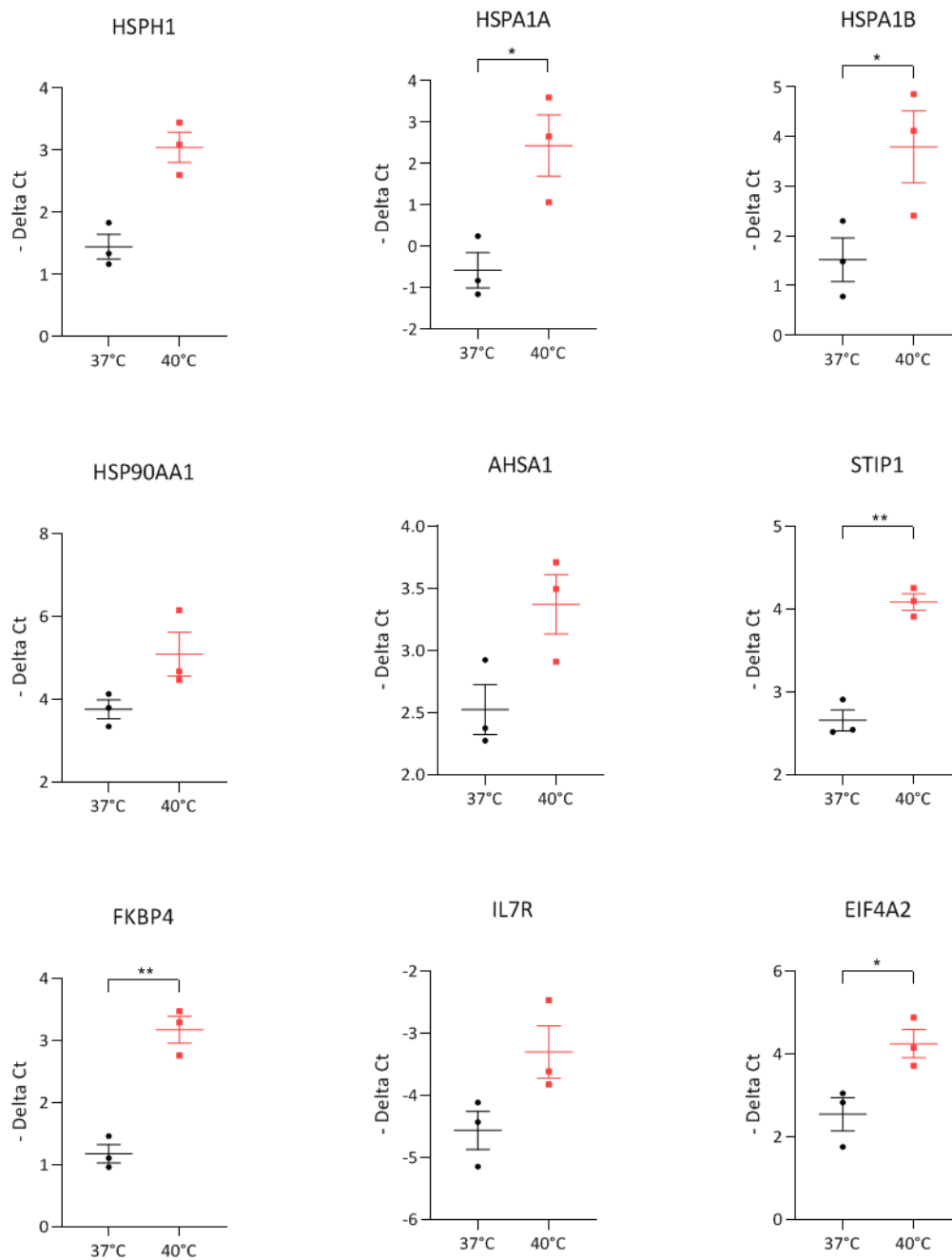
Malgré la multitude des conditions testées, des résultats similaires à ceux décrits précédemment ont été obtenus et aucune translocation nucléaire n'a pu être mise en évidence.

#### I.2.1.4. Modulation des gènes régulés par HSF1

Pour confirmer l'activité transcriptionnelle de HSF1, nous avons sélectionné 9 gènes prédits par le logiciel IPA (**Figure 31A**) et issus de nos premières analyses (**Annexe II, Tableau 23**). Parmi ces neuf gènes, quatre HSP (HSPH1, HSPA1A, HSPA1B et HSP90AA1) sont capables de se lier à la protéine HSF1, de la séquestrer dans le cytosol et d'inhiber ses fonctions (Ali *et al.*, 1998; Shi, Mosser and Morimoto, 1998). Ces protéines sont également impliquées dans le repliement protéique et capables de se lier à plusieurs autres facteurs. Par exemple, l'HSP90AA1 est capable d'établir des interactions avec AHSA1, STIP1 et FKBP4, pour augmenter sa propre activité ATPasique ou pour réguler celle de HSF1 (Lotz *et al.*, 2003; Woodford *et al.*, 2016).

Ces neuf gènes sont tous sur-exprimés à 40°C (**Figure 39**), indiquant qu'ils sont bien impliqués dans la réponse cellulaire à la température. Ces gènes possèdent tous des séquences HSE au sein de leur promoteur et sont décrits comme étant sous le contrôle de l'activité promotrice de HSF1 (Kovács *et al.*, 2019).

L'ensemble de ces données suggère donc qu'à 40°C, les HCAEC déclenchent l'activation de HSF1 qui n'est alors plus séquestré dans le cytosol par les HSP et qui peut exercer ses fonctions transcriptionnelles afin de transcrire ses gènes cibles dans le noyau.

Marqueurs de l'activation de HSF1

**FIGURE 39 : LES GÈNES THÉORIQUEMENT RÉGULÉS PAR HSF1 SONT SOUS-EXPRIMÉS APRÈS 6H À 40°C.**

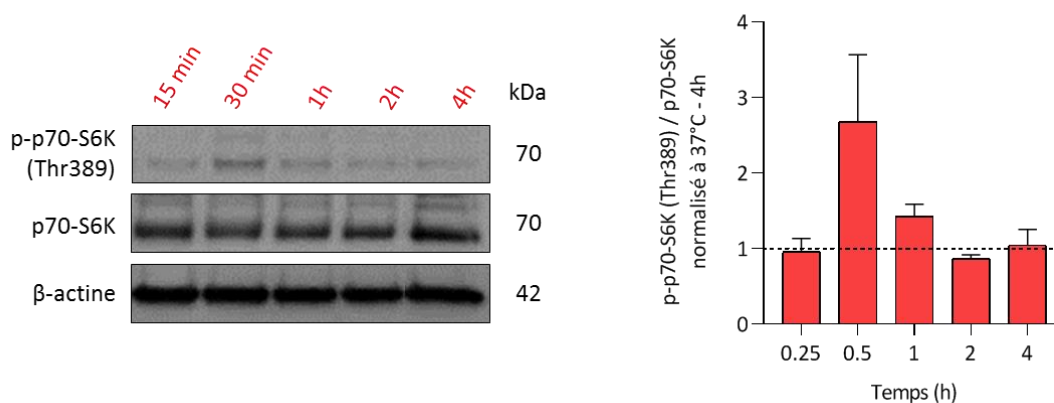
Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 6h. Leurs ARN totaux ont été extraits et l'expression de plusieurs gènes a été étudiée par TLDA. Les résultats sont exprimés en  $-\Delta Ct$  en fonction de la température, où chaque point représente une expérience. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM. \* $P < 0.05$  et \*\* $P < 0.01$  entre les groupes indiqués.

## I.2.2. Implication de la voie de signalisation mTORC1 et étude de son lien avec HSF1

Précédemment, nous avons montré la phosphorylation de la protéine HSF1 sur sa sérine 326 à 40°C. Ce site peut être phosphorylé par la protéine mTORC1 (Chou *et al.*, 2012). Parallèlement à cela, les analyses IPA ont révélé une implication possible de la voie de signalisation mTORC1 dans la réponse cellulaire à 40°C. C'est pour ces raisons que nous nous sommes intéressés à cette voie, à son implication et à son lien possible avec la protéine HSF1 suite à une élévation de la température.

### I.2.2.1. Étude de la phosphorylation de la protéine p70-S6K

Afin de confirmer l'activation de mTORC1, la phosphorylation de son effecteur p70-S6K sur sa thréonine 389 (Chou *et al.*, 2012; Yoshihara *et al.*, 2013) a été vérifiée par western blot, en réponse à une augmentation de température (**Figure 40**).



**FIGURE 40 : LA PROTÉINE P70-S6K EST PHOSPHORYLÉE EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 15 minutes, 30 minutes, 1h, 2h ou 4h. L'expression des protéines p-p70-S6K, p70-S6K et  $\beta$ -actine a été quantifiée par western blot à partir de 9  $\mu$ g de protéines ayant migré sur un gel « NuPAGE™ Tris-Acetate 3-8% » et ayant été transférés sur une membrane PVDF 0,2  $\mu$ m. L'expression des protéines p-p70-S6K et p70-S6K a été normalisée à celle de la  $\beta$ -actine pour s'affranchir des possibles écarts de dépôts puis le rapport de ces deux expressions a permis d'établir une quantification p-p70-S6K/p70-S6K en fonction de la température et du temps d'incubation des HCAEC à chaque température. Les valeurs obtenues à 40°C ont ensuite été normalisées avec celles obtenues pour la condition 37°C 4h. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM.

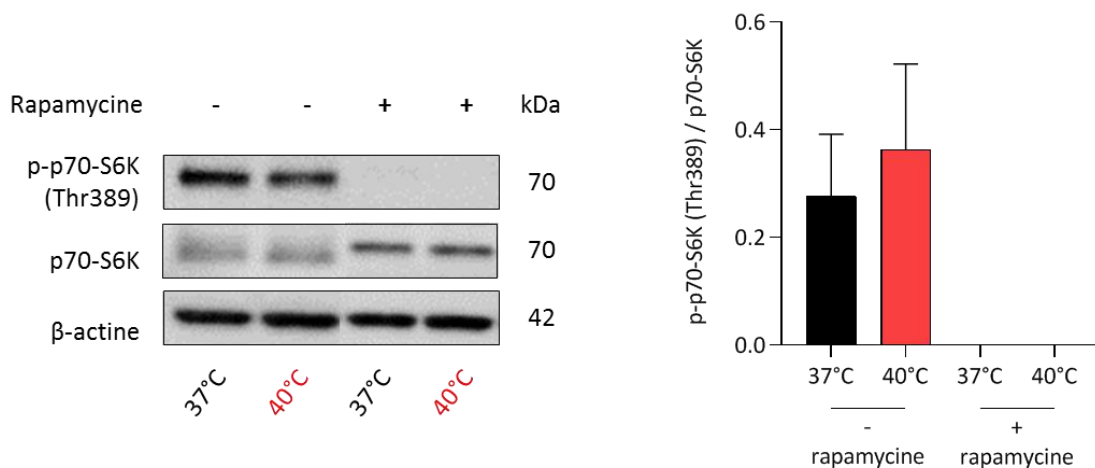
La phosphorylation de p70-S6K, sur sa thréonine 389, augmente de façon transitoire après 30 minutes à 40°C. L'activation de mTORC1 est donc très rapide et précède la phosphorylation de HSF1. Cela suggère donc que le complexe mTORC1 pourrait participer à la phosphorylation de HSF1.

### 1.2.2.2. Inhibition de la voie mTORC1

#### 1.2.2.2.1. Effet de la rapamycine sur la phosphorylation de la protéine p70-S6K

Afin de confirmer l'implication de mTORC1 dans la réponse cellulaire à la température et son lien avec HSF1, un inhibiteur spécifique de mTORC1 a été utilisé : la rapamycine (Lamming, 2016).

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés que cet inhibiteur fonctionnait comme attendu en étudiant son effet sur la phosphorylation de p70-S6K (**Figure 41**).



**FIGURE 41 : LA RAPAMYCINE INHIBE LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE P70-S6K.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 6h en présence ou non de rapamycine (20 nM). L'expression des protéines p-p70-S6K, p70-S6K et β-actine a été quantifiée par western blot à partir de 9 µg de protéines ayant migré sur un gel « NuPAGE™ Tris-Acetate 3-8% » et ayant été transférés sur une membrane PVDF 0,2 µm. L'expression des protéines p-p70-S6K et p70-S6K a été normalisée à celle de la β-actine pour s'affranchir des possibles écarts de dépôts puis le rapport de ces deux expressions a permis d'établir une quantification p-p70-S6K/p70-S6K en fonction de la température et du traitement à la rapamycine. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM.

Comme attendu, la phosphorylation de p70-S6K est totalement inhibée en présence de rapamycine, quelle que soit la température.

#### I.2.2.2.2. Effet de la rapamycine sur l'expression génique

Afin de déterminer au mieux les gènes modulés par la rapamycine, nous avons étudié l'effet de cet inhibiteur à 37°C et à 40°C (Cf. **Annexe II, Tableau 26**). Nous avons observé trois types de profil sur les gènes : des gènes non modulés par la rapamycine, des gènes modulés par la rapamycine à 37°C et à 40°C et des gènes modulés par la rapamycine uniquement à 40°C. Ces derniers représentent 29% des gènes issus de notre panel et modulés par la température. Parmi ces gènes, nous retrouvons majoritairement les gènes impliqués dans la voie de signalisation mTORC1 et ceux régulés par le facteur de transcription HSF1 auxquels nous nous sommes particulièrement intéressés afin d'explorer de manière plus approfondie la relation entre mTORC1 et HSF1 (**Figure 42**).

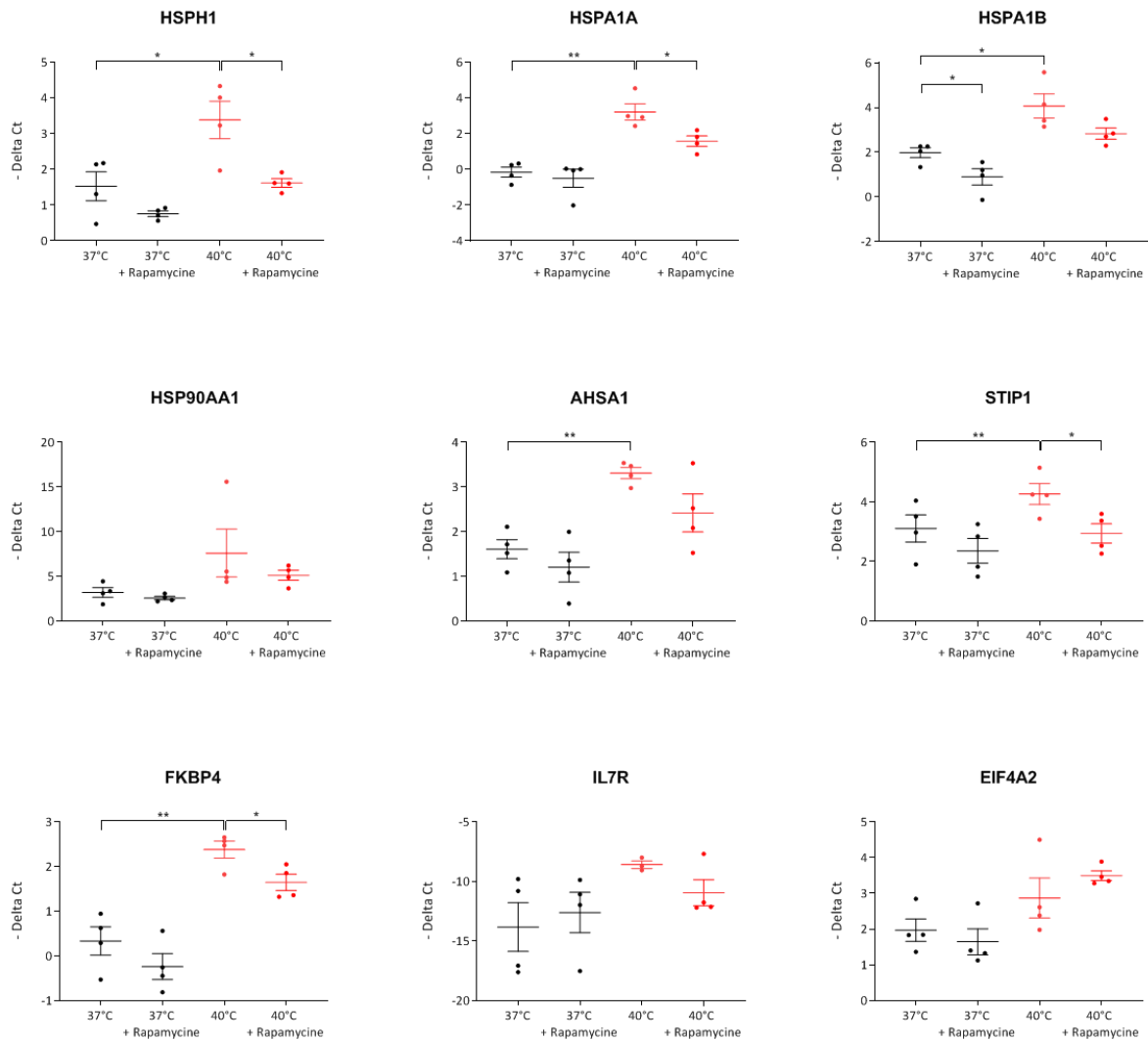
Parmi les neufs gènes régulés par HSF1, quatre semblent être régulés par la rapamycine (HSPH1, HSPA1A, IL7R et STIP1). En effet, leur expression est augmentée à 40°C et l'ajout de rapamycine prévient cette augmentation. Pour les gènes HSPH1 et STIP1, la rapamycine permet un retour à une expression basale, suggérant qu'ils sont entièrement régulés par mTORC1. Concernant les gènes HSPA1A et IL7R, la rapamycine ne permet qu'une diminution partielle de leur expression, suggérant qu'un ou plusieurs autres facteurs sont impliqués dans leur régulation.

Dans la littérature, il a été suggéré que HSPA1A était capable de phosphoryler la protéine Akt, activant à son tour la protéine mTORC1. Cette dernière agirait alors sur la phosphorylation de HSF1, entraînant ainsi la transcription de ses gènes cibles, dont HSPA1A (Dokladny *et al.*, 2013; Sisti *et al.*, 2015). Cependant, ce gène est également régulé par plusieurs autres facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, NF-Y ou encore CREB (Sasi *et al.*, 2014). Cette boucle de régulation expliquerait alors pourquoi la rapamycine diminue l'expression de ce gène de manière partielle.

En ce qui concerne les cinq autres gènes, leur expression reste inchangée en présence de rapamycine (HSP90AA1, AHSA1, FKBP4 et EIF4A2) ou est modulée également à 37°C (HSPA1B) suggérant une régulation transcriptionnelle différente.

L'ensemble de ces résultats indique donc l'existence d'un lien entre mTORC1 et HSF1.



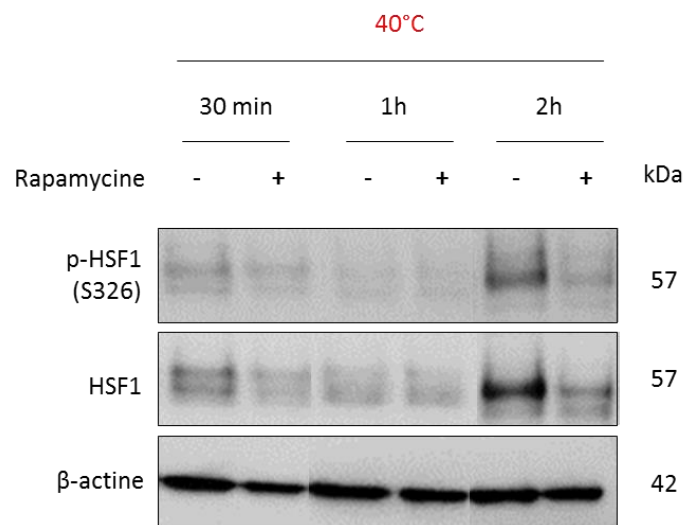
Marqueurs de l'activation de HSF1

**FIGURE 42 : LA RAPAMYCINE MODULE UNE PARTIE DES GÈNES RÉGULÉS PAR HSF1 APRÈS 6H À 40°C.**

Les Telo-HAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 6h, en présence ou non de rapamycine (20 nM). Leurs ARN totaux ont été extraits et l'expression de plusieurs gènes a été étudiée par TLDA. Les résultats sont exprimés en - Delta (Ct) en fonction de la température et du traitement, où chaque point représente une expérience. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 4 expériences +/- SEM. \*P<0.05 et \*\*P<0.01 entre les groupes indiqués.

### 1.2.2.2.3. Effet de la rapamycine sur la phosphorylation de la protéine HSF1

Pour aller plus loin et confirmer le lien possible existant entre mTORC1 et HSF1, nous avons étudié l'effet de la rapamycine sur la phosphorylation de HSF1 par western blot. Pour cela, nous avons cultivé les HCAEC en présence ou non de rapamycine en cinétique pendant 2h. Nous avons observé une diminution de la phosphorylation de HSF1 dans une expérience (**Figure 43**) mais les variations des taux de phosphorylation de base de HSF1, d'une expérience à une autre, n'ont pas permis de tirer une conclusion définitive.



**FIGURE 43 : GEL NON REPRÉSENTATIF DES EXPÉRIENCES RÉALISÉES POUR VISUALISER L'EFFET DE LA RAPAMYCINE SUR LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE HSF1.**

*Dans cet exemple, les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 40°C pendant 30 minutes, 1h ou 2h en présence ou non de rapamycine (20 nM). Le western blot a été réalisé à partir de 9 µg de protéines ayant migré sur un gel « NuPAGE™ Tris-Acetate 3-8% » et ayant été transférés sur une membrane PVDF 0,2 µm.*

Nous avons montré donc que la protéine HSF1 était activée par phosphorylation, que son activité kinasique était augmentée et que certains de ses gènes cibles étaient modulés à 40°C. Nous avons également montré que la protéine mTORC1 était activée de manière précoce et qu'elle participait à la régulation de nombreux gènes, notamment ceux modulés par HSF1. Cela suggère donc un lien entre ces deux facteurs et leur implication dans la réponse à la température. Néanmoins, le fait que la rapamycine, inhibiteur sélectif de mTORC1, ne régule pas tous les gènes induits par la température ouvre la porte à l'implication d'autres voies d'activation comme le suggèrent les analyses IPA, avec la mise en évidence de la voie UPR.

### I.2.3. Implication de la voie de signalisation UPR

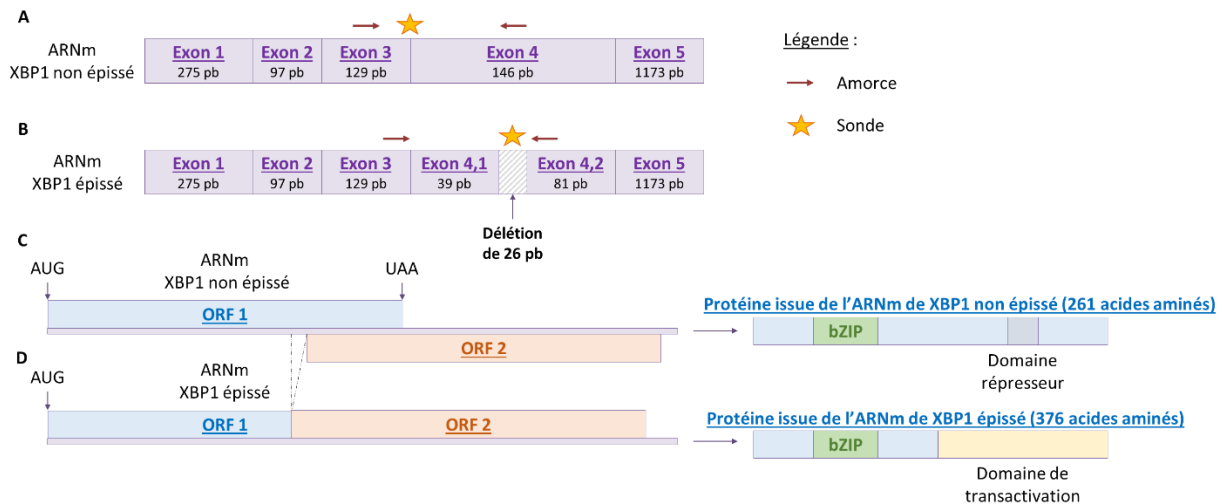
Au sein de la voie de signalisation UPR (**Figure 30B**), trois types de réponse pourraient être activées et impactées par la température : la réponse PERK, la réponse IRE1 $\alpha$  et la réponse ATF6.

IRE1 $\alpha$  est l'autre nom utilisé pour désigner ERN1, régulateur génique également identifié par le logiciel IPA comme étant théoriquement impliqué dans la réponse à la température (**Figure 31B**). L'étude de la voie UPR avec la réponse ERN1 a donc été étudiée.

ERN1 est une protéine transmembranaire dans le réticulum endoplasmique qui est maintenue sous forme inactive lorsqu'elle est reliée à des protéines chaperonnes.

#### I.2.3.1. Étude de l'activité ribonucléasique de ERN1

La protéine ERN1 possède une activité endoribonucléasique lui permettant de réaliser un épissage (qui se produit de façon inédite dans le cytosol) d'un transcrit spécifique : XBP1 (*X-box Binding Protein 1*).

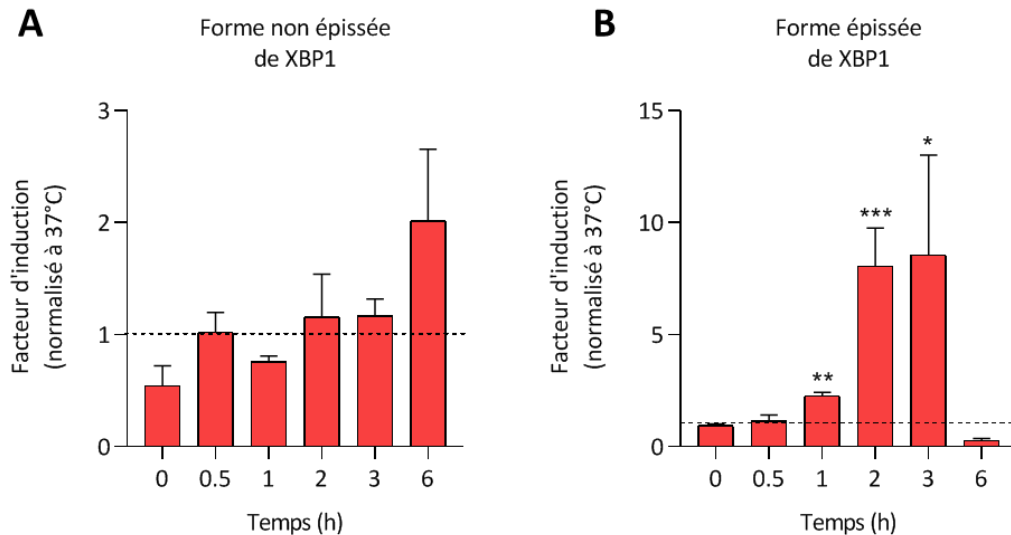


**FIGURE 44 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES DIFFÉRENTS TRANSCRITS DE XBP1 ET DES PROTÉINES TRADUITES À PARTIR DE CES TRANSCRITS.**

**(A)** Représentation de la forme non épissée du transcrite XBP1. **(B)** Représentation de la forme épissée du transcrite XBP1. **(C)** Traduction de la forme non épissée du transcrite XBP1 en une protéine XBP1u possédant un domaine répresseur de la transcription. **(D)** Traduction de la forme épissée du transcrite XBP1 en une protéine XBP1s possédant un domaine de transactivation de la transcription.

L'ARN messager de XBP1 non épissé est constitué de 5 exons (**Figure 44A**). Son épissage cytosolique permet de retirer un intron de 26 paires de bases au sein de l'exon 4 (**Figure 44B**), décalant ainsi le cadre de lecture et modifiant la conformation et la fonctionnalité de la protéine finale. En effet, la protéine XBP1u issue de l'ARN messager non épissé contient, dans sa partie C terminale, un domaine répresseur de la transcription (**Figure 44C**) tandis que la protéine XBP1s, issue du transcrite épissé, contient un domaine de transactivation (**Figure 44D**). Les effets des protéines XBP1u et XBP1s sont donc opposés.

L'épissage de l'ARN messager de XBP1 a été étudié par RT-qPCR en réponse à une augmentation de la température (**Figure 45**). Pour cela, les amorces PCR ont été sélectionnées de telle sorte à être complémentaire des séquences situées au niveau de la partie déléetée de l'ARNm. De cette façon, chaque sonde était spécifique de la forme non épissée ou de la forme épissée, qui ont été quantifiées et comparées.



**FIGURE 45 : LE TRANSCRIT XBP1 EST ÉPISSÉ EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DE TEMPÉRATURE.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 0h, 30 minutes, 1h, 2h, 3h ou 6h. Leurs ARN totaux ont été extraits et l'expression des transcrits de XBP1 a été étudiée par RT-qPCR. Les valeurs d'expression obtenues à 40°C ont été normalisées avec celles obtenues à 37°C. Ces résultats sont donc exprimés en facteur d'induction en fonction des différents temps d'incubation. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  et \*\*\* $P < 0.0005$  entre les groupes indiqués.

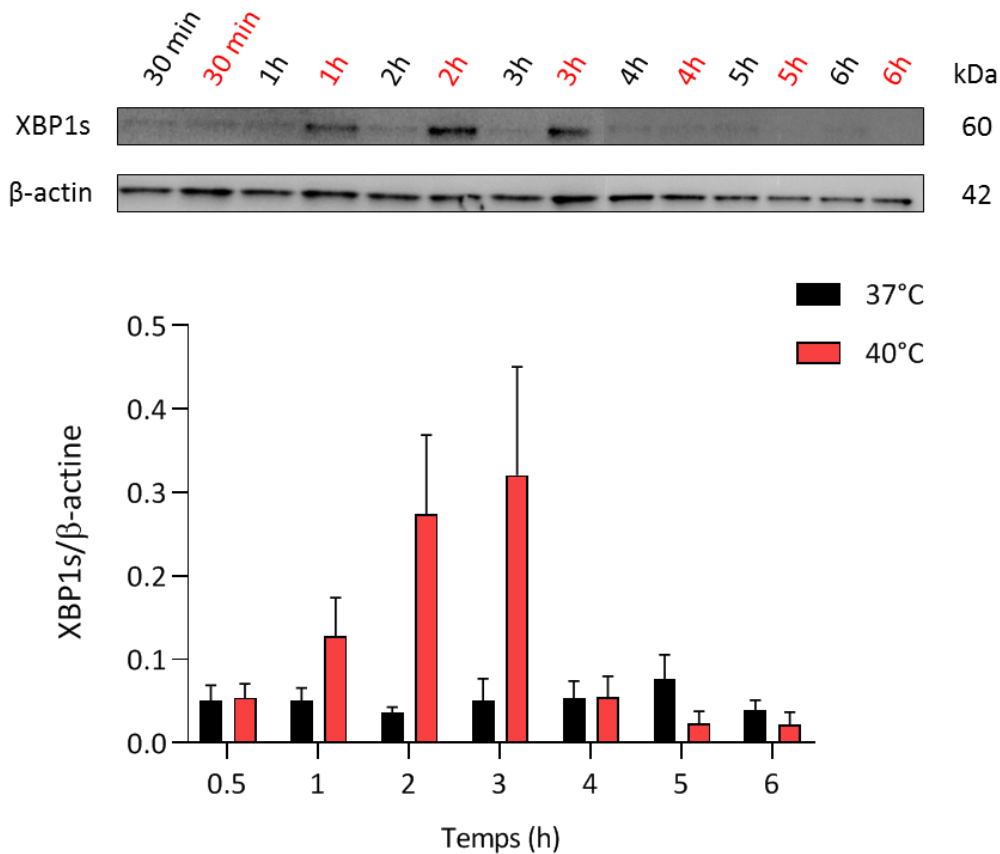
La forme non épissée du transcrit XBP1 ne varie pas de manière significative en réponse à l'élévation de température, quel que soit le temps d'incubation. Néanmoins, une tendance à l'augmentation de cette forme est observée pour le temps 6h (**Figure 45A**).

La forme épissée est augmentée de manière transitoire entre 1h et 3h d'incubation à 40°C. Après 6h, cette forme n'est plus majoritaire. Une tendance à la diminution est alors observée (**Figure 45B**), au profit de la forme non épissée (**Figure 45A**).

Ces résultats suggèrent que la protéine ERN1 est bien activée en réponse à la température et que son activité endoribonucléasique est induite de manière transitoire.

### 1.2.3.2. Corrélation avec le niveau protéique de la protéine XBP1

Pour confirmer l'activation de ERN1, nous avons étudié le niveau d'expression protéique de XBP1s en réponse à une augmentation de température (**Figure 46**).



**FIGURE 46 : LA QUANTITÉ DE PROTÉINE XBP1S ISSUE DU TRANSCRIT ÉPISSÉ EST AUGMENTÉE EN RÉPONSE À UNE ÉLÉVATION DE TEMPÉRATURE.**

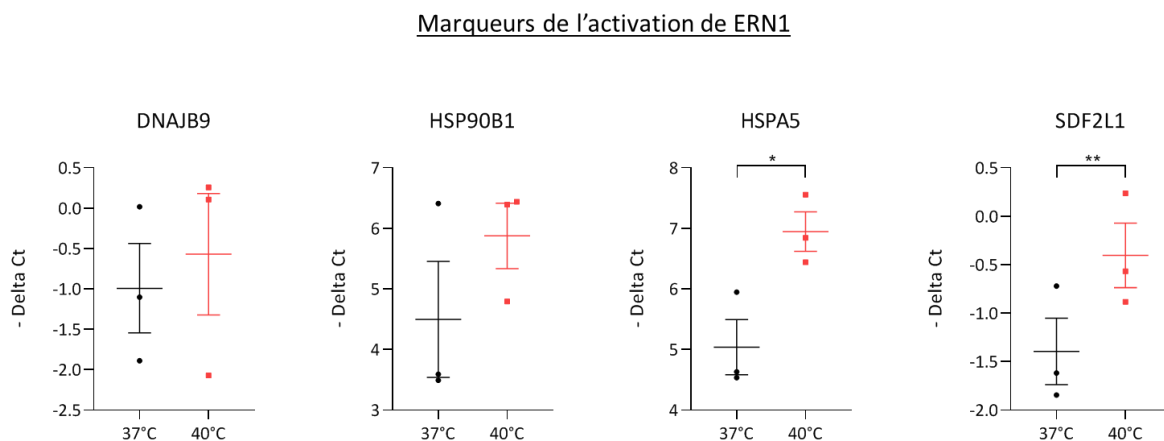
Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 30 minutes, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h ou 6h. L'expression des protéines XBP1s et β-actine a été quantifiée par western blot à partir de 9 µg de protéines ayant migré sur un gel « NuPAGE™ Tris-Acetate 3-8% » et ayant été transférés sur une membrane PVDF 0,2 µm. L'expression de la protéine XBP1s a été normalisée à celle de la β-actine pour s'affranchir des possibles écarts de dépôts. Elle a ensuite été exprimée en fonction des temps d'incubation et de la température. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM.

L'expression protéique de XBP1s, issue de l'épissage du transcrit, est augmentée de manière transitoire entre 1h et 3h après élévation de la température. Ces résultats corrént parfaitement avec les résultats précédents, confirmant donc une implication transitoire de ERN1 avec activation de son site ribonucléasique et production de la protéine XBP1s en réponse à l'élévation de la température.

### I.2.3.3. Modulation des gènes régulés par ERN1

Pour confirmer les résultats précédents sur XBP1 et l'engagement de la voie ERN1, nous avons sélectionné quatre gènes supposés être régulés par ERN1 et nous avons étudié leur régulation par la température.

Parmi ces quatre gènes, deux HSP (DNAJB9 et HSPA5) interagissent avec ERN1 dans les cellules non stressées (Amin-Wetzel *et al.*, 2017; Miyata, Badolato and Neamati, 2018). Cette interaction inhibe les fonctions de ce facteur et notamment son activité ribonucléasique. En effet, les gènes DNAJB9 (appartenant à la famille des HSP40) et HSPA5 (aussi appelé GRP78 ou BiP) codent pour des protéines chaperonnes permettant de maintenir le régulateur génique ERN1 sous forme inactive. Néanmoins, en cas de stress cellulaire, ces HSP se dissocieront de ERN1 pour aider au repliement correct des protéines dénaturées.



**FIGURE 47 : LES GÈNES RÉGULÉS PAR ERN1 SONT MODULÉS À 40°C.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 6h. Leurs ARN totaux ont été extraits et l'expression de plusieurs gènes a été étudiée par TLDA. Les résultats sont exprimés en – Delta (Ct) en fonction de la température, où chaque point représente une expérience. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM. \*P<0.05 et \*\*P<0.01 entre les groupes indiqués.

Les résultats obtenus indiquent que l'expression de trois gènes sur quatre augmente à 40°C (HSP90B1, HSPA5 et SDF2L1) (**Figure 47**). Concernant le gène DNAJB9, son expression n'est pas augmentée en condition statique mais est augmentée en condition de flux (**Cf. Annexe II, Tableau 23**). Ces résultats confirment les données obtenues par *microarray* et l'implication de ces gènes dans la réponse à la température. De plus, ces gènes possèdent tous des séquences ERSE (*Endoplasmic Reticulum Stress*

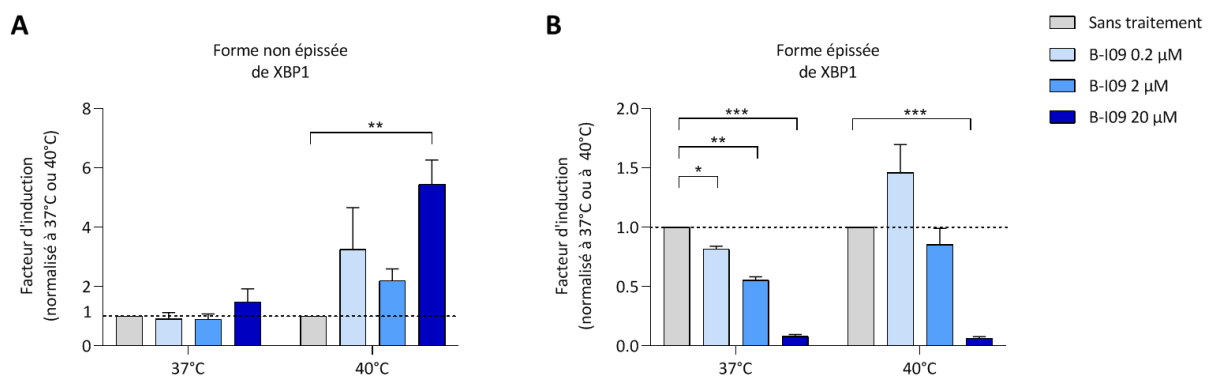
*response Element*) dans leur promoteur et sont décrits comme étant sous le contrôle de l'activité de ERN1 (Shaffer *et al.*, 2004; Eletto, Dersh and Argon, 2010).

Ces données suggèrent également qu'à 40°C, les HCAEC déclenchent l'activation du facteur ERN1 qui se dissocie de ses protéines chaperonnes pour effectuer sa fonction ribonucléasique, aboutissant à la transcription de ses gènes cibles.

#### 1.2.3.4. Effet de l'inhibiteur B-I09

Afin de savoir si la protéine XBP1s produite est fonctionnelle et à l'origine de la modulation des gènes étudiés jusqu'à présent, un inhibiteur spécifique de l'activité ribonucléasique de ERN1 a été utilisé : le B-I09 (Tang *et al.*, 2014).

Tout d'abord, nous avons voulu déterminer quelle était la concentration de B-I09 à utiliser afin de bloquer l'épissage de l'ARN messager de XBP1. Pour cela, trois concentrations ont été testées de manière à encadrer la concentration inhibitrice médiane (IC50) de cet inhibiteur : 0.2 µM, 2 µM et 20 µM. L'épissage a été étudié de la même manière que précédemment, après 2h à chaque température (Figure 48).



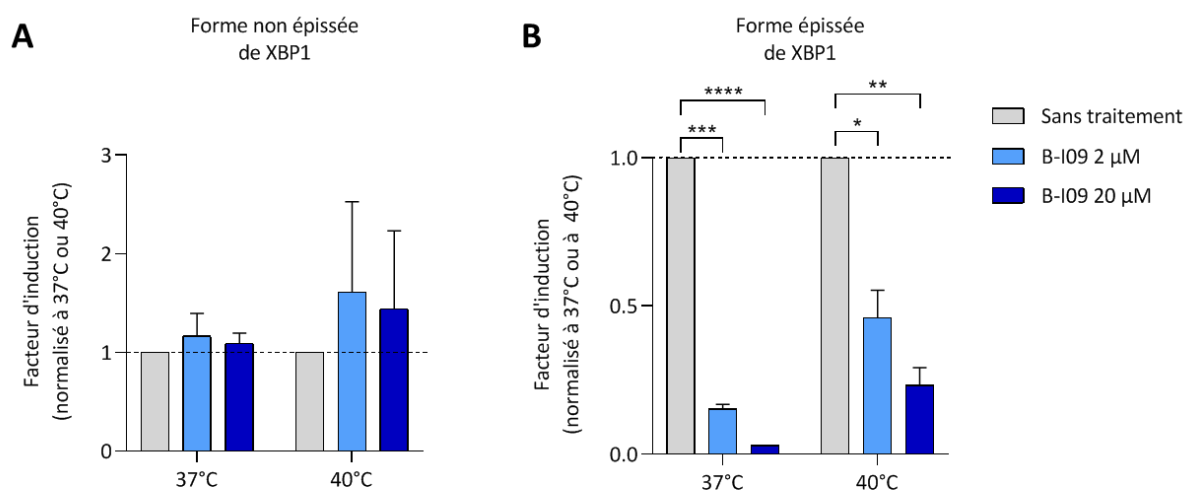
**FIGURE 48** : LE B-I09 PERMET DE DIMINUER L'ÉPISSAGE DU TRANSCRIT XBP1 APRÈS 2H D'INCUBATION AUX DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES.

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 2h en présence ou non de B-I09 à 0.2 µM, 2 µM ou 20 µM. Leurs ARN totaux ont été extraits et l'expression des transcrits de XBP1 a été étudiée par RT-qPCR. Les valeurs d'expression obtenues en présence de B-I09 ont été normalisées avec celles obtenues sans traitement, pour chaque température. Ces résultats sont donc exprimés en facteur d'induction en fonction des différentes températures. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM. \*P<0.05, \*\*P<0.001 et \*\*\*P<0.0005 entre les groupes indiqués.



Nous remarquons que les concentrations de B-109 égales à 0.2  $\mu\text{M}$  et 2  $\mu\text{M}$  n'ont pas d'effet significatif sur l'épissage de l'ARN messager de XBP1 à 40°C (**Figure 48B**), lequel augmente après 2h à 40°C comme observé précédemment. En revanche, à 20  $\mu\text{M}$ , cet épissage est réduit de plus de 80%, aussi bien à 37°C qu'à 40°C. Concernant la forme non épissée (**Figure 48A**), l'inhibiteur induit une augmentation de cette forme à 40°C quelle que soit la concentration utilisée, avec une augmentation significative à la plus forte concentration.

L'effet de cet inhibiteur a également été analysé après 6h d'incubation aux différentes températures (**Figure 49**). Dans ces conditions, seules les concentrations de 2  $\mu\text{M}$  et 20  $\mu\text{M}$  ont été testées.



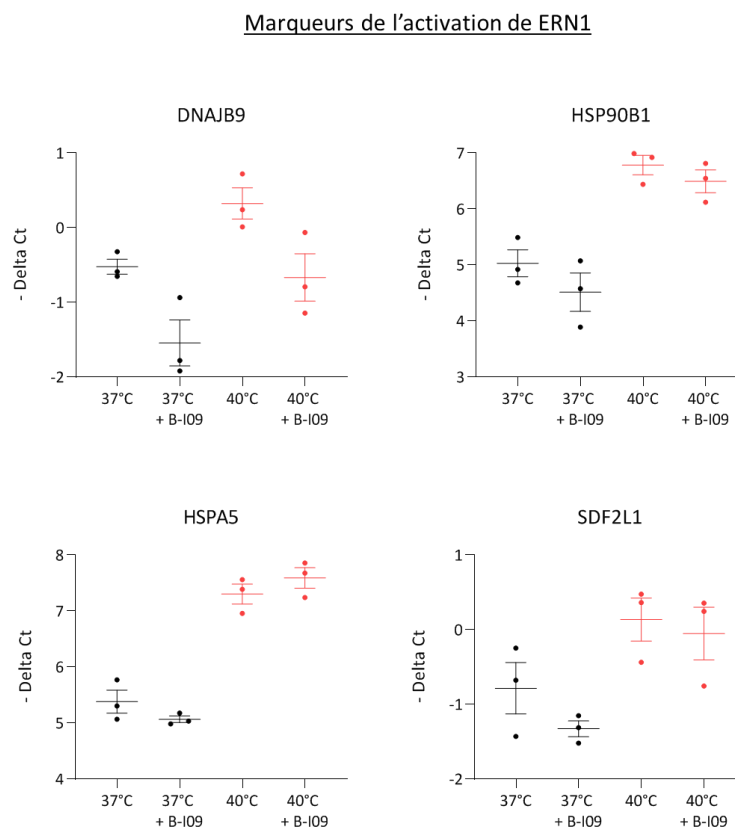
**FIGURE 49 : LE B-109 PERMET DE DIMINUER L'ÉPISSAGE DU TRANSCRIT XBP1 APRÈS 6H D'INCUBATION AUX DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 6h en présence ou non de B-109 à 2  $\mu\text{M}$  ou 20  $\mu\text{M}$ . Leurs ARN totaux ont été extraits et l'expression des transcrits de XBP1 a été étudiée par RT-qPCR. Les valeurs d'expression obtenues en présence de B-109 ont été normalisées avec celles obtenues sans traitement, pour chaque température. Ces résultats sont donc exprimés en facteur d'induction en fonction des différentes températures. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , \*\*\* $P < 0.0005$  et \*\*\*\* $P < 0.0001$  entre les groupes indiqués.

De la même manière que précédemment, nous remarquons que la plus forte concentration de B-109 permet de réduire de près de 80% l'épissage à 40°C, contre environ 50% avec 2  $\mu\text{M}$  (**Figure 49B**). À 37°C, cet épissage est davantage inhibé, quelle que soit la concentration utilisée. La forme non épissée, quant à elle, ne semble pas être modifiée, quelle que soient les températures et les concentrations utilisées (**Figure 49A**).

Suite à ces résultats, la concentration de 20  $\mu\text{M}$  a été sélectionnée. L'effet de l'inhibiteur B-109 sur l'expression du panel génique de référence a donc pu être étudié par TLDA (Cf. **Annexe II, Tableau 27**). Afin de déterminer au mieux les gènes modulés par le B-109, nous avons étudié l'effet de cet inhibiteur à 37°C et à 40°C. De la même manière que précédemment pour la rapamycine, seuls les gènes, dont l'expression est exclusivement modulée à 40°C en présence de B-109, ont été considérés comme régulés par cet inhibiteur.

Les résultats obtenus lors de cette analyse indiquent qu'aucun gène n'est modulé par cet inhibiteur. Si on se focalise sur le panel des quatre gènes régulés par ERN1, nous pouvons également constater qu'ils ne sont pas régulés par le B-109, hormis DNAJB9 (**Figure 50**).



**FIGURE 50 : LES GÈNES RÉGULÉS PAR ERN1 NE SONT PAS MODULÉS PAR LE B-109.**

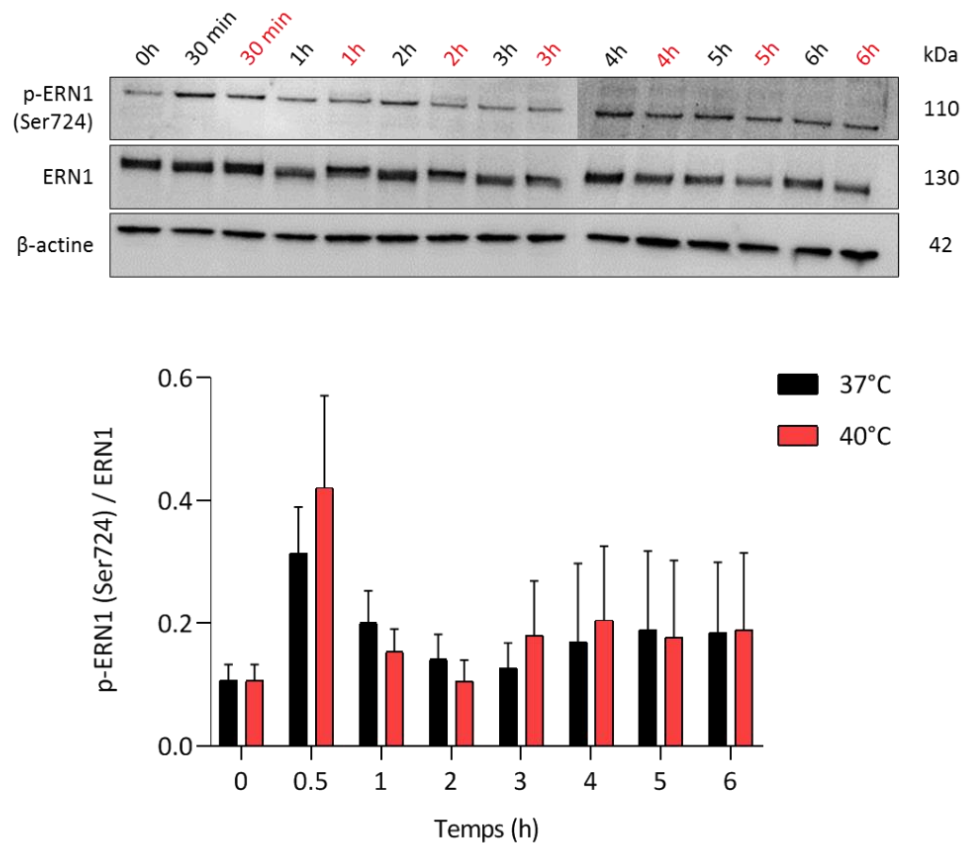
Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 6h en présence ou non de B-109 (20  $\mu\text{M}$ ). Leurs ARN totaux ont été extraits et l'expression de plusieurs gènes a été étudiée par TLDA. Les résultats sont exprimés en  $-\Delta\text{Delta Ct}$  en fonction de la température et du traitement, où chaque point représente une expérience. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM.

L'ensemble de ces données suggère que la voie ERN1 est bien activée puisque l'épissage du transcrit XBP1 est induit et donne lieu à l'expression de la protéine XBP1s. Néanmoins, l'inhibition de cet

épissage ne modifie pas l'expression des gènes régulés par ERN1, hormis DNAJB9, indiquant que ces gènes sont possiblement régulés par un ou plusieurs autres facteurs en cas d'augmentation de température.

#### I.2.3.5. Étude de la phosphorylation de ERN1

En parallèle de sa fonction endoribonucléasique, la protéine ERN1 possède également une activité kinasique qui lui permet de s'autophosphoryler. Les sites de phosphorylation sur 3 sérines (Ser724, Ser726 et Ser729) ont été identifiés dans une boucle d'activation de ERN1 et joueraient un rôle régulateur de l'activité ribonucléasique de ce facteur (Prischi *et al.*, 2014). Nous avons étudié la phosphorylation de la sérine 724 par western blot en cinétique et en réponse à une augmentation de température (**Figure 51**).



**FIGURE 51 : LA TEMPÉRATURE NE MODIFIE PAS LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE ERN1.**

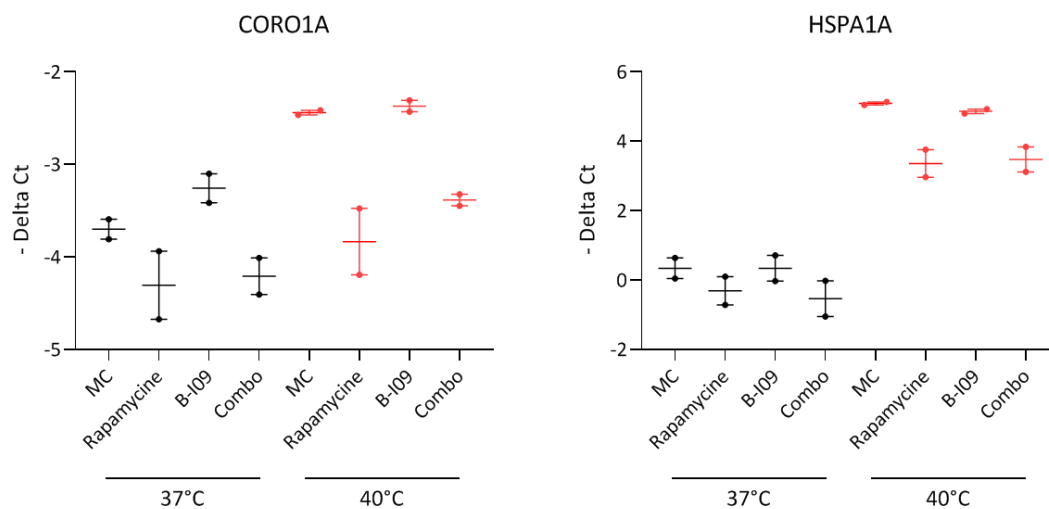
Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 0h, 30 minutes, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h ou 6h. L'expression des protéines p-ERN1, ERN1 et β-actine a été quantifiée par western blot à partir de 9 µg de protéines ayant migré sur un gel « NuPAGE™ Tris-Acetate 3-8% » et ayant été transférés sur une membrane PVDF 0,2 µm. L'expression des protéines p-ERN1 et ERN1 a été normalisée à celle de la β-actine pour s'affranchir des possibles écarts de dépôts puis le rapport de ces deux expressions a permis d'établir une quantification p-ERN1/ERN1 en fonction de la température et du temps d'incubation. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 6 expériences (pour les temps 0h, 30 minutes, 1h et 2h) ou 3 expériences (pour les temps 3h, 4h, 5h et 6h) +/- SEM.

Aucune différence significative de phosphorylation de la sérine 724 n'est observée entre les conditions 37°C et 40°C, quel que soit le temps d'incubation. Étant donné que nos résultats précédents ont montré que l'activité ribonucléasique de ERN1 est augmentée à 40°C, cela implique que cette augmentation n'est pas sous la dépendance de la phosphorylation de cet acide aminé mais sans doute sous celle d'autres sites qui restent à analyser.

### 1.2.4. Blocage des deux voies de signalisation

Au cours des analyses de *microarray*, de nombreux gènes ont été retrouvés modulés en réponse à la température. Nous avons montré précédemment que certains d'entre eux pouvaient être inhibés par la rapamycine, impliquant la voie de signalisation mTORC1 dans cette réponse. Cependant, nous avons également constaté que plusieurs gènes n'étaient pas modulés par la rapamycine ou le B-I09. Nous avons donc voulu étudier ces deux voies de signalisation (mTORC1 et ERN1) de manière simultanée afin de déterminer s'il existe un lien entre elles ou un effet synergique sur l'expression génique. Pour cela, les deux inhibiteurs (rapamycine et B-I09) ont été utilisés de manière combinée.

Nous avons trouvé que 13% des gènes modulés par la température ont une expression modulée par les deux inhibiteurs à 40°C (Cf. **Annexe II, Tableau 28**). Tous ces gènes ont une expression qui varie dans le même sens qu'en présence de rapamycine seule (**Figure 52**) suggérant un effet spécifique et robuste de la rapamycine et un effet négligeable du B-I09 sur les gènes sensibles à la température que nous avons sélectionnés. Aucun effet synergique n'a été observé suggérant que les deux voies de signalisation fonctionnent de manière indépendante.



**FIGURE 52 : EXEMPLE DE GÈNES DONT L'EXPRESSION, EN PRÉSENCE DES DEUX INHIBITEURS, VARIE COMME EN PRÉSENCE DE RAPAMYCINE SEULE.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 6h dans du milieu complet (MC) en présence ou non de rapamycine (20 nM), de B-I09 (20 µM) ou d'un mélange des deux inhibiteurs (Combo : rapamycine (20 nM) + B-I09 (20 µM)). Leurs ARN totaux ont été extraits et l'expression de plusieurs gènes a été étudiée par TLDA. Les résultats sont exprimés en -Delta (Ct) en fonction de la température et du traitement, où chaque point représente une expérience. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 2 expériences +/- SEM.

Par ces résultats de transcriptomique et les nombreuses validations expérimentales effectuées, nous avons démontré l'implication et l'activation de trois voies de signalisation cellulaires majeures mises en place par les cellules endothéliales primaires en réponse à la température. Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés aux répercussions fonctionnelles de l'augmentation de température sur les cellules endothéliales.

## II. Étude de l'intégrité de l'endothélium en réponse à la température

L'endothélium forme une monocouche de cellules assurant de nombreuses fonctions. Étant à l'interface entre les éléments circulants du sang et la paroi vasculaire, il joue le rôle de barrière semi-perméable et est essentiel dans le contrôle de la réponse inflammatoire. Il régule le passage des macromolécules et a des propriétés antiadhésives, empêchant ainsi la diapédèse des cellules immunitaires hors des sites d'inflammation.

L'objectif de cette deuxième partie a donc été de déterminer si l'endothélium était capable de maintenir ses fonctions essentielles et son intégrité à la suite d'une augmentation de température. Pour cela, la perméabilité endothéliale et la diapédèse leucocytaire ont d'abord été étudiées à 40°C et comparées avec les conditions contrôles (37°C). Par la suite, nous avons évalué l'implication de la voie de signalisation de la NO synthase (eNOS) dans la réponse endothéliale à la température.

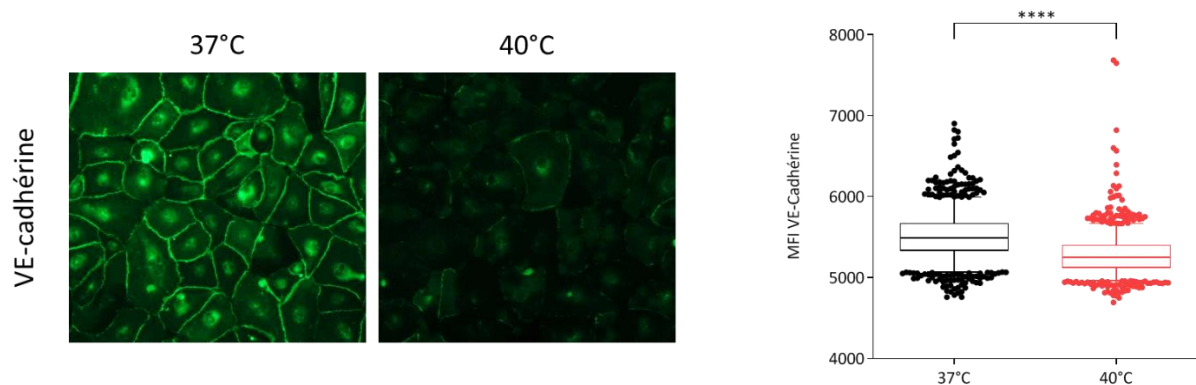
### II.1. Étude de la perméabilité endothéliale

#### II.1.1. Étude de l'expression de la VE-cadhérine

La perméabilité endothéliale est contrôlée principalement par les jonctions intercellulaires. La VE-cadhérine est une protéine exprimée exclusivement par les cellules endothéliales, localisée spécifiquement au niveau des jonctions adhérentes et impliquée directement dans le contrôle de la perméabilité endothéliale. C'est pourquoi nous avons voulu déterminer si la température pouvait avoir un impact sur son expression.

Dans un premier temps, nous avons vérifié si la VE-cadhérine était différentiellement exprimée en réponse à la température. Son expression ne semble pas modulée au niveau transcriptionnel à 40°C mais cette protéine peut être régulée à d'autres niveaux. Par exemple, son endocytose peut contribuer à l'augmentation de perméabilité en réponse au VEGF (Gavard and Gutkind, 2006). Dans un second

temps, nous avons donc suivi la VE-cadhérine par immunomarquage, en condition hyperthermique (**Figure 53**).



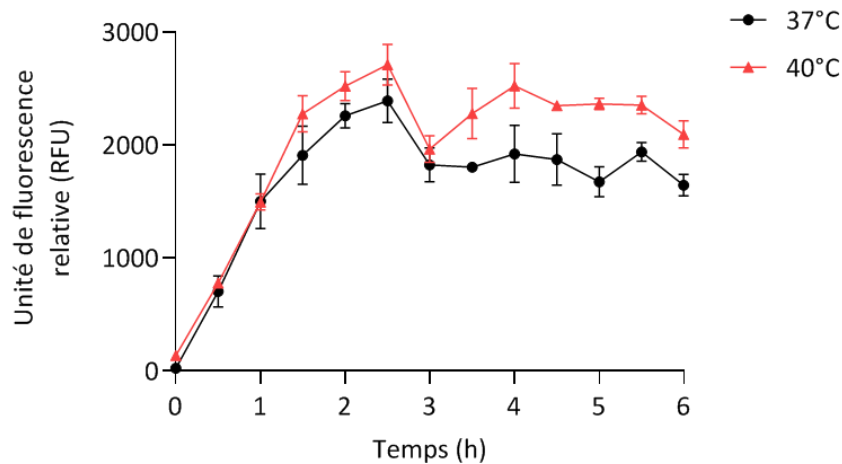
**FIGURE 53 : L'EXPRESSION DE LA VE-CADHÉRINE EST DIMINUÉE À 40°C.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 6h. Elles ont ensuite été fixées, perméabilisées et marquées avec un anticorps polyclonal dirigé contre la VE-cadhérine. L'intensité de fluorescence membranaire a été quantifiée pour chaque cellule et pour chaque condition. Les résultats sont donc exprimés en intensité de fluorescence moyenne (MFI) en fonction de la température où chaque point représente une cellule. Les résultats ont été obtenus à partir d'une expérience. \*\*\*\* $P < 0.0001$  entre les groupes indiqués.

Nous observons une diminution significative de l'expression membranaire de la VE-cadhérine en réponse à une augmentation de température, suggérant une possible fragilisation des jonctions intercellulaires et une augmentation de la perméabilité endothéliale à 40°C.

### II.1.2. Étude du passage de macromolécules à travers la monocouche endothéliale

Afin d'approfondir les résultats obtenus par immunofluorescence et déterminer si la température a un effet sur la perméabilité endothéliale, nous avons étudié l'effet d'un pré-conditionnement thermique sur le passage passif de molécules de dextran, couplées à du FITC, à travers l'endothélium (**Figure 54**).



**FIGURE 54 : LE PASSAGE DE DEXTRAN-FITC À TRAVERS LA MONOCOUCHE ENDOTHÉLIALE EST AUGMENTÉ À 40°C.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique dans des inserts de culture à 37°C ou à 40°C pendant 24h. Par la suite, elles ont été replacées à 37°C et du dextran-FITC a été ajouté à la surface de ces cellules. Toutes les 30 minutes pendant 6h, la quantité de dextran-FITC passé à travers le tapis endothélial a été mesurée par fluorescence (longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 485 nm et 528 nm respectivement). Les résultats sont exprimés en quantité de fluorescence mesurée en fonction du temps d'incubation des HCAEC à chaque température. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 2 expériences +/- SEM.

Nous observons qu'une plus grande quantité de dextran a tendance à passer à travers l'endothélium à 40°C par rapport à 37°C. Les effets de la température deviennent significatifs à partir de 4h pour rester élevés jusqu'à 6h suggérant, en lien avec les résultats obtenus sur la VE-cadhérine, que la perméabilité endothéliale pourrait être augmentée lorsque l'endothélium est soumis à une hyperthermie modérée. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de renforcer cette hypothèse.

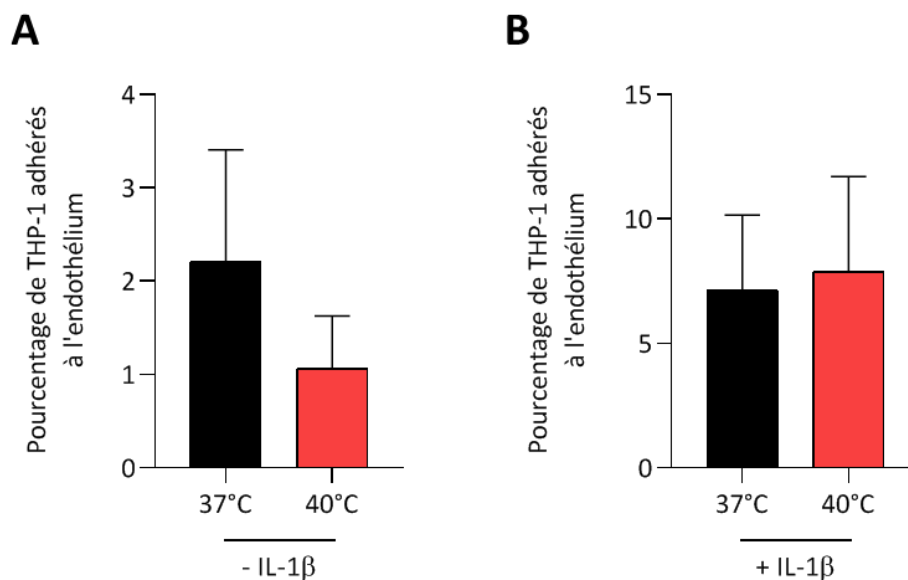
## II.2. Étude de la diapédèse monocytaire

Lorsque la perméabilité augmente, d'autres fonctions endothéliales peuvent être impactées, notamment les fonctions ayant trait aux étapes de diapédèse, étapes que nous avons modélisé *in vitro*. Nous avons étudié deux grandes étapes de la diapédèse : l'adhérence monocytaire et la transmigration.



### II.2.1. Étude de l'adhérence monocytaire

L'endothélium est capable d'augmenter son expression de molécules d'adhérence et de chimiokines afin de favoriser le recrutement leucocytaire, notamment au niveau des sites d'inflammation. Lors des analyses de *microarray* et des validations d'expression par TLDA, nous avons pu observer une diminution de l'expression des gènes CCL2 et SELE à 40°C. Ces deux gènes codent respectivement pour la chimiokine MCP-1 et pour la sélectine E, impliquées toutes deux dans les fonctions d'adhérence (Nourshargh and Alon, 2014). Nous nous sommes donc placés en condition de flux laminaire afin d'évaluer l'effet d'un pré-conditionnement thermique des HCAEC sur l'adhérence monocytaire, en utilisant des THP-1 DsRed (**Figure 55**).



**FIGURE 55 : L'ADHÉRENCE MONOCYTAIRE À L'ENDOTHÉLIUM N'EST PAS MODIFIÉE PAR LA TEMPÉRATURE.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition de flux laminaire (10 dyn.cm<sup>2</sup>) pendant 24h à 37°C avant d'être traitées ou non, toujours dans les mêmes conditions de culture, avec de l'IL-1β (10 ng/mL) pendant une nuit. Par la suite, un pré-conditionnement thermique des HCAEC à 37°C ou à 40°C pendant 6h a été effectué, toujours en condition de flux laminaire (10 dyn.cm<sup>2</sup>), puis une lignée monocytaire humaine (THP-1 DsRed) a été mise en circulation sur les tapis endothéliaux pendant 1h à 37°C, à 5 dyn.cm<sup>2</sup> et à une concentration de 500 000 cellules/mL. Le flux a ensuite été stoppé et des photos des tapis cellulaires ont été prises à l'INCell 2200. Les THP-1 DsRed ainsi que les HCAEC ont été dénombrées à l'aide du logiciel d'imagerie cellulaire INCell Developer®. Le nombre de THP-1 a ensuite été normalisé au nombre de cellules endothéliales présentes dans chaque champ. Les résultats sont donc exprimés en pourcentage de THP-1 adhérent à l'endothélium en fonction de la température en absence (A) ou en présence (B) d'IL-1β. Ces résultats ont été obtenus sur une moyenne de 6 expériences +/- SEM.

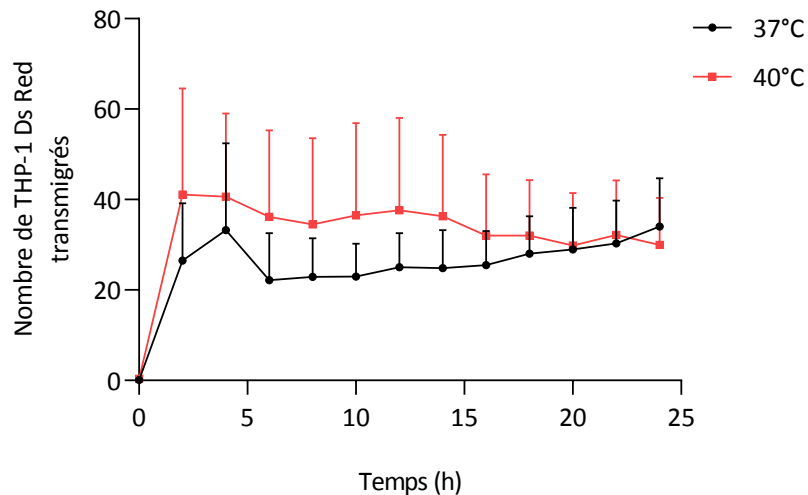
Sans traitement à l'IL-1 $\beta$ , un faible pourcentage de monocytes (inférieur à 4%) adhère à l'endothélium, quelle que soit la température. Une diminution non significative de ce pourcentage est observée à 40°C suggérant que la température ne semble pas avoir d'effet sur l'adhérence monocyttaire (**Figure 55A**). Néanmoins, le pourcentage d'adhérence étant très faible, la comparaison entre les deux températures est difficile à établir.

Afin de stimuler davantage l'adhérence monocyttaire et effectuer une comparaison plus robuste, nous nous sommes placés dans des conditions inflammatoires. Pour cela, les cellules endothéliales ont été traitées avec de l'IL-1 $\beta$  puis la même expérience a été réalisée.

Dans ces conditions, le pourcentage de monocytes ayant adhéré à l'endothélium est plus élevé que précédemment (**Figure 55B**), montrant que l'IL-1 $\beta$  induit une augmentation de l'adhérence monocyttaire. Cependant, aucune différence significative de ce pourcentage n'est observée entre les conditions 37°C et 40°C suggérant, une nouvelle fois, que la température n'a pas d'effet sur l'adhérence monocyttaire.

### II.2.2. Étude de la transmigration des monocytes à travers l'endothélium

Les protéines impliquées dans l'adhérence et dans la transmigration des monocytes n'étant pas les mêmes, nous avons poursuivi notre démarche pour déterminer si la température pouvait avoir un effet sur la deuxième étape de la diapédèse, à savoir le passage des monocytes à travers l'endothélium (**Figure 56**).



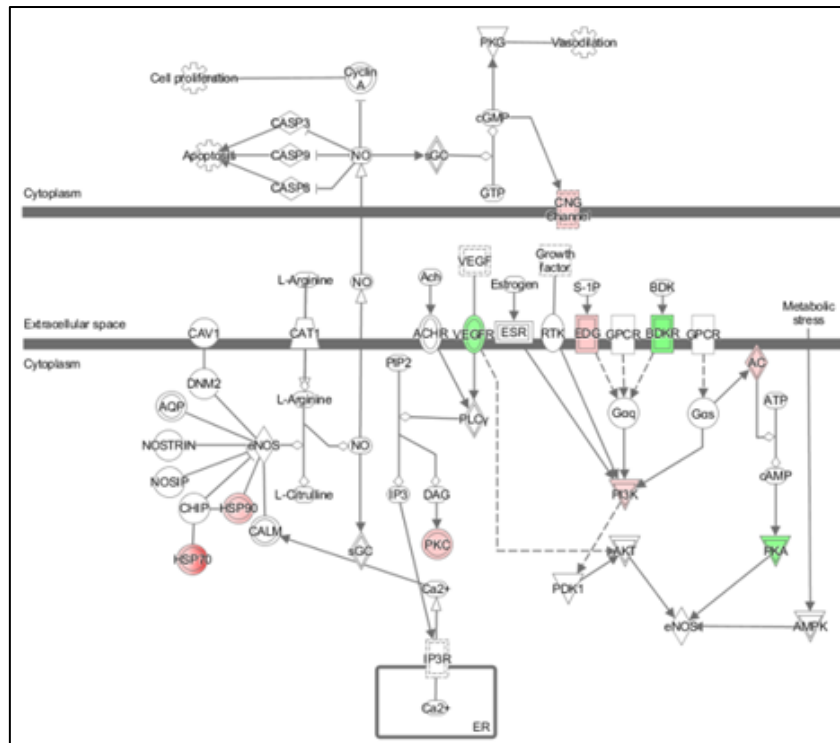
**FIGURE 56 : LA TRANSMIGRATION DES MONOCYTES N'EST PAS MODIFIÉE PAR LA TEMPÉRATURE.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique dans des inserts de culture et placées à 37°C ou 40°C pendant 6h. Des monocytes humains (THP-1 DsRed) ont ensuite été ajoutés à la surface endothéliale (5000 cellules/insert) et placé à 37°C dans l'Incucyte. Des photos des puits inférieurs ont été prises toutes les 2h pendant 24h afin d'évaluer le nombre de THP-1 ayant transmigré à travers la monocouche endothéliale. Les THP-1 DsRed ont ensuite été dénombrés grâce au logiciel IncuCyte S3®. Les résultats sont donc exprimés en nombre de THP-1 ayant transmigré en fonction du temps d'incubation et du pré-conditionnement thermique. Ils ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM.

Une tendance à l'augmentation du nombre de monocytes ayant transmigré à travers l'endothélium est observée à 40°C. Cependant, les différences sont statistiquement non significatives, indiquant que la température n'a pas d'effet marqué sur la transmigration des monocytes.

### II.3. Implication de la voie de signalisation eNOS

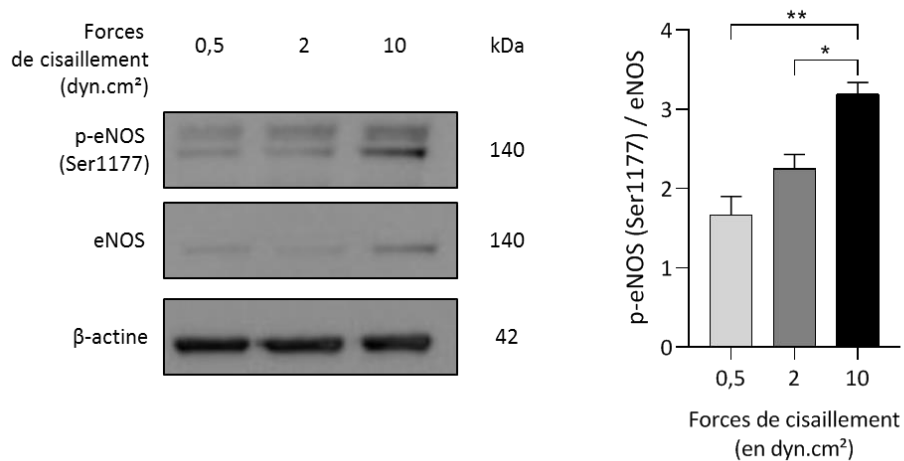
La dysfonction endothéliale est caractérisée par une vasodilatation endothélium-dépendante perturbée, une biodisponibilité réduite de monoxyde d'azote (NO) et, de manière plus générale, une altération de la voie de signalisation de la NO synthase (eNOS), responsable de ces deux mécanismes. C'est pourquoi, pour compléter nos résultats d'un point de vue fonctionnel, nous avons décidé d'étudier l'impact d'une augmentation de température sur cette voie de signalisation. De plus, l'identification de cette voie dans l'analyse bio-informatique de nos *microarrays* nous a conforté dans l'idée qu'elle pouvait être impactée par la température (**Figure 57**).



**FIGURE 57** : VOIE DE SIGNALISATION eNOS PRÉDITE POUR ÊTRE IMPLIQUÉE DANS LA RÉPONSE CELLULAIRE À LA TEMPÉRATURE.

Les 581 gènes différentiellement modulés par la température à 6h ont été intégrés dans le logiciel IPA, permettant de mettre en évidence la voie de signalisation eNOS. Les gènes différentiellement exprimés au sein de cette voie de signalisation sont annotés en rouge lorsque leur expression est augmentée en réponse à la température ou en vert, lorsque leur expression est diminuée.

Cette voie est activée par les forces de cisaillement appliquées à la surface des cellules endothéliales (Chistiakov, Orekhov and Bobryshev, 2017) et la phosphorylation de la protéine eNOS est un marqueur d'activation de cette voie de signalisation. C'est pourquoi nous avons vérifié, dans un premier temps, que nos conditions de culture permettaient de détecter une activation de la voie eNOS dans les HCAEC (Figure 58).

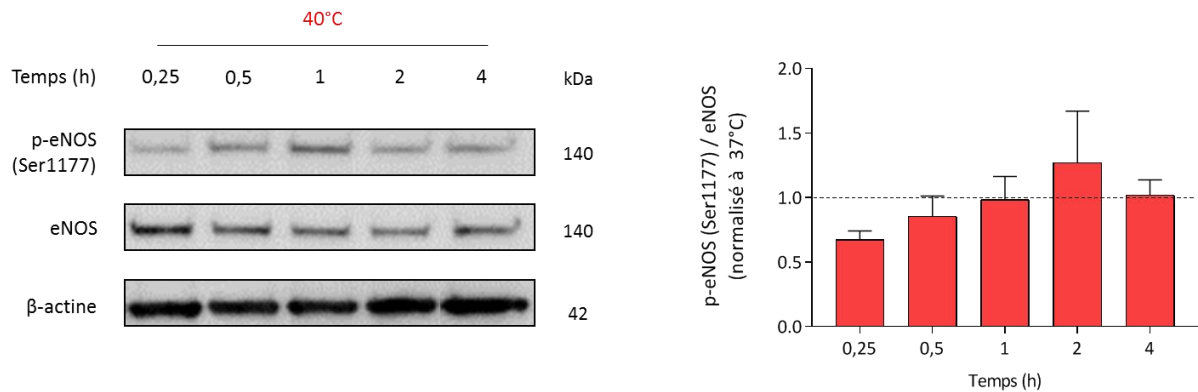


**FIGURE 58** : LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE eNOS AUGMENTE DE MANIÈRE CONCOMITANTE À L'AUGMENTATION DES FORCES DE CISAILLEMENT.

Les HCAEC ont été cultivées pendant 48h en condition de flux laminaire à 0.5 dyn.cm<sup>2</sup>, 2 dyn.cm<sup>2</sup> ou 10 dyn.cm<sup>2</sup>. L'expression des protéines p-eNOS, eNOS et β-actine a été quantifiée par western blot à partir de 9 μg de protéines ayant migré sur un gel « NuPAGE™ Bis-Tris 4-12% » et ayant été transférés sur une membrane PVDF 0,2 μm. L'expression des protéines p-eNOS et eNOS a été normalisée à celle de la β-actine pour s'affranchir des possibles écarts de dépôts puis le rapport de ces deux expressions a permis d'établir une quantification p-eNOS/eNOS en fonction des forces de cisaillement. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM. \*P<0.05 et \*\*P<0.01 entre les groupes indiqués.

La phosphorylation de la protéine eNOS augmente de manière concomitante avec l'augmentation des forces de cisaillement, suggérant une activation de la voie eNOS en condition de flux physiologique (10 dyn.cm<sup>2</sup>).

Étant capable de visualiser une activation de la voie de signalisation eNOS dans les HCAEC, nous nous sommes intéressés, dans un second temps, à l'activation de cette voie en réponse à la température. Cependant, étant donné que nos expériences de *microarray* ont été réalisées en condition statique, nous avons décidé de conserver ces mêmes conditions de culture pour étudier l'effet de la température sur la phosphorylation de la eNOS (**Figure 59**).



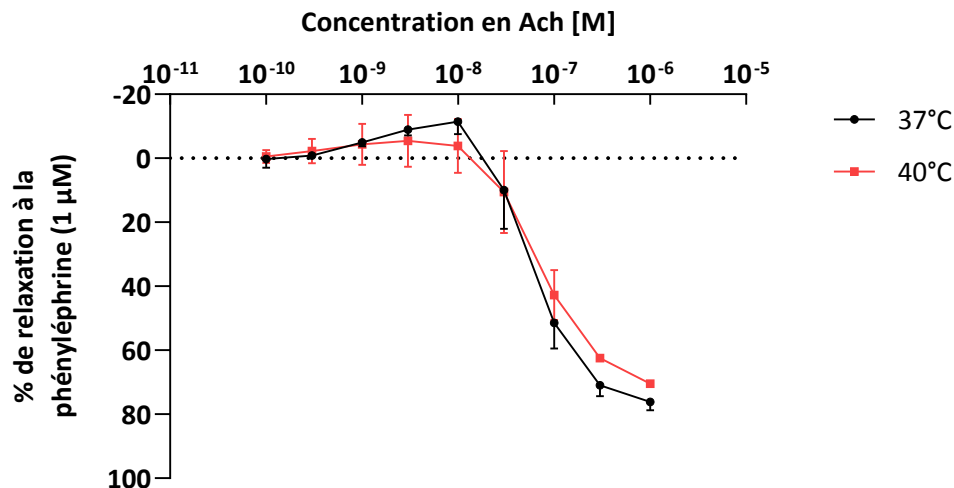
**FIGURE 59 : LA TEMPÉRATURE N'A PAS D'EFFET SUR LA PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE ENOS.**

Les HCAEC ont été cultivées à 37°C ou à 40°C pendant 15 minutes, 30 minutes, 1h, 2h ou 4h. L'expression des protéines p-eNOS, eNOS et  $\beta$ -actine a été quantifiée par western blot à partir de 9  $\mu$ g de protéines ayant migré sur un gel « NuPAGE™ Tris-Acétate 3-8% » et ayant été transférés sur une membrane PVDF 0,2  $\mu$ m. L'expression des protéines p-eNOS et eNOS a été normalisée à celle de la  $\beta$ -actine pour s'affranchir des possibles écarts de dépôts puis le rapport de ces deux expressions a permis d'établir une quantification p-eNOS/eNOS en fonction de la température et du temps d'incubation des HCAEC à chaque température. Les valeurs obtenues à 40°C ont ensuite été normalisées avec celles obtenues à 37°C. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM.

Aucune différence significative de phosphorylation n'a été observée entre 37°C et 40°C, suggérant que la température n'a pas d'effet sur l'activation de la protéine eNOS en condition statique.

Pour compléter ces données, nous avons ensuite utilisé l'ADMA (*Asymmetric DiMethylArginine*) (Vallance Patrick and Leiper James, 2004; Böger, 2007) qui induit un découplage de la NOS entraînant la production d'espèces radicalaires. Parmi les 26 gènes du panel, seul le gène BDKRB2, codant pour le récepteur B2 de la bradykinine, semble être modulé par l'ADMA (Cf. **Annexe II, Tableau 29**). Tous les autres gènes ont une expression qui ne varie pas en réponse à l'ADMA. Ces résultats, encore préliminaires, ne semblent pas indiquer la mobilisation de la voie de signalisation eNOS en réponse à la température mais d'autres expériences nous permettant de mesurer directement le NO seraient nécessaires.

Pour ce faire, parallèlement à ces expériences et en collaboration avec l'équipe de pharmacologie de Sanofi, nous avons réalisé des expériences sur des artères iliaques de rat soumises à différentes températures. Nous avons tout d'abord induit une contraction de ces vaisseaux avec de la phényléphrine, puis nous avons ajouté des doses croissantes d'acétylcholine, pour entraîner leur relaxation (**Figure 60**).



**FIGURE 60 : LA TEMPÉRATURE N' A PAS D'EFFET SUR LA RELAXATION DES ARTÈRES ILIAQUES DE RATS.**

Les artères iliaques de rats mâles Wistar Han ont été placées dans des cuves d'organes isolés remplies d'une solution de Krebs à 37°C ou à 40°C pendant 4h. À la suite de cette incubation, les artères ont été soumises à une solution de phényléphrine ( $10^{-6}$  M) afin d'obtenir une contraction maximale des vaisseaux. Ces derniers ont ensuite été soumis à des concentrations croissantes d'acétylcholine (de  $10^{-10}$  M à  $10^{-5}$  M) toutes les deux minutes pour induire une vasorelaxation. Les données de cette expérience ont été enregistrées à l'aide du logiciel Iox2 (EMKA Technologies®) et l'analyse a ensuite été effectuée avec le logiciel Datanalyst (EMKA Technologies®). Les résultats sont exprimés en pourcentage de relaxation à la phényléphrine en fonction de la concentration en acétylcholine et ont été obtenus sur 2 expériences (+/- SEM).

Aucune différence de relaxation n'a été observée entre 37°C et 40°C, suggérant que la température ne semble pas impacter la vasodilatation de ces vaisseaux sanguins. Néanmoins, il est à noter que ces résultats ont été obtenus après 4h d'incubation à chaque température. Il serait donc nécessaire de reproduire ces expériences avec une durée d'incubation de 6h à chaque température afin d'être en accord avec l'ensemble des résultats obtenus précédemment et laisser le temps aux cellules de mettre en place les différentes voies de signalisation ainsi que la transcription des gènes intervenant dans la réponse endothéliale à la température.

Par ces résultats fonctionnels, nous avons montré que la perméabilité des cellules endothéliales est augmentée en condition d'hyperthermie modérée mais cela ne s'accompagne pas d'un phénotype plus permissif au recrutement et au passage des leucocytes. Concernant la voie de signalisation eNOS, impliquée dans le maintien de la fonction endothéliale, elle ne semble pas être impliquée dans la réponse endothéliale à la température en condition statique. Néanmoins, il est encore difficile de tirer une conclusion définitive car les expériences réalisées sont encore majoritairement préliminaires et des expériences complémentaires sont nécessaires pour compléter l'étude de cette voie de

signalisation.

### III. Mesures thermiques en conditions physiopathologiques

Dans certaines pathologies, la température peut varier localement au sein du réseau vasculaire. Des hétérogénéités thermiques ont d'ailleurs été retrouvées au sein des plaques d'athérome, en comparaison avec des régions vasculaires saines (Casscells *et al.*, 1996; Stefanadis *et al.*, 1999; Madjid *et al.*, 2002; Verheye *et al.*, 2002). Ces plaques d'athérome se développent préférentiellement au niveau des bifurcations artérielles où le flux sanguin est perturbé. Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, les perturbations hémodynamiques générées dans les zones vasculaires à géométrie complexe pourraient influencer le transfert thermique, conduisant ainsi à une augmentation de la température au sein de la paroi vasculaire. Cependant, si de telles variations locales de la température existant au niveau des bifurcations n'ont jamais été explorées, c'est sans doute parce que cette exploration est techniquement complexe.

L'objectif de cette troisième partie a donc été de déterminer s'il y a une élévation locale de la température au sein des bifurcations *ex vivo*, *in vitro* et *in vivo* et par quels mécanismes les cellules endothéliales sont capables de percevoir les variations thermiques.

#### III.1. Mesure de la température *ex vivo* dans différents modèles

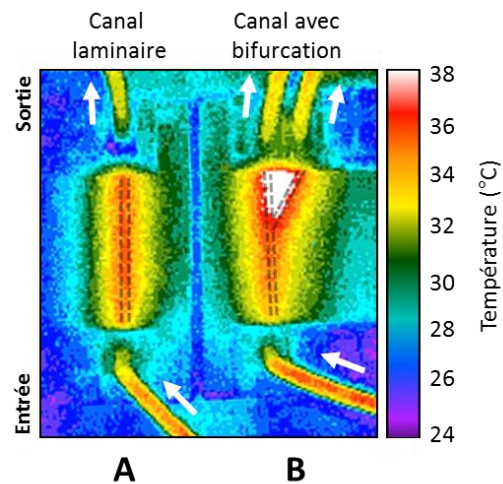
Dans un premier temps, nous avons mesuré les variations thermiques dans des modèles simples de bifurcations, en absence de cellules endothéliales.

##### III.1.1. Le modèle Cellix®

Nous avons tout d'abord utilisé des systèmes micro-fluidiques commercialisés par le fournisseur Cellix®, équipés de canaux assurant un flux laminaire ou de canaux comprenant une bifurcation.

De manière très simple, nous avons fait circuler une solution aqueuse préchauffée à 37°C dans chacun des canaux pour visualiser, de manière locale, de possibles variations de température (**Figure 61**).





**FIGURE 61** : LA TEMPÉRATURE DE LA SOLUTION AQUEUSE AUGMENTE DE MANIÈRE LOCALE AU NIVEAU DE LA BIFURCATION, *EX VIVO*.

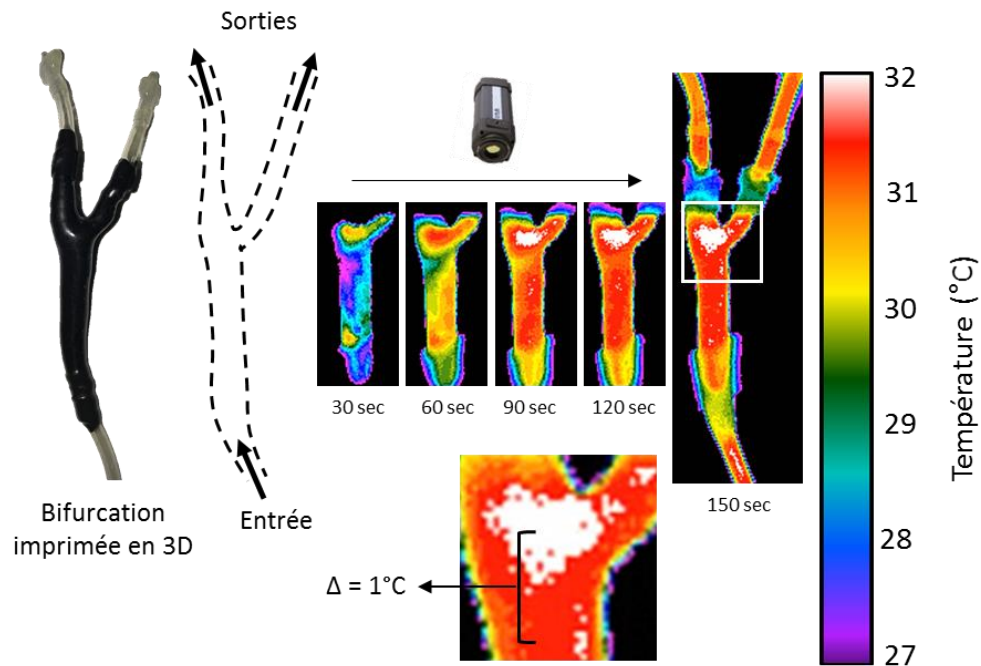
Une solution aqueuse préchauffée à 37°C a été mise en circulation à 10 dyn.cm<sup>2</sup> dans des canaux laminaires (**A**) ou comprenant une bifurcation (**B**). Les variations thermiques ont été mesurées à l'aide d'une caméra infrarouge. Ces images sont représentatives d'un total de 3 expériences.

Avec le système de canal à régime laminaire, la température mesurée est homogène (36°) entre l'entrée et la sortie du canal (**Figure 61A**). Au contraire, au sein du canal comprenant une bifurcation, nous constatons une différence de température entre la partie laminaire et la bifurcation, où la température présente une élévation de 3°C (**Figure 61B**).

Cette variation locale de température valide notre hypothèse de départ. Néanmoins, cette expérience ne prend ni en compte les paramètres du sang (éléments circulants, viscosité, etc.), ni la structure d'un vaisseau sanguin (forme, compliance, élasticité, etc.). Seule une solution aqueuse a été utilisée et les canaux sont de section rectangulaire, bien loin de la structure d'un vaisseau sanguin.

### III.1.2. Le modèle de bifurcation imprimée en 3D

Nous avons ensuite cherché à nous rapprocher des paramètres d'une bifurcation artérielle. Pour cela, nous sommes partis des données 3D d'une carotide humaine comprenant une bifurcation et nous l'avons reproduite par impression en 3D. De la même manière que précédemment, nous avons fait circuler une solution aqueuse préchauffée à 37°C afin d'observer les éventuelles variations thermiques (**Figure 62**).

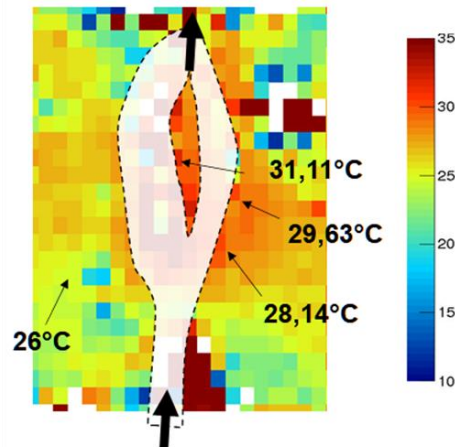


**FIGURE 62 : LA TEMPÉRATURE DE LA SOLUTION AQUEUSE AUGMENTE DE MANIÈRE LOCALE, *EX VIVO*, DANS UN MODÈLE DE BIFURCATION IMPRIMÉE EN 3D.**

*Une solution aqueuse préchauffée à 37°C a été mise en circulation à 10 dyn.cm<sup>2</sup> dans une bifurcation imprimée en 3D à partir des données 3D d'une carotide humaine. Les variations thermiques ont été mesurées à l'aide d'une caméra infrarouge après 30, 60, 90, 120 ou 150 secondes de flux. Ces images sont représentatives d'un total de 3 expériences.*

Au cours du temps, nous remarquons que l'intégralité du canal est réchauffée par la solution aqueuse jusqu'à l'obtention d'une température homogène dans la partie laminaire du canal, après 150 secondes. En parallèle, une augmentation de la température de 1°C est observée au niveau de la bifurcation. Une fois de plus, nous constatons une élévation locale de la température malgré le fait que de nombreux paramètres physiologiques n'aient pas été incorporés dans le modèle utilisé.

Pour compléter ces données, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) a été utilisée sur ce même modèle de bifurcation 3D afin de visualiser de manière plus précise les possibles variations de température. Les résultats ont été obtenus par un chercheur du laboratoire Inserm et sont illustrés **Figure 63**.



**FIGURE 63** : CARTOGRAPHIE DE LA TEMPÉRATURE ÉTABLIE PAR IRM *EX VIVO*, DANS UN MODÈLE DE BIFURCATION IMPRIMÉE EN 3D.

Une solution aqueuse préchauffée à 37°C a été mise en circulation à 10 dyn.cm<sup>2</sup> dans une bifurcation imprimée en 3D à partir des données 3D d'une carotide humaine. Les variations thermiques ont été enregistrées par IRM et une cartographie de la température a été établie. Ces images sont représentatives d'un total de 3 expériences.

Ces données montrent une distribution hétérogène de la température au sein du vaisseau, caractérisée par la présence de points chauds au niveau de la bifurcation (**Figure 63**). Elles confortent l'ensemble des résultats obtenus précédemment mais il s'agit de données encore préliminaires qui nécessitent plusieurs mises au point afin de définir précisément les variations locales de température au sein de la bifurcation.

### III.2. Mesure de la température *in vitro*

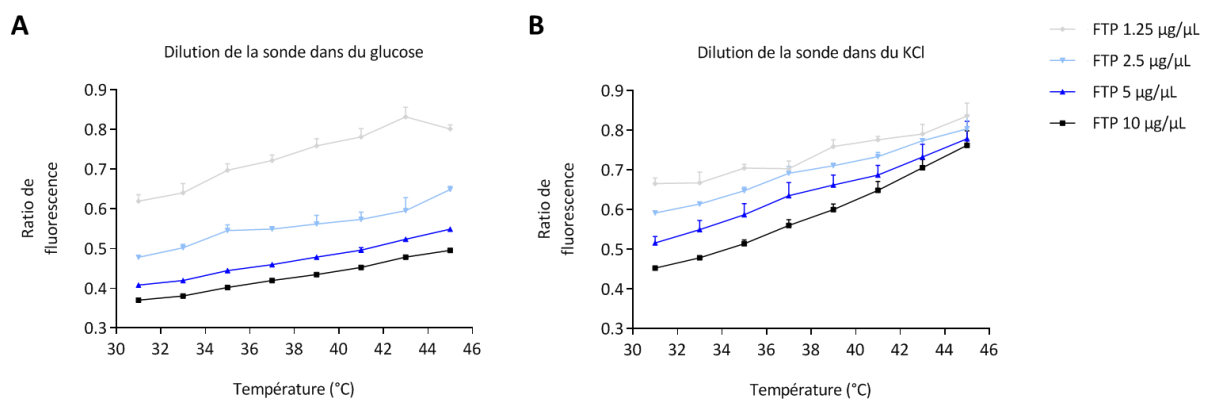
Les élévations de température que nous avons mises en lumière dans les systèmes précédents pourraient se répercuter sur le tapis de cellules endothéliales. Pour tenter de le démontrer formellement, nous avons utilisé une sonde fluorescente thermosensible (Uchiyama *et al.*, 2015) (obtenue en collaboration avec les Dr. Uchiyama et Inada de l'Université de Tokyo au Japon) que nous avons incorporée à l'intérieur des cellules endothéliales. Cette sonde est constituée de quatre sous-unités dont deux sont fluorescentes. Une de ces sous-unités émet une fluorescence dont l'intensité est indépendante des variations de température. Elle est donc stable et sert de contrôle qualité à l'incorporation de la sonde au sein des cellules. En revanche, la deuxième sous-unité émet une fluorescence dont l'intensité est dépendante des variations thermiques. Son intensité de fluorescence augmente avec l'élévation de la température. Ainsi, en effectuant un ratio des deux intensités de

fluorescence pour chaque cellule, nous sommes capables de définir la température présente à l'intérieur de chacune d'elle, de manière relativement précise.

Notre objectif final était donc de perfuser les cellules avec du milieu de culture et de visualiser, par immunofluorescence et de manière simultanée, une possible variation locale de la température au sein des cellules localisées au niveau de la bifurcation.

### III.2.1. Validation de la sonde en condition statique

Tout d'abord, nous avons cherché à définir les conditions optimales (concentration et solution de dilution) pour l'utilisation de la sonde thermosensible en condition statique. Pour chaque condition testée, la température environnante des cellules a été augmentée progressivement et les ratios de fluorescence ont été calculés pour chaque cellule. Cela nous a permis de vérifier que ces ratios augmentaient avec l'augmentation de température et d'évaluer la sensibilité de la sonde. Les courbes obtenues sont représentées **Figure 64**.



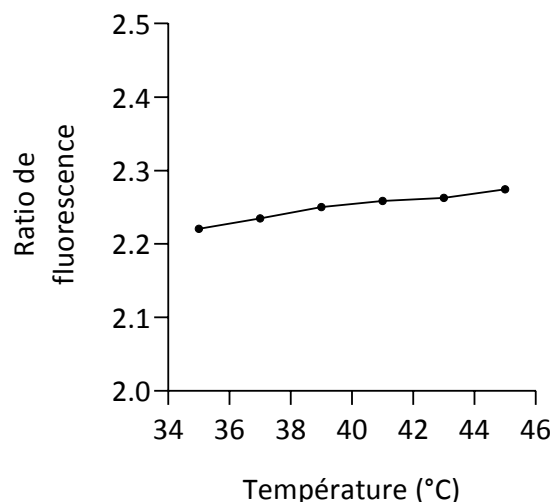
**FIGURE 64** : LES RATIOS DE FLUORESCENCE DE LA SONDE THERMIQUE AUGMENTENT AVEC LA TEMPÉRATURE EN CONDITION STATIQUE.

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C pendant 24h. Elles ont ensuite été traitées pendant 10 minutes avec la sonde thermique à différentes concentrations (10 µg/mL, 5 µg/mL, 2.5 µg/mL et 1.25 µg/mL) et dans deux solutions de dilution différentes (5% de glucose ou 150 mM de KCl). Des mesures de fluorescence (longueur d'onde d'excitation : 458 nm, longueurs d'onde d'émission : 510 nm et 580 nm) ont ensuite été réalisées sur cellules vivantes à l'INCell 2200 pour une gamme de température allant de 31°C à 45°C, avec un pas de 2°C. Après chaque augmentation, la température a été stabilisée pendant 30 minutes avant la prise de photos. Les intensités de fluorescence pour chaque sous unité ont été générées à partir du logiciel d'imagerie cellulaire INCell Developer® et les ratios de fluorescence ont été calculés pour chaque température et chaque condition. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM.

Dans toutes les conditions testées, plus la température augmente et plus les ratios de fluorescence de la sonde augmentent également. Néanmoins, nous remarquons que le delta de fluorescence le plus élevé est obtenu lorsque la sonde est diluée dans une solution de KCl à une concentration de 10 µg/mL en lien avec ce qui était déjà publié sur cette sonde (Uchiyama *et al.*, 2015). De plus, les variations des ratios de fluorescence étaient également cohérentes avec les résultats obtenus par Uchiyama et al. Nous avons donc choisi ces conditions pour la suite des expériences.

### III.2.2. Validation de la sonde en condition de flux

Nous avons ensuite voulu valider le fonctionnement de la sonde en condition de flux. Pour cela, les cellules endothéliales ont été cultivées en condition de flux laminaire (10 dyn.cm<sup>2</sup>) dans du milieu de culture complet à plusieurs températures contrôlées, de 35°C à 45°C (**Figure 65**).



**FIGURE 65** : LES RATIOS DE FLUORESCENCE DE LA SONDE THERMIQUE NE VARIENT PAS AVEC LA TEMPÉRATURE EN CONDITION DE FLUX LAMINAIRE.

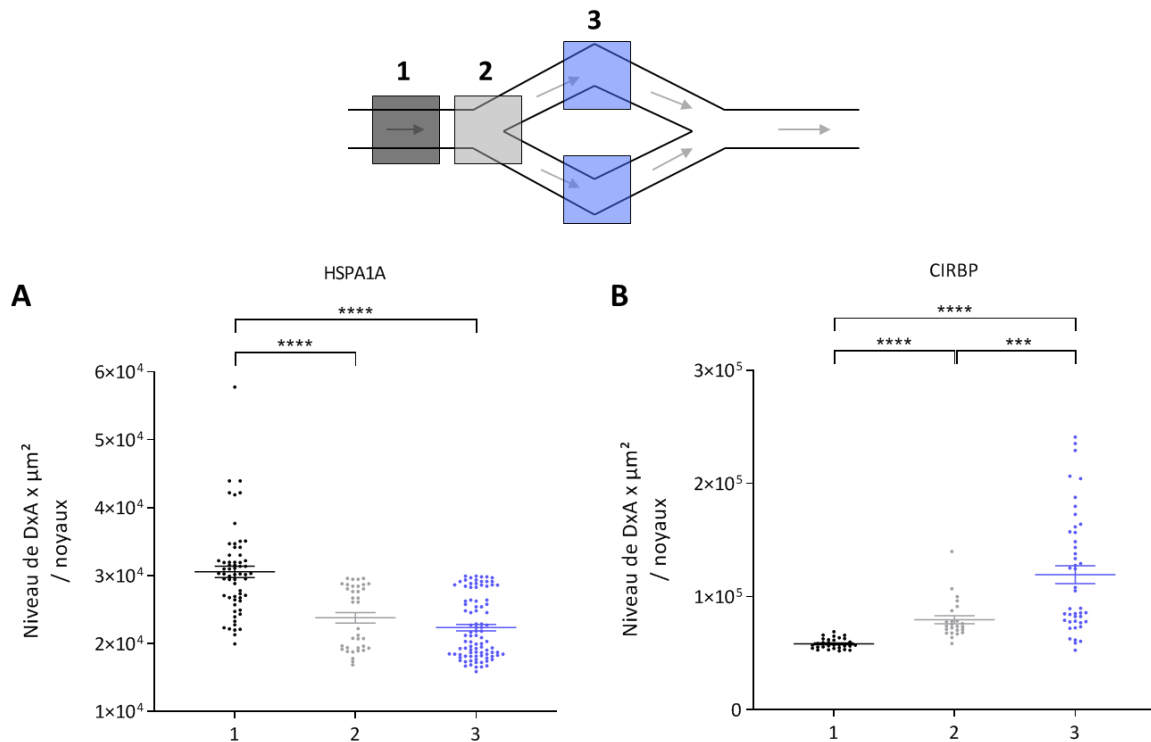
Les HCAEC ont été cultivées en condition de flux laminaire (10 dyn.cm<sup>2</sup>) à 37°C pendant 24h. Elles ont ensuite été traitées en condition statique avec la sonde thermique (10µg/mL diluée dans du KCl 150 mM). Les cellules ont ensuite été replacées en condition de flux laminaire et des mesures de fluorescence (longueur d'onde d'excitation : 458 nm, longueurs d'onde d'émission : 510 nm et 580 nm) ont ensuite été réalisées au microscope à fluorescence pour une gamme de température allant de 35°C à 45°, avec un pas de 2°C. Après chaque augmentation, la température a été stabilisée pendant 30 minutes avant la prise de photos. Les intensités de fluorescence pour chaque sous unité ont été générées à partir du logiciel Zen® et les ratios de fluorescence ont été calculés pour chaque température. Ce graphique est représentatif de 3 expériences.

Aucune variation du ratio de fluorescence n'a été observée lors de l'augmentation progressive de la température en condition de flux laminaire. Nous n'avons pas pu établir les raisons pour lesquelles cette sonde thermique ne fonctionne pas comme attendu en condition de flux malgré le fait que de nombreuses conditions aient été testées. Nous étions donc dans l'impossibilité de visualiser, avec cette sonde, une variation thermique locale des cellules endothéliales cultivées en flux.

### III.2.3. Expression protéique au sein des bifurcations

Nous avons donc tenté de trouver une solution alternative à l'utilisation de la sonde thermosensible. Compte tenu des résultats obtenus précédemment en *microarray*, nous savons que les HSP et CIRBP sont des marqueurs fiables dont l'expression augmente et diminue respectivement en réponse à une élévation de température. Les niveaux d'expression de HSPA1A et de CIRBP ont donc été mesurés *in vitro* au sein d'une bifurcation et ont été comparés avec ceux des parties laminaires situées en amont. Pour cela, nous avons utilisé des modèles de canaux adaptés à la culture cellulaire en flux et nous avons réalisé différents immunomarquages (**Figure 66**).

Nous constatons que, comparativement à la zone laminaire (1), le niveau d'expression de HSPA1A semble être diminué (**Figure 66A**) alors que le niveau d'expression de CIRBP augmente (**Figure 66B**) au sein des zones non laminaires (2 et 3). Ces résultats sont inverses à nos prédictions et aux résultats observés *ex vivo*. En effet, nous nous attendions à observer une augmentation de la protéine HSPA1A au sein de la bifurcation et une diminution de la protéine CIRBP dans cette même zone, suggérant une augmentation de la température. Cependant, ces résultats pourraient être dus à la conformation des modèles de bifurcation utilisés dont nous parlerons dans la partie **Discussion**.

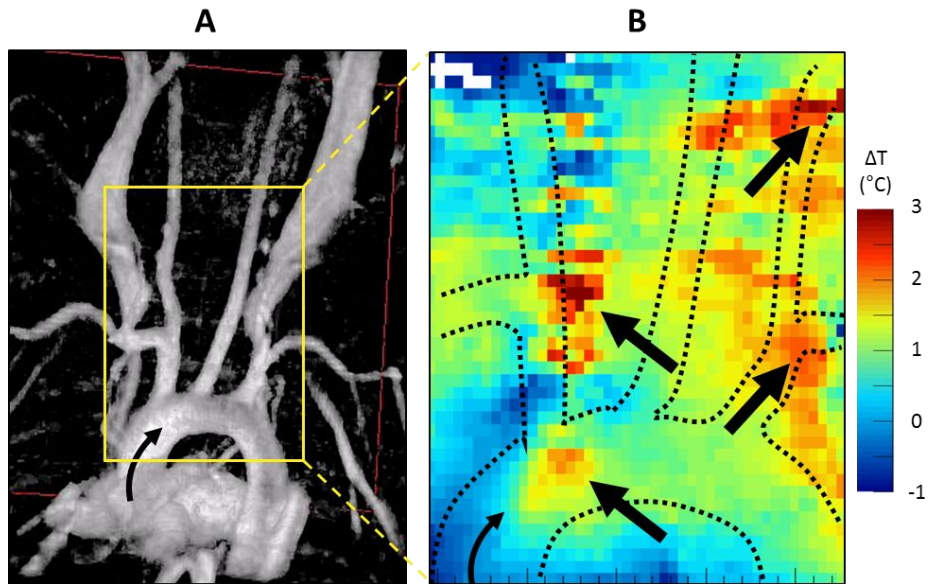


**FIGURE 66 : EXPRESSION PROTÉIQUE DE HSPA1A ET CIRBP DANS LES DIFFÉRENTES ZONES DE FLUX.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition de flux perturbé dans un canal comprenant une bifurcation ( $10 \text{ dyn.cm}^2$ ) pendant 24h à  $37^\circ\text{C}$ . Les cellules ont ensuite été fixées, perméabilisées et marquées avec des anticorps dirigés contre HSPA1A ou contre CIRBP. Les noyaux cellulaires ont également été marqué à l'aide du Hoechst 33342. Pour chaque canal, trois zones ont été délimitées : une zone laminaire (1), une zone de bifurcation (2) et une zone coudée (3) où le flux est également perturbé. Pour chaque zone, les HCAEC ont été dénombrées grâce aux marquages nucléaires et l'intensité de fluorescence obtenues pour chaque protéine a été quantifiée et normalisée au nombre de cellules. Chaque point représente le niveau de fluorescence par cellule et par zone (1, 2 ou 3). Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 4 expériences (pour HSPA1A) ou 2 expériences (pour CIRBP) +/- SEM. \*\*\* $P < 0.0005$  et \*\*\*\* $P < 0.0001$  entre les groupes indiqués.

### III.3. Mesure de la température *in vivo*

Afin d'éviter les problèmes liés à la configuration des canaux, nous avons effectué, avec un chercheur du laboratoire Inserm, des expériences *in vivo* chez la souris. Dans un premier temps, nous avons commencé par étudier les variations thermiques par IRM au niveau du sinus carotidien des souris, grandement sujet aux perturbations de flux (Figure 67).



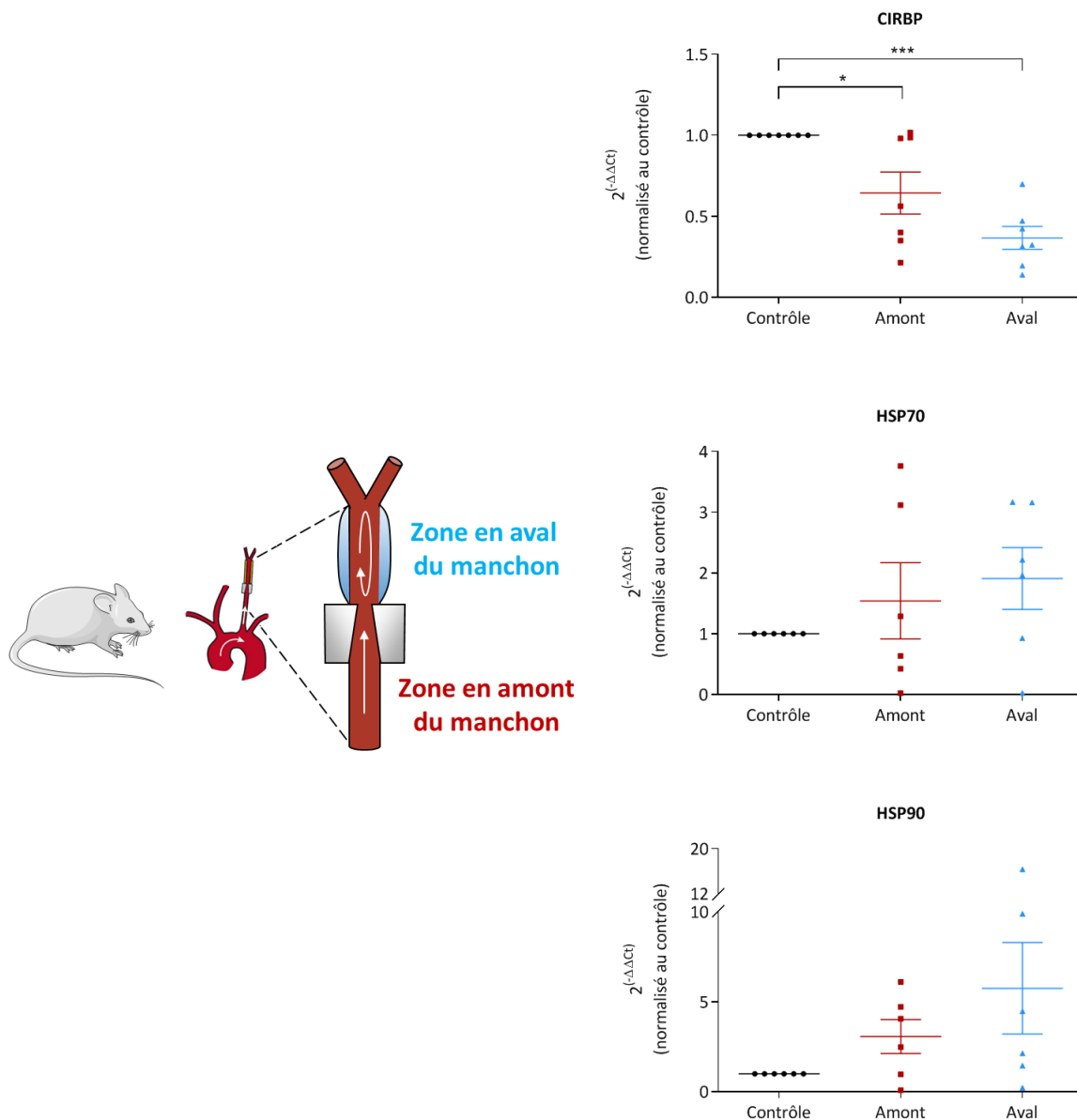
**FIGURE 67** : CARTOGRAPHIE DE LA TEMPÉRATURE ÉTABLIE PAR IRM AU NIVEAU D'UN SINUS CAROTIDIEN DE SOURIS.

Les variations thermiques ayant lieu au niveau du sinus carotidien de souris ont été enregistrées par IRM et une cartographie de la température a été établie. **(A)** Image en magnitude, permettant de quantifier l'aspect du flux. **(B)** Cartographie des variations thermiques. Ces images sont représentatives d'un total de 3 expériences.

Une fois de plus, nos résultats montrent une distribution hétérogène de la température dans cette zone, avec la présence de plusieurs points chauds symbolisés par les flèches noires sur la **Figure 67**. Néanmoins, même si ces données *in vivo* confortent à nouveau notre hypothèse de départ, il est encore difficile de quantifier précisément les variations de température car ces données restent préliminaires et nécessitent plusieurs mises au point.

En parallèle de ces données IRM, nous avons effectué d'autres expériences *in vivo* dans lesquelles nous avons placé un manchon constrictif sur une des carotides de la souris afin de créer des perturbations hémodynamiques en aval de ce manchon. En effet, la partie en aval du manchon présente de nombreuses perturbations hémodynamiques et des forces de cisaillement oscillatoires, semblables à ce que l'on pourrait observer au sein d'une bifurcation. Après avoir disséqué précisément chacun des territoires vasculaires selon le régime hémodynamique auquel il avait été soumis, nous avons étudié, par RT-qPCR, l'expression de plusieurs HSP et de CIRBP (**Figure 68**).





**FIGURE 68 : LES PERTURBATIONS DE FLUX GÉNÉRÉES PAR LE MANCHON AUGMENTENT L'EXPRESSION DES HSP ET DIMINUENT CELLE DE CIRBP.**

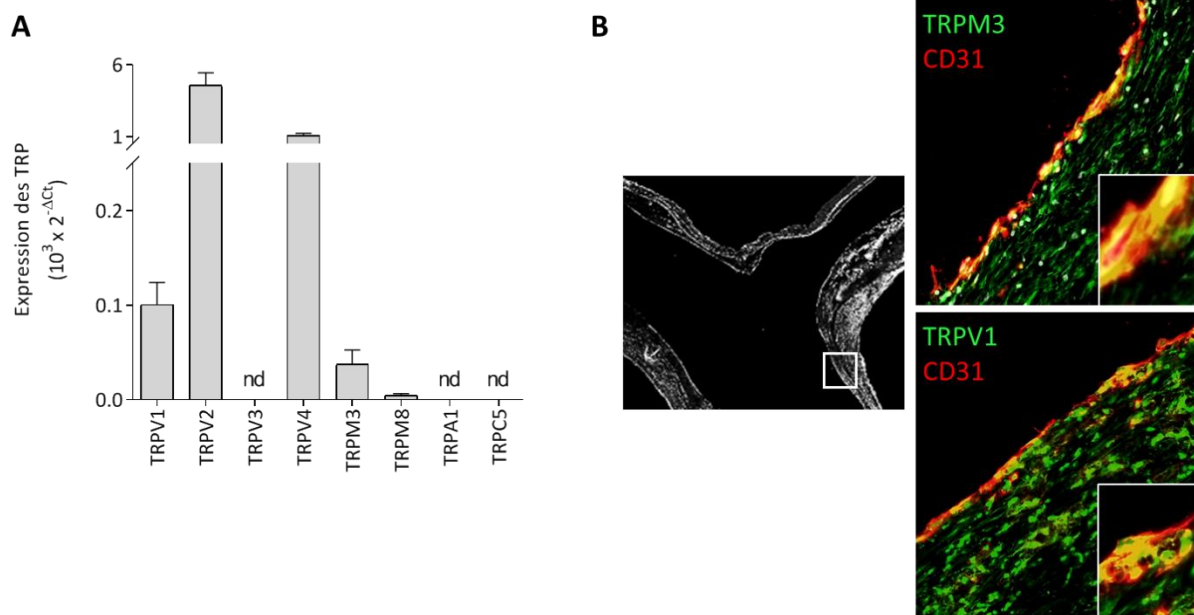
Un manchon constrictif a été placé sur la carotide gauche d'une souris et laissé pendant 24h avant mise à mort de l'animal. Les cellules de la paroi vasculaire situées en amont et en aval du manchon ont ensuite été récupérées, lysées et l'expression des HSP70, HSP90 et CIRBP a été quantifiée par RT-qPCR et normalisée à leur expression dans la carotide droite, considérée comme contrôle. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 6 animaux +/- SEM. \* $P < 0.05$  et \*\*\* $P < 0.0005$  entre les groupes indiqués.

Nous avons observé une diminution de l'expression de CIRBP ainsi qu'une augmentation de celle des HSP en amont comme en aval du manchon, en comparaison avec les expressions de la carotide contrôle. En aval du manchon, là où les perturbations hémodynamiques sont les plus fortes, ces différences d'expression sont accentuées (**Figure 68**). Les HSP et CIRBP étant des marqueurs fiables dont l'expression varie avec les modifications de température, nos données suggèrent une possible augmentation de la température au sein des zones de perturbation de flux, consolidant notre hypothèse de départ.

### III.4. Perception de la température par les HCAEC

Nous avons montré que les HCAEC étaient capables de mettre en place des réponses adaptatives aux changements de température mais les éléments leur permettant de percevoir ces variations thermiques restent encore inconnus. Pour explorer cette question, nous avons décidé d'étudier l'expression de leur récepteurs membranaires de surface : les TRP.

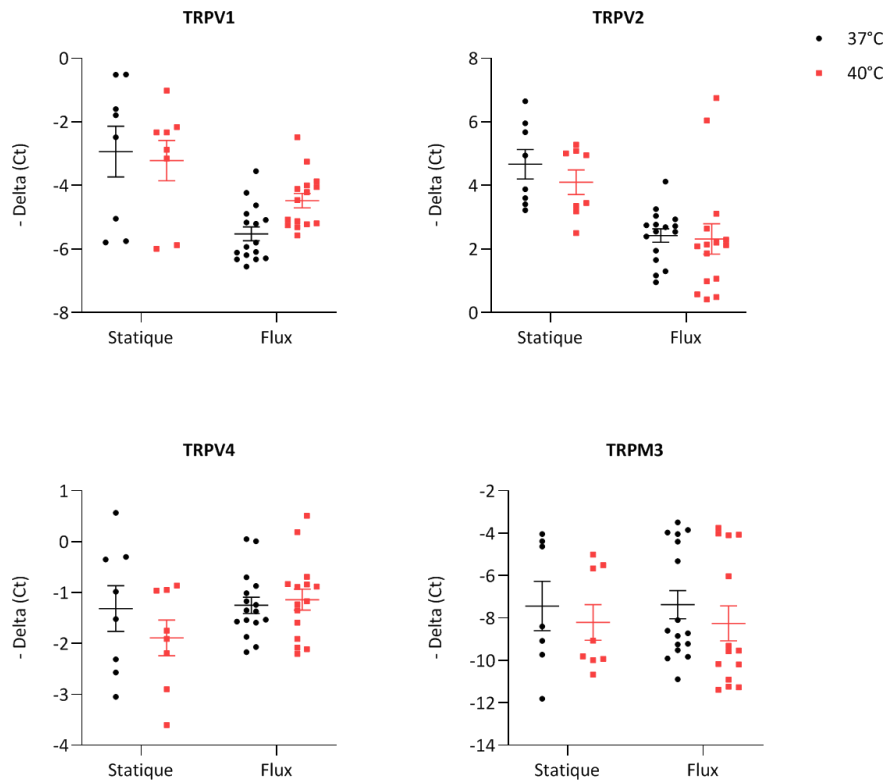
Dans un premier temps, nous avons étudié quels TRP étaient exprimés à la surface des HCAEC en condition basale, à 37°C (**Figure 69**). Nos résultats indiquent que les HCAEC expriment à leur surface plusieurs TRP qui peuvent être activés par la température. Parmi eux, nous retrouvons des TRP appartenant à la famille des « TRP vanilloïdes » (TRPV1, TRPV2 et TRPV4) et des « TRP mélastatines » (TRPM3). Le TRPM8 est très peu exprimé et les TRPA1 et TRPC5, appartenant respectivement aux familles des « TRP ankyrines » et des « TRP canoniques », ne sont pas exprimés au sein des HCAEC (**Figure 69A**). Ces données sont en accord avec l'expression des TRPV1 et TRPM3 étudiée par immunohistochimie. En effet, nos résultats montrent une expression omniprésente de ces deux TRP au sein des artères coronaires humaines (**Figure 69B**). Le co-marquage avec le CD31, marqueur spécifique des cellules endothéliales, suggère que ces TRP sont notamment exprimés par les cellules endothéliales vasculaires.



**FIGURE 69 : EXPRESSION DES TRP EN CONDITION BASALE.**

**(A)** Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C pendant 6h. Leurs ARN totaux ont été extraits et l'expression de plusieurs gènes a été étudiée par RT-qPCR. Chaque valeur obtenue a été normalisée aux valeurs de la  $\beta$ -actine. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 6 expériences +/- SEM. **(B)** Image représentative de 3 immunomarquages réalisés sur des artères coronaires humaines, disséquées à partir de cœurs explantés. Les artères ont été fixées et marquées avec des anticorps dirigés contre le CD31 (en rouge), le TRPV1 (en vert) ou le TRPM3 (en vert). La colocalisation entre CD31 et TRP est visualisable en jaune.

Dans un deuxième temps, l'expression des quatre TRP exprimés par les HCAEC (TRPV1, TRPV2, TRPV4 et TRPM3) a été étudiée à 40°C en condition statique ou en condition de flux laminaire et comparée à leur expression à 37°C. Les résultats obtenus sont illustrés **Figure 70**.



**FIGURE 70 : EXPRESSION DES TRP EN FONCTION DE LA TEMPÉRATURE ET DES CONDITIONS DE CULTURE.**

Les HCAEC et les Telo-HAEC ont été cultivées en condition statique ou en condition de flux laminaire ( $10 \text{ dyn.cm}^2$ ) à  $37^\circ\text{C}$  ou à  $40^\circ\text{C}$  pendant 6h. Leurs ARN totaux ont été extraits et l'expression de plusieurs gènes a été étudiée par RT-qPCR. Les résultats sont exprimés en  $-\Delta(\text{Ct})$  en fonction de chaque condition de culture où chaque point représente une expérience. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 6 expériences (pour les conditions statiques) et 16 expériences (pour les conditions de flux)  $\pm$  SEM.

Les TRPV1 et TRPV2 ont une expression qui tend à diminuer en condition de flux alors que celle des TRPV4 et TRPM3 n'est pas modifiée. Concernant la température, nous remarquons qu'en condition statique comme en condition de flux, l'expression des différents TRP n'est pas significativement modifiée (**Figure 70**). Ces données suggèrent donc que la température n'a pas d'effet sur l'expression des TRP.

L'ensemble des données obtenues sur les TRP nous ont permis de déterminer quels TRP étaient exprimés à la surface des HCAEC et la modulation de leur expression à  $40^\circ\text{C}$ . Des données complémentaires sur l'activité de ces canaux sensibles aux ions divalents sont à obtenir pour pouvoir tirer une conclusion définitive sur leur implication.

## IV. Conclusion des résultats

En résumé, nous avons montré que la protéine HSF1 était phosphorylée et que son activité était augmentée à 40°C car plusieurs gènes ayant des séquences HSE au sein de leur promoteur sont induits à cette température.

Nous avons également montré que mTORC1 était phosphorylé de façon plus précoce que le facteur de transcription HSF1 et que l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine prévenait l'augmentation d'expression de plusieurs gènes HSF1-dépendants. Cela suggère donc une interaction entre mTORC1 et HSF1 même si les effets variables obtenus avec la rapamycine sur la phosphorylation de HSF1 ne permettent pas de tirer de conclusion définitive.

En parallèle de la voie HSF1 qui est cytosolique, nous avons également montré que la voie ERN1, dans le réticulum endoplasmique, était engagée en réponse à une élévation de température. En effet, une augmentation de l'épissage du transcrite XBP1 est observée à 40°C et nous avons montré que l'inhibition de l'activité ribonucléasique de ERN1 par le B-I09 permettait d'inhiber cet épissage. De plus, des gènes ayant des séquences ERSE au sein de leur promoteur et prédits comme étant augmentés par ERN1 sont davantage transcrits à 40°C, validant l'implication de cette voie. L'augmentation de la transcription de DNAJB9, qui est XBP1-dépendant, est bloquée lorsque l'activité ribonucléasique de ERN1 est inhibée. Pour les autres gènes de cette voie UPR, l'intervention d'autres facteurs de transcription est probable.

D'un point de vue fonctionnel, nous avons montré que la voie de signalisation eNOS, pourtant identifiée lors des analyses IPA, ne semble pas être impliquée dans la réponse mise en place par les HCAEC. En effet, la protéine eNOS n'est pas phosphorylée à 40°C, l'inhibition de cette voie n'entraîne aucune modulation génique et la vasorelaxation des artères reste inchangée à 40°C. Toutefois, nous avons montré que les HCAEC étaient capables de réguler de manière différentielle leur perméabilité (augmentée à 40°C) et la diapédèse monocytaire (qui reste inchangée) à 40°C.

Toutes ces réponses adaptatives et fonctionnelles sont mises en place par les cellules endothéliales primaires car elles sont capables de percevoir les variations thermiques, possiblement par la présence de TRP présents à leur surface. Néanmoins, des études complémentaires sont à réaliser pour déterminer si ces canaux sont activés en réponse à la température.

Enfin, nous avons montré que de possibles augmentations de température pouvaient avoir lieu au sein des bifurcations, que ce soit *ex vivo* ou *in vivo*. Ces mesures de température restent encore très compliquées à détecter, à analyser et à interpréter, notamment *in vitro* et nécessitent des données supplémentaires pour tenter d'établir un lien entre perturbations de flux et température.

# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

### I. L'augmentation de température active plusieurs voies de signalisation dans les cellules endothéliales coronaires

L'objectif principal de ce travail de thèse était de comprendre comment les variations thermiques auxquelles peuvent être soumises les cellules endothéliales impactent leur biologie. Bien que quelques études aient été menées par le passé, elles ont été réalisées avec des lignées cellulaires et en soumettant les cellules à des températures très élevées. Nous souhaitons comprendre comment des cellules primaires pouvaient réagir à une hyperthermie physiologique. Notre choix s'est porté sur des cellules endothéliales primaires de coronaires humaines (HCAEC). Tout d'abord, nous avons effectué une analyse transcriptomique globale en condition basale et en condition d'hyperthermie modérée. Ceci nous a permis de mettre en évidence des voies de signalisation et des régulateurs géniques que nous avons ensuite validé par des approches cellulaires et moléculaires, puis nous avons vérifié l'implication de ces différents éléments par des tests fonctionnels.

#### I.1. HSF1 et mTORC1 : deux voies de signalisation activées à 40°C et intimement liées

L'analyse transcriptomique globale a permis d'identifier HSF1 comme un régulateur génique possiblement impliqué dans la réponse mise en place par les HCAEC à 40°C. HSF1 fait partie de la famille des *Heat Shock Factors* (HSF), impliqués dans la voie de signalisation HSR (*Heat Shock Response*) et participant à la protection cellulaire contre différents stress, notamment le stress thermique (Åkerfelt, Morimoto and Sistonen, 2010; Dayalan Naidu and Dinkova-Kostova, 2017; Barna, Csermely and Vellai, 2018). Son rôle au sein des cellules endothéliales vasculaires n'ayant encore jamais été étudié, nous l'avons approfondi.

La protéine HSF1 est sujette à diverses modifications post-traductionnelles (phosphorylation, sumoylation ou encore acétylation) qui modulent son activité (Hietakangas *et al.*, 2006; Westerheide *et al.*, 2009; Åkerfelt, Morimoto and Sistonen, 2010). Parmi ces modifications, seule la phosphorylation de la sérine 326 serait impliquée dans son activation à la suite d'un choc thermique, en augmentant son activité transcriptionnelle (Guettouche *et al.*, 2005). Au sein des HCAEC, nous avons montré que la protéine HSF1 était phosphorylée sur cette sérine 326 de façon transitoire après 2h d'incubation à 40°C. Dans la littérature, cette phosphorylation a principalement été étudiée dans des conditions de

températures supra-physiologiques et dans des lignées cancéreuses HeLa où la phosphorylation de HSF1 a été détectée après 30 minutes à 43°C (Chou *et al.*, 2012) ou à 44°C (Guettouche *et al.*, 2005). Nos résultats sont donc similaires aux données publiées, avec un léger décalage dans le temps de la phosphorylation. Cela peut s'expliquer par le fait que le choc thermique que nous avons appliqué aux HCAEC est d'amplitude moins importante que celui qui avait été appliqué aux cellules HeLa. Il serait intéressant d'étudier, par western blot, l'impact de l'amplitude du choc thermique sur la vitesse de phosphorylation de HSF1. Les différences observées dans la cinétique de phosphorylation pourraient également être dues à des réactivités cellulaires distinctes entre HeLa et HCAEC, notamment avec différents types de systèmes senseurs de température. Une étude des autres modifications post-traductionnelles de HSF1 pourrait également être envisagée, notamment la phosphorylation de sa sérine 230, responsable de l'activation de HSF1 en conditions de stress (Holmberg *et al.*, 2001).

Une fois phosphorylée, la protéine HSF1 transloque dans le noyau afin d'y opérer son activité transcriptionnelle (Baler, Dahl and Voellmy, 1993). Plusieurs travaux ont effectivement montré une translocation nucléaire de cette protéine en réponse à différents chocs thermiques dans les cellules HeLa (Sarge, Murphy and Morimoto, 1993; Gan *et al.*, 2010) et dans des fibroblastes (Sarge, Murphy and Morimoto, 1993; Demirovic *et al.*, 2014). Cette translocation a également été mise en évidence en réponse à un traitement au peroxyde d'hydrogène pendant 3h (Kim *et al.*, 2016). Cependant, nous ne sommes pas parvenus à visualiser directement une telle translocation dans le noyau des HCAEC, que ce soit en réponse à un choc thermique de 40°C ou à un traitement au peroxyde d'hydrogène pendant 3h. Étant donné que la phosphorylation de HSF1 est plus tardive dans les HCAEC que dans les cellules décrites dans la littérature, nous pensons que sa translocation pouvait également être décalée dans le temps. À noter aussi que l'expression plus ou moins élevée de HSF1 en condition basale dans le cytosol pourrait expliquer cette difficulté à voir des différences. Pour s'affranchir des problèmes liés aux détections par immunofluorescence, il serait intéressant de réaliser un fractionnement cellulaire des HCAEC suite à leur exposition à 37°C ou à 40°C, en cinétique. Cela permettrait de compléter nos résultats et de quantifier l'expression de HSF1 dans les fractions cytosoliques et nucléaires, par western blot. Demirovic *et al.* ont réalisé ce type d'expérience sur des fibroblastes, montrant une diminution de HSF1 dans le cytosol au profit de sa forme nucléaire après un choc thermique d'une heure à 41°C ou à 43°C (Demirovic *et al.*, 2014). Nous avons néanmoins pu indirectement montrer l'activation et la translocation nucléaire de HSF1 dans les expériences menées avec les cellules Telo-HAEC transfectées avec un plasmide rapporteur comprenant un promoteur riche en séquences HSE en amont du gène codant la luciférase. Les plasmides transfectés étant transcrits depuis le noyau, le fait que nous ayons détecté une augmentation de la production de la luciférase à 40°C est une indication forte que HSF1 a bien transloqué dans le noyau pour activer le promoteur du plasmide rapporteur.



Nos données de phosphorylation ainsi que celle obtenues avec le système rapporteur montrent que le facteur HSF1 est impliqué dans la réponse mise en place par les HCAEC à 40°C et qu'il est responsable de la modulation de plusieurs gènes disposant de promoteurs enrichis en séquences HSE. Pour compléter nos résultats, il aurait été intéressant de transférer les cellules avec un plasmide double négatif (dnHSF1 (Heldens *et al.*, 2010)) ou un siRNA, inhibant l'activité protéique de HSF1, afin d'étudier, en aval, les modulations géniques à 40°C.

Parmi l'ensemble des gènes dont l'expression est augmentée à 40°C, nous avons montré que la majorité d'entre eux fait partie de la famille des *Heat Shock Proteins*, suggérant que ces HSP participent de façon prépondérante à la réponse mise en place par les HCAEC. Ces protéines sont des chaperonnes moléculaires intervenant dans la protection cellulaire contre l'agrégation de protéines mal repliées (Tkáčová and Angelovičová, 2012). Elles jouent donc un rôle primordial pour pallier les mauvais repliements protéiques pouvant être induits par une augmentation de température (Ellis, van der Vies and Hemmingsen, 1989). De plus, en absence de stress, de nombreuses HSP régulent l'activité de plusieurs protéines, notamment celle de HSF1. C'est le cas des HSP70 (Shi, Mosser and Morimoto, 1998) et HSP90 (Ali *et al.*, 1998) qui interagissent avec cette protéine et la maintiennent sous forme inactive. L'activation de HSF1 à 40°C ainsi que l'augmentation de l'expression de toutes ces HSP suggèrent qu'à cette température, une accumulation de protéines mal repliées a lieu au sein du cytosol. Cette accumulation entraînerait une mobilisation des HSP. Elles se dissocieraient ainsi de la protéine HSF1, entraînant son activation et lui permettant de promouvoir la transcription de ses gènes cibles, incluant les HSP. Cette boucle de rétrocontrôle positive ne prendrait fin, en condition hyperthermique maintenue, que lorsque la quantité d'HSP70/90 serait suffisante pour neutraliser de nouveau HSF1 (**Figure 71**).

Au-delà de la protéine HSF1, nous nous sommes également intéressés à mTORC1 dont la voie de signalisation avait été identifiée dans nos analyses bio-informatiques. Nous avons tout d'abord montré une phosphorylation de p70-S6K, effecteur de mTORC1, de manière précoce après 30 minutes à 40°C. Cette phosphorylation avait été rapportée dans de nombreuses études, que ce soit *in vitro*, après 30 minutes à 43°C dans des cellules HeLa (Chou *et al.*, 2012) ou *in vivo*, dans les muscles soléaires et plantaires de rats ayant été exposés pendant 30 minutes à 41°C (Yoshihara *et al.*, 2013). Nos résultats sont donc en accord avec les données de la littérature et démontrent une activation précoce du complexe mTORC1 à 40°C.

La phosphorylation de la sérine 326 de la protéine HSF1 que nous avons mentionné plus haut peut être médiée par mTORC1 (Chou *et al.*, 2012) mais aussi par la MAPK p38 (Dayalan Naidu *et al.*, 2016) ou encore par la MAPK MEK (Tang *et al.*, 2015). L'activation précoce de mTORC1 nous a donc incité à

déterminer si ce complexe pouvait provoquer directement la phosphorylation de HSF1 dans les cellules endothéliales. Pour cela, nous nous sommes servis de la rapamycine qui est un inhibiteur sélectif de mTORC1. Dans nos expériences de western blot, le niveau d'expression de HSF1 était hautement variable ce qui n'a pas permis une exploitation fiable des résultats. Néanmoins, il a été montré qu'un pré-traitement de 2h avec la rapamycine entraîne l'inhibition totale de la phosphorylation de HSF1 dans les cellules HeLa soumises à un choc thermique de 43°C pendant 30 minutes (Chou *et al.*, 2012). Ces données sont à rapprocher de nos résultats même si d'autres expériences sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Pour compléter ces données, il nous semble également important d'inclure l'étude du rôle de MAPK p38 et de MAPK MEK dans la phosphorylation de HSF1 à 40°C.

Pour approfondir nos résultats, nous avons étudié plus directement le rôle du complexe mTORC1 sur la régulation génique des HCAEC placées à 40°C. Après avoir montré que la rapamycine était capable d'inhiber totalement la phosphorylation de la protéine p70-S6K, nous avons montré que l'expression de certains gènes, notamment une partie de ceux placés en aval de HSF1, était modulée par la rapamycine à 40°C. Si mTORC1 n'est pas directement responsable de la phosphorylation de HSF1, il pourrait néanmoins permettre l'activation d'autres facteurs pouvant agir sur l'activité transcriptionnelle de HSF1, à l'instar de ce qu'a démontré une étude récente où mTORC1 entraînait une régulation du *Mediator complex*, impliqué dans la régulation de la transcription (Youn *et al.*, 2019). Le *Mediator complex* est un complexe multiprotéique qui fonctionne comme un coactivateur transcriptionnel, capable de contrôler l'architecture de la chromatine et d'interagir avec plusieurs facteurs de transcription et l'ARN polymérase II. Sa fonction principale est de transmettre les signaux des facteurs de transcription à la polymérase. Ce complexe est d'ailleurs un co-activateur transcriptionnel de HSF1 (Park *et al.*, 2001; Kim and Gross, 2013). Nos résultats sur l'expression des gènes suggèrent donc l'existence d'un lien étroit entre l'activité de mTORC1 et l'activité transcriptionnelle de HSF1.

## I.2. La température déclenche une réponse UPR atypique

Au cours de l'analyse bio-informatique des données de transcriptomique, nous avons également identifié la voie de signalisation UPR et le régulateur génique ERN1. La réponse UPR est déclenchée suite à un stress du réticulum endoplasmique, initié par diverses situations incluant le choc thermique (Zheng *et al.*, 2019). C'est une réponse adaptative pouvant impliquer jusqu'à trois réponses en parallèle, en fonction notamment de l'intensité et de la chronicité du stress : la réponse ERN1, la réponse ATF6 et la réponse PERK (Liu and Kaufman, 2003; Hetz, 2012; Zheng *et al.*, 2019).

ERN1 est une protéine transmembranaire dans le réticulum endoplasmique qui possède à la fois une activité sérine/thréonine kinase et une activité endoribonucléasique (Han *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2014). Au cours d'un stress du réticulum endoplasmique, ERN1 est capable de s'oligomériser et de s'autophosphoryler entraînant ainsi son activation et lui permettant d'exercer son activité ribonucléasique (Zhou *et al.*, 2006). La phosphorylation de la protéine ERN1 peut avoir lieu sur les sérines 724, 726 et 729, lesquelles contrôlent l'acquisition de son activité ribonucléasique (Prischi *et al.*, 2014). En effet, ces phosphorylations entraînent un changement conformationnel de la protéine ERN1 nécessaire à la fixation et à l'épissage du transcrite XBP1. Il est à noter que ERN1 est le seul système enzymatique connu à ce jour pour réaliser cet épissage cytosolique du transcrite XBP1. Ainsi, l'épissage accru du transcrite XBP1 et la quantité majorée de protéine XBP1s correspondante, qui sont observés entre 1h et 3h après élévation de la température à 40°C, indiquent que l'activité ribonucléasique de ERN1 augmente dans les HCAEC en réponse à un stress hyperthermique. Nous avons également montré que cet épissage était directement dépendant de l'activité ribonucléasique de ERN1 par l'utilisation d'un inhibiteur : le B-I09. Nos données recourent plusieurs études montrant une augmentation de l'épissage de XBP1 dépendant de ERN1, au sein de cellules soumises à un stress thermique (30 minutes à 45°C) (Heldens *et al.*, 2011) ou à un stress induit par des agents chimiques (Yoshida *et al.*, 2001; Calfon *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2019). Nous remarquons cependant que l'épissage au sein des HCAEC soumises à 40°C est déclenché plus tardivement que dans les expériences publiées, ce qui peut s'expliquer par les différences expérimentales (amplitude du choc thermique et type de cellules utilisées). En étudiant arbitrairement la phosphorylation de la sérine 724, nous n'avons pas observé de différence significative en réponse à la température, à aucun des temps d'incubation analysés. Ces données sont donc surprenantes au vu de la littérature mais aucune publication ne s'est intéressée à l'effet du stress thermique sur la phosphorylation de ERN1. Il est donc possible que dans nos conditions expérimentales, les deux autres sites de phosphorylation soient davantage impliqués dans l'activation de ERN1. Pour compléter nos résultats, il conviendrait donc d'analyser l'état de phosphorylation des sérines 726 et 729 à 40°C.

De manière surprenante, l'inhibition par le B-I09 ne nous a pas permis de mettre en évidence une modulation génique du panel de référence, y compris les gènes en aval de ERN1. Ces résultats suggèrent donc qu'à 40°C, les HCAEC semblent activer les premières étapes de la voie UPR, à savoir l'épissage du transcrite XBP1 et la synthèse de la protéine XBP1s correspondante. Cependant, nous n'avons pas mis en lumière d'activité transcriptionnelle de cette protéine à 40°C. Les HCAEC ne mettent donc pas en place une réponse ERN1 classique complète (Zheng *et al.*, 2019). A l'instar de nos résultats sur les HCAEC, les travaux de Heldens et al. (Heldens *et al.*, 2011) ont montré qu'une réponse UPR atypique pouvait se produire dans des cellules HEK soumises à un choc thermique supra-

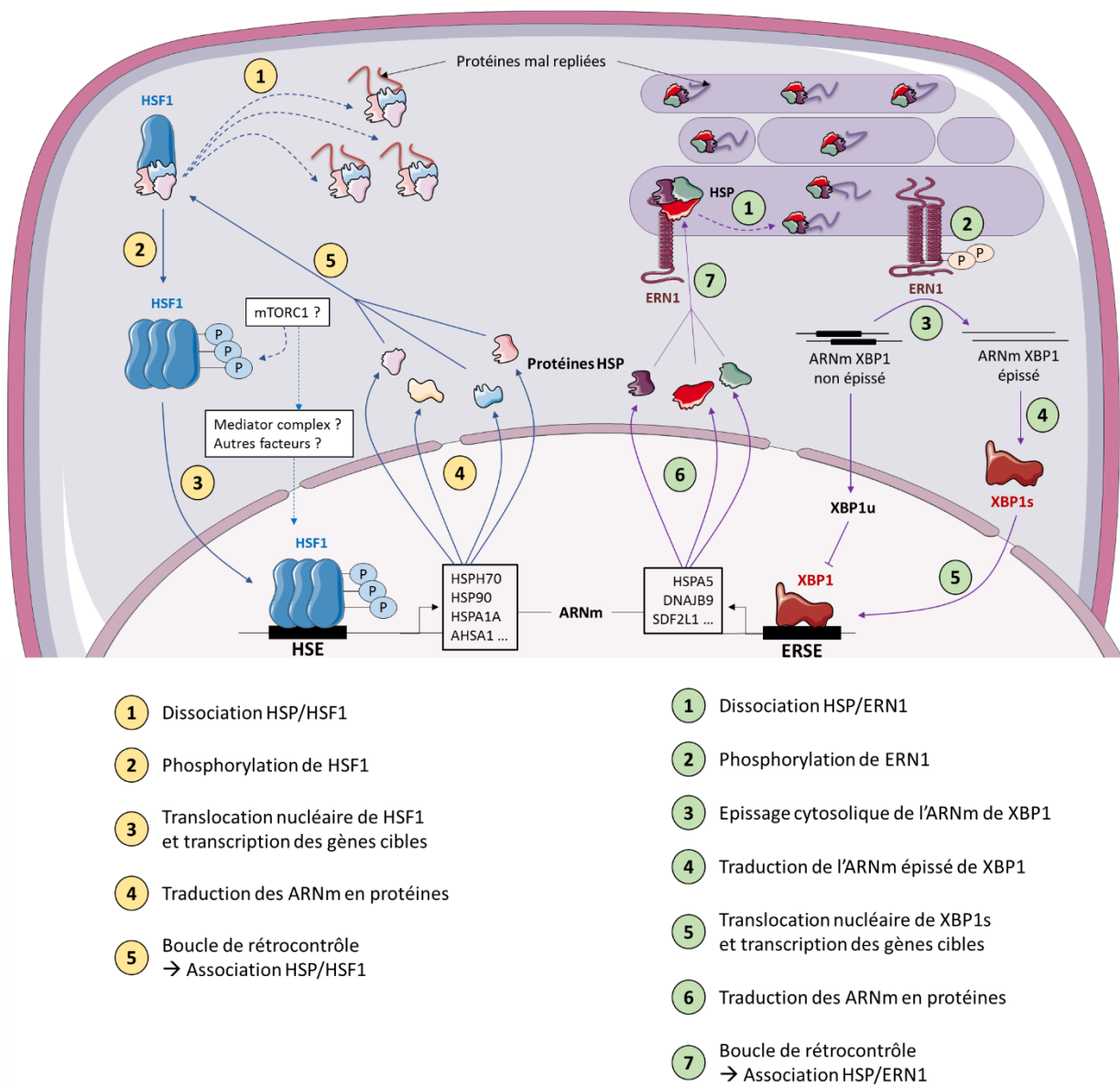
physiologique. Au sein de ces cellules, ces auteurs ont montré que le transcrite XBP1 était induit et épissé mais que la protéine XBP1s produite n'était pas capable d'induire la transcription de ses gènes cibles. C'était notamment le cas des gènes DNAJB9 et HSPA5, pourtant bien induits en réponse à un choc thermique dans leurs expériences. Par ailleurs, ils ont montré que l'activité transcriptionnelle de XBP1s était correctement induite lorsque les cellules étaient soumises à un stress induit par la tunicamycine, confirmant qu'une réponse UPR différente est induite lors d'un choc thermique. Malgré le fait que plusieurs paramètres expérimentaux diffèrent, nos résultats coïncident avec ces données publiées. Pour confirmer l'hypothèse d'une réponse UPR atypique au sein des HCAEC, il faudrait vérifier que la protéine XBP1s est capable d'induire la transcription de ses gènes cibles en cas de stress non thermique (lors d'un traitement à la tunicamycine par exemple). Dans leur article, Heldens et al. ont également montré qu'au sein du promoteur du gène DNAJB9, les régions régulatrices impliquées en réponse à la chaleur et celles de XBP1s étaient différentes. Il serait nécessaire de vérifier cette information au sein des HCAEC puisque si cette hypothèse est confirmée, cela suggère que d'autres facteurs de transcription sont capables de cibler les mêmes promoteurs que XBP1s en cas de stress thermique, masquant ainsi les sites de liaison de XBP1s et expliquant le peu de modulation génique en présence de B-I09. Une détection par immunoprécipitation de la chromatine des gènes cibles permettrait d'identifier, par spectrométrie de masse, les partenaires moléculaires impliqués.

Comme mentionné précédemment, les gènes majoritairement modulés à 40°C font partie de la famille des HSP. Hormis leur interaction avec la protéine HSF1, ces HSP sont également capables de se lier à la protéine ERN1 afin de la maintenir dans un état inactif. C'est le cas de HSPA5 (Miyata, Badolato and Neamati, 2018) et de DNAJB9 (HSP40) (Amin-Wetzel *et al.*, 2017), également impliquées dans le repliement protéique. Le mécanisme d'activation de ERN1 serait donc assez similaire à celui de HSF1, par dissociation des HSP (**Figure 71**).

Au-delà de ERN1, la voie UPR comprend également la réponse ATF6 que nous avons étudiée partiellement au cours de ce projet. ATF6 est une protéine transmembranaire dans le réticulum endoplasmique pouvant participer à la transcription de nombreux gènes, dont certains sont également régulés par XBP1s (Lee, Iwakoshi and Glimcher, 2003). En utilisant un système rapporteur dans les Telo-HAEC, nous avons montré que l'activité de ATF6 était diminuée entre 2h et 24h après une augmentation de la température (**Cf. Annexe II, Figure 72**), suggérant que cette protéine n'est pas impliquée dans la réponse cellulaire. Cependant, il est décrit que lors d'un stress, la quantité de protéine ATF6 est réduite. ATF6 quitte le réticulum endoplasmique pour rejoindre l'appareil de Golgi où elle subit un clivage protéolytique, clivage nécessaire afin qu'elle acquiert son activité transcriptionnelle (Walter and Ron, 2011; Zheng *et al.*, 2019). Cette protéolyse est un mécanisme rapide à se mettre en place, contrairement à la voie faisant intervenir l'épissage de XBP1, qui est un

mécanisme plus lent (que nous avons observé entre 1h et 3h) puisqu'après l'épissage du messager, la protéine XBP1s doit encore être traduite avant de pouvoir exercer son activité transcriptionnelle. Les temps d'analyse dans nos expériences étaient vraisemblablement trop tardifs pour observer l'activité de ATF6 car le clivage protéolytique de ce facteur a sans doute eu lieu dans la première heure suivant l'élévation de la température. Il serait donc nécessaire de reproduire cette expérience à des temps plus précoces et d'envisager de bloquer spécifiquement ce clivage pour déterminer l'implication de ATF6 dans la réponse génique à la température.

La **Figure 71** résume l'ensemble des mécanismes d'adaptation des cellules endothéliales que nous avons pu mettre en évidence.



**FIGURE 71 : SCHÉMA RÉSUMÉ DES DIFFÉRENTES VOIES DE SIGNALISATION MISES EN LUMIÈRE PENDANT CE TRAVAIL DE THÈSE ET DÉCLENCHÉES PAR LES HCAEC À 40°C.**

### I.3. Le flux amplifie l'effet de la température

L'analyse transcriptomique ainsi que l'étude des différentes voies de signalisation ont été réalisées en condition statique. Or, en condition physiologique, les cellules endothéliales sont constamment soumises à un flux sanguin et, par conséquent, à des forces de cisaillement qui peuvent altérer leur fonctionnement biologique. En effet, ces modifications mécaniques régulent plusieurs voies de signalisation comme la voie UPR (Kim and Woo, 2018), et participent au maintien du tonus vasculaire et des différentes fonctions endothéliales (Chatterjee, 2018). Pour percevoir ces variations, les cellules endothéliales possèdent à leur surface de nombreux mécanorécepteurs qui leur permettent de transduire un signal et d'établir une réponse physiologique adaptée en fonction des forces de cisaillement appliquées à leur surface (Chatterjee, 2018; Campinho, Vilfan and Vermot, 2020).

En cultivant les HCAEC en condition de flux, nous avons constaté que les gènes impliqués dans les forces de cisaillement étaient modulés par le flux, en accord avec les données de la littérature (Chien Shu, Li Song and Shyy John Y-J., 1998; Wasserman *et al.*, 2002). Cependant, leurs expressions n'étaient pas modulées par la température, renforçant d'autant plus la spécificité de la réponse endothéliale décrite précédemment. Nous avons donc étudié l'effet d'un flux laminaire artériel sur l'expression des gènes modulés par la température en condition statique. Nos données ont permis de confirmer que les mêmes gènes étaient modulés à 40°C en condition statique et en condition de flux, confirmant ainsi que la réponse endothéliale mise en évidence semble être similaire en condition davantage physiologique. Cependant, les expressions géniques sont exacerbées par le flux à 40°C. C'est notamment le cas des HSP, des gènes impliqués dans les différentes voies de signalisation mais également des gènes essentiels dans le maintien des fonctions endothéliales. Le fait que les HSP soient augmentées suggère que le flux pourrait entraîner une augmentation du nombre de protéines mal repliées à 40°C. Étant donné que les HSP ont un rôle central dans les différentes voies de signalisation décrites précédemment, ces données suggèrent également que le flux pourrait entraîner l'activation de ces différentes voies avec une plus forte amplitude ou de manière plus précoce. Pour confirmer cela, il serait nécessaire d'étudier les étapes clés de chacune des voies en condition de flux laminaire et de les comparer avec celles obtenues en condition statique. Il serait également intéressant de corréler les résultats obtenus *in vitro* à des expériences *in vivo*. L'induction d'une hyperthermie systémique chez la souris permettrait d'étudier, par immunohistochimie ou par analyse transcriptomique, l'activation des différentes voies de signalisation. Enfin, les forces mécaniques pouvant jouer un rôle dans le maintien des fonctions endothéliales, il serait intéressant d'étudier l'impact des forces de cisaillement sur le maintien des fonctions des HCAEC à 40°C.

## I.4. eNOS : une autre voie modulée par la température ?

Au-delà des voies de signalisation mTORC1 et UPR, les analyses transcriptomiques suggéraient également que la voie de signalisation de la NO synthase (eNOS) pouvait être impliquée en réponse à une augmentation de température. Comme l'activation de cette voie se traduit par des réponses fonctionnelles de la cellule endothéliale, liées aux variations intracellulaires de NO, nous avons utilisé plusieurs modèles cellulaires complexes pour évaluer l'effet de la température sur cette voie de signalisation.

La NO synthase génère du monoxyde d'azote (NO), un élément clé dans la régulation du tonus vasculaire. Il permet singulièrement d'induire une dilatation des vaisseaux sanguins et possède des propriétés anti-inflammatoires et antithrombotiques (Michel and Arnal, 1993; Michiels, 2003). Le NO est produit suite à l'activation de la protéine eNOS, induite par sa phosphorylation et dépendante des forces de cisaillement appliquées à la surface endothéliale (Li, Haga and Chien, 2005). Le NO étant très labile et quasi-impossible à mesurer *in vitro*, nous avons mesuré la phosphorylation de l'enzyme eNOS comme index d'activation. Nous avons montré que la phosphorylation de la protéine eNOS augmente de manière concomitante à l'augmentation des forces de cisaillement. Toutefois, étant donné que nos expériences de *microarray* avaient été réalisées en condition statique, nous avons conservé ces conditions dans nos études de l'effet de la température sur la phosphorylation de la protéine eNOS. Aucune différence significative de phosphorylation n'a été observée entre les deux températures. Il serait nécessaire de reproduire ces expériences mais en condition de flux laminaire, à 10 dyn.cm<sup>2</sup>, davantage physiologique même si le fait que l'enzyme soit déjà phosphorylée par le flux complique probablement la tâche pour voir une différence.

Parallèlement à ces expériences, nous avons tenté d'inhiber la voie eNOS avec un inhibiteur spécifique, l'ADMA (Vallance Patrick and Leiper James, 2004; Böger, 2007), afin de déterminer l'effet de cet inhibiteur sur l'expression du panel génique de référence. Seul le gène BDKRB2, codant pour le récepteur B2 de la bradykinine, semble être modulé par l'ADMA. En se fixant à ce récepteur, la bradykinine entraîne l'activation de la voie de la phospholipase C, aboutissant à la formation de NO et induisant une relaxation des vaisseaux sanguins (Bascands and Girolami, 1996; Bascands *et al.*, 2003). Des études ont déjà montré une relaxation endothélium-dépendante en présence de bradykinine (Xuan *et al.*, 2015) mais aucune publication n'a étudié l'effet de la température sur cette vasorelaxation. En collaboration avec l'équipe de pharmacologie de Sanofi, nous avons réalisé une expérience préliminaire sur des artères iliaques de rat soumises à différentes températures. Ces artères ne répondant pas à la bradykinine, nous avons utilisé l'acétylcholine pour générer des vasodilatations. Cependant, aucune différence significative de relaxation n'a été observée entre les

deux températures. À la vue de ces résultats préliminaires et pour des questions de temps, nous n'avons pas exploré plus loin cette piste mais cela nécessiterait d'être revisité sur d'autres types de vaisseaux, par exemple des artères coronaires de porc ou de chien, voire humaines, répondant à la bradykinine.

Lorsque nous avons utilisé des tests fonctionnels de la barrière endothéliale, nous avons pu montrer que la perméabilité endothéliale augmentait de manière concomitante à l'élévation de la température. Ce résultat est cohérent avec les quelques données déjà présentes dans la littérature montrant une augmentation des coefficients de perméabilité endothéliale à l'eau en réponse à une augmentation de température (Garrick, Ryan and Chinard, 1988). Nous avons également montré que l'expression de la VE-cadhérine au niveau membranaire était diminuée à 40°C, suggérant une fragilisation des jonctions cellulaires. Néanmoins, plusieurs autres protéines peuvent intervenir dans les fonctions de perméabilité. Il serait donc intéressant de vérifier l'effet de la température sur l'expression de ces protéines, comme PECAM-1 par exemple.

Une modification de perméabilité peut entraîner une altération des autres fonctions endothéliales, notamment le contrôle de la diapédèse leucocytaire. Nos analyses de *microarray* indiquent que l'expression des ARN messagers de ICAM-1, VCAM-1 et des intégrines, impliquées dans cette diapédèse, n'est pas significativement modifiée en réponse à la température. Malgré le fait que ces protéines de surface n'aient pas été quantifiées, l'expérience réalisée avec les monocytes fluorescents (THP-1 DsRed) montrent que la température n'affecte ni l'adhérence monocyttaire, ni la transmigration des monocytes à travers la monocouche endothéliale. Ces données confirment une régulation différentielle de la perméabilité endothéliale et de la diapédèse leucocytaire. Il reste à compléter ces résultats par l'étude de l'effet de la température sur les autres fonctions de l'endothélium telles que le contrôle de la coagulation ou de l'hémostase.

## **I.5. Température et phénomène d'hormèse**

Pour approfondir nos données, nous pourrions envisager d'étudier les fonctions cellulaires qui pourraient être impactées par la modulation des différentes voies de signalisation (HSF1, mTORC1, UPR et eNOS). À titre d'exemple, l'effet de la température sur l'autophagie pourrait être une piste à explorer, puisque le complexe mTORC1 (Dossou and Basu, 2019) et HSF1 jouent un rôle fondamental dans la régulation de ce mécanisme. En effet, HSF1 interagit avec les séquences HSE des promoteurs des gènes ATG, impliqués dans l'autophagie (Desai *et al.*, 2013) et il régule également l'expression du gène SQSTM1/p62, codant pour une protéine intervenant dans l'étape de nucléation de l'autophagie (Samarasinghe *et al.*, 2014).



Que l'élévation de température ait un impact sur les systèmes de sauvegarde cellulaire est évidemment une piste intéressante. Nous pensons toutefois qu'il faut l'aborder en ayant à l'esprit que les cellules répondent aux stress auxquels on les soumet selon une réponse biphasique qui dépend de l'intensité du stress. A une exposition de faible intensité, la cellule peut répondre favorablement en mettant en place des mécanismes protecteurs. Le même stress, mais d'intensité supérieure, peut entraîner la cellule dans un processus inverse. On parle ici de phénomène d' « hormèse » (Mattson, 2008) et les agents provoquant ce type de mécanisme cellulaire sont qualifiés d'agents hormétiques. La température est typiquement un agent hormétique : une élévation thermique modérée peut entraîner une réponse protectrice mais une élévation thermique importante peut entraîner des processus biologiques très différents, opposés à la réponse protectrice. Dans une étude récente, Kumsta et al. (Kumsta *et al.*, 2017) ont montré que l'autophagie est induite dans plusieurs tissus de *Caenorhabditis elegans* suite à un stress thermique hormétique ou à une surexpression de HSF1. Ils montrent dans la même étude que des gènes liés à l'autophagie sont nécessaires pour la thermorésistance et la longévité des animaux exposés à un choc thermique hormétique ou à une surexpression de HSF1. Cette étude démontre que l'autophagie contribue à la résistance au stress et à l'hormèse, et révèle la nécessité de l'autophagie dans les fonctions régulées par HSF1 en réponse à un choc thermique modéré.

Il découle de ce qui précède que les conditions d'hyperthermie modérée que j'ai appliqué dans mes travaux permettent d'étudier la première phase du phénomène d'hormèse, celle où ce que nous observons correspond à une adaptation protectrice des cellules endothéliales à leur environnement thermique. En revanche, les études menées avec des températures supra-physiologiques de 43°C à 45°C placent vraisemblablement les cellules dans la seconde phase où elles mettent en place des processus possiblement délétères et des réponses non adaptatives.

De façon intéressante et complémentaire, l'unité Inserm (U1148) étudie actuellement la réponse cellulaire après 24h d'exposition à 40°C en se basant sur les 742 gènes dont l'expression était modulée en *microarray* (Cf. **Annexe II, Figure 73A**). Ses premières analyses ont montré que les voies de signalisation UPR et eNOS semblent toujours impliquées dans la réponse cellulaire après 24h (Cf. **Annexe II, Figure 73B**). A ces deux voies s'ajoute la signalisation des sirtuines, une classe de protéines impliquée dans le contrôle de l'inflammation, la résistance au stress ou encore l'efficacité énergétique (Vachharajani *et al.*, 2016). À noter aussi que de nombreux gènes impliqués dans l'apoptose et dans la mort cellulaire émergent des analyses transcriptomiques à 24h, illustrant ainsi que la durée d'exposition à la température a un impact significatif sur la survie des cellules. A l'inverse, l'activation des voies de signalisation HSF1 et mTORC1 que nous avons mis en évidence aux temps précoces n'est plus représentée dans l'analyse IPA à 24h (Cf. **Annexe II, Figure 73C**).

## II. Limitations

### II.1. Conditions de culture

L'utilisation de cellules endothéliales primaires nous a permis de maintenir des caractéristiques cellulaires spécifiques et de nous rapprocher davantage de conditions physiologiques. Les HCAEC sont des cellules fragiles avec une viabilité réduite et un temps de doublement relativement long. Les contraintes imposées par ce type cellulaire nous ont donc obligé à nous adapter à des quantités de cellules, de protéines et d'ARN faibles et à réduire considérablement le nombre d'expériences pouvant être réalisées en parallèle.

Ce projet étant exploratoire et la réponse endothéliale à la température n'ayant jamais été étudiée auparavant, nous n'avions aucune idée de la spécificité de cette réponse. C'est pourquoi, afin d'éviter tout biais pouvant être induits par des cellules endothéliales différentes, nous avons choisi d'utiliser uniquement les HCAEC. Seules quelques expériences ont été réalisées avec des cellules endothéliales immortalisées (Telo-HAEC), après de nombreuses comparaisons d'expression génique avec les cellules primaires.

*In vivo*, ces cellules sont constamment soumises à un flux sanguin où des forces de cisaillement sont appliquées à leur surface. Afin de nous rapprocher le plus possible d'un environnement physiologique pour les HCAEC, certaines expériences ont donc été réalisées en condition de flux. Le système de culture en flux utilisé nous a permis de régler précisément les valeurs des forces de cisaillement que nous souhaitons appliquer à la surface endothéliale. Lors de nos expériences, 10 dyn.cm<sup>2</sup> ont été appliqués, correspondant à la valeur retrouvée communément au sein des artères (Resnick *et al.*, 2003) et utilisée dans de nombreuses études (Topper and Gimbrone, 1999; Cicha *et al.*, 2008, 2009; Urschel *et al.*, 2010). Un des autres avantages de ce système est de pouvoir perfuser des cellules ou des molécules à la surface des tapis endothéliaux comme nous l'avons fait dans nos expériences avec la mise en circulation des THP-1 DsRed ou avec le traitement à l'IL1 $\beta$ .

Malgré les nombreux avantages que confère ce système, des difficultés ont tout de même été rencontrées, principalement d'ordre technique. Lorsque l'on cultive les HCAEC en flux, une faible quantité de cellules est disponible au sein de chaque canal. La faible quantité de matériel biologique récupérée (ARN et protéines) est donc utilisée en quasi-totalité et est bien souvent insuffisante pour réaliser les expériences dans des conditions optimales. De plus, ce système requiert l'utilisation d'une unité fluidique par condition, limitant grandement le nombre de conditions pouvant être testées de front et rendant impossible les analyses cinétiques. Toutes ces contraintes, combinées à celle de l'utilisation des HCAEC, sont les raisons pour lesquelles nous n'avons pas pu effectuer toutes les

expériences souhaitées en condition de flux.

## II.2. Mesure de la température à l'échelle tissulaire et cellulaire

Un des objectifs de mon travail de thèse était d'évaluer si des modifications de forces de cisaillement, induites notamment au sein des vaisseaux à géométrie complexe, pouvaient induire une modulation locale de la température.

Comme première approche, nous nous sommes placés dans des conditions *ex vivo*, en utilisant des bifurcations faites à façon ou commercialisées. Nos données ont montré une augmentation locale de la température au sein des bifurcations, en comparaison avec les zones laminaires. Ces données ont été acquises en simplifiant à l'extrême le système vasculaire puisqu'elles ont été réalisées avec une solution aqueuse, dans un « vaisseau » rigide, sans pression pulsée. Nos premiers résultats rejoignent ceux de plusieurs études où il a été rapporté qu'une perturbation hémodynamique peut augmenter le transfert thermique entre le sang et la paroi vasculaire (Wei and Luo, 2003; Attia *et al.*, 2012), moduler localement la dissipation de la chaleur (Diamantopoulos *et al.*, 2003; Stefanadis *et al.*, 2003) et entraîner une modulation locale de la température (Diamantopoulos *et al.*, 2003). Pour se rapprocher des conditions physiologiques et affiner nos résultats, il serait nécessaire de reproduire ces expériences avec du sang ou avec une solution ayant des propriétés similaires. En effet, il a été montré que les forces de frictions générées par les éléments figurés du sang peuvent entraîner une modulation thermique des vaisseaux (Amiri and Khonsari, 2010). La viscosité du sang doit également jouer un rôle non négligeable dans cette modulation thermique.

Nos données pourraient également être complétées par une technique de mesure de température plus précise que la caméra thermique : l'imagerie par résonance magnétique. Des séquences d'acquisition sont actuellement mises au point par l'unité Inserm (U1148). Ses premiers résultats *ex vivo* ont montré une distribution hétérogène de la température au sein du vaisseau, caractérisée par la présence de points chauds au niveau de la bifurcation. Ces mêmes séquences d'acquisition IRM ont été utilisées *in vivo* chez la souris, et les premières données semblent montrer une augmentation locale de la température autour du sinus carotidien, où se développe couramment l'athérosclérose. De nombreuses mises au point sont encore nécessaires pour s'assurer de la fiabilité des données générées et des performances de cette technique pour mesurer précisément la température des tissus vasculaires *in vivo*. Il n'en reste pas moins que ces résultats sont très encourageants et pourraient modifier considérablement notre compréhension de l'homéostasie de la température au sein des organes/tissus sains et malades.

Dans une approche complémentaire, nous nous sommes placés dans des conditions *in vitro* pour déterminer, à l'aide d'une sonde thermique, la température des HCAEC au sein d'un canal comprenant une bifurcation. Malheureusement, l'incorporation de cette sonde au sein des HCAEC a été très compliquée à mettre au point. Le fait de devoir utiliser la sonde avec des solutions de glucose ou de KCl a grandement fragilisé les cellules (HCAEC comme Telo-HAEC), réduisant leur viabilité et ne permettant pas toujours de terminer les expériences dans des conditions optimales de culture. La substitution de ces solutions par du milieu de culture complet n'étaient pas davantage favorable puisque cela empêchait l'incorporation de la sonde thermique au niveau du cytosol.

De plus, malgré l'utilisation d'équipements très sensibles, il a été difficile de détecter une fluorescence homogène et reproductible sur l'ensemble du tapis cellulaire, rendant compliquée l'interprétation des résultats. Lorsque certaines cellules réussissaient à incorporer correctement la sonde, l'amplitude de l'intensité de fluorescence obtenue en réponse à une gamme de température était très faible et permettait rarement de distinguer une variation thermique de l'ordre de 1°C. Cette sonde est pourtant décrite comme ayant une forte résolution, pouvant détecter des variations thermiques de l'ordre de 0,01°C (Uchiyama *et al.*, 2015), et ce, sur une gamme de température s'échelonnant de 25 à 45°C.

Enfin, de nombreuses difficultés ont également été rencontrées en condition de flux. Par exemple, l'incorporation de la sonde, pourtant réalisée en condition statique, n'était plus observable en condition de flux. Les cellules étaient davantage fragilisées et se décollaient constamment des canaux laminaires. La gamme de température appliquée sur les rares cellules restantes ne permettait pas d'obtenir une augmentation du ratio de fluorescence. Cette sonde thermique n'a donc pas pu être utilisée en flux malgré l'ensemble des mises au point effectuées.

Il existe néanmoins d'autres sondes thermiques (Okabe *et al.*, 2018) qu'il serait intéressant de tester. Certaines sont sans doute moins toxiques, et d'autres spécifiques d'un seul type d'organelle, permettant donc de réaliser des mesures de températures à l'échelle subcellulaire. Cependant, il faudra s'assurer de leur fonctionnement en condition de flux.

### **II.3. HSP et CIRBP utilisés comme alternatives aux sondes thermiques**

Pour pallier ces problèmes de sonde thermique, nous nous sommes intéressés à l'expression de différentes protéines par les HCAEC cultivées dans des canaux comprenant une bifurcation : HSPA1A, dont l'expression augmente avec la température et CIRBP, dont l'expression diminue avec la température. Nous avons montré que l'expression de HSPA1A diminuait localement au sein des zones

de flux perturbé, en comparaison avec les zones de flux laminaire. A l'inverse, nous avons montré que l'expression de CIRPB augmentait. Cela va à l'encontre des résultats obtenus *ex vivo* mais peut s'expliquer par la structure des canaux utilisés. En effet, les canaux Ibidi® sont conçus de telle sorte que la section du canal laminaire principal est la même que la section de chacun des deux canaux après la bifurcation. Elle n'est pas divisée en deux, ne créant pas de « pression » supplémentaire au niveau de la bifurcation. Nous n'étions donc pas à même de détecter la moindre augmentation de température avec ces canaux. Cependant, leur design favorise la diminution de la vitesse du flux et donc possiblement la diminution de la température, ce qui serait parfaitement compatible avec la diminution de HSPA1A et l'augmentation de CIRBP que nous avons observé.

Afin d'éviter les problèmes liés à la configuration des canaux, nous avons effectué des expériences *in vivo* chez la souris. Nous avons placé un manchon constrictif sur une des carotides de la souris afin de créer des perturbations hémodynamiques en aval de ce manchon. Une analyse à l'échelle des segments artériels a montré une diminution de l'expression de CIRBP ainsi qu'une augmentation de celle des HSP, en comparaison avec les expressions de la carotide contrôle, suggérant une augmentation locale de la température. Néanmoins, malgré le fait que ces résultats corrélerent avec nos données obtenus *ex vivo*, il faut garder à l'esprit que les variations d'expression obtenues dans ces expériences *in vivo* ne sont pas spécifiques des cellules endothéliales. Elles peuvent être liées aux expressions des cellules musculaires lisses ou des fibroblastes également présents dans la paroi vasculaire analysée. Il est également possible que les mécanorécepteurs mobilisent les mêmes effecteurs moléculaires que la température.

## III. Perspectives

### III.1. Modifications épigénétiques des HCAEC

Comme discuté précédemment, la durée d'exposition à une hyperthermie, même modérée, a un impact sur la réponse cellulaire. Au-delà de la durée d'exposition à 40°C, il serait également intéressant de déterminer si les cellules endothéliales ont la capacité de stocker en mémoire les événements hyperthermiques qu'elles subissent, et ce en jouant sur la fréquence d'exposition. Par exemple, il serait envisageable de soumettre les HCAEC pendant 6h à 40°C, de les replacer à 37°C pendant 24h avant une nouvelle exposition à 40°C pendant 6h. Cela nous permettrait d'évaluer si, après plusieurs expositions à 40°C, la réponse cellulaire mise en place par les HCAEC est exactement la même ou si certains paramètres varient, notamment le temps nécessaire à déclencher chaque étape de la signalisation. Cela ouvrirait des perspectives d'analyse des modifications épigénétiques induites par la température.

À cet égard, les analyses des résultats de *microarray* ont révélé une modulation transcriptionnelle de plusieurs gènes codant pour des histones. Ils sont modulés à 6h et plus fortement après 12h et 24h à 40°C (Cf. **Annexe II, Tableau 30**). Les histones sont des protéines s'associant à l'ADN afin de former la structure de base de la chromatine. Elles jouent donc un rôle important dans sa condensation et dans sa décondensation, en ouvrant ou en fermant des loci, les rendant respectivement transcriptionnellement actifs ou inactifs (Hammond *et al.*, 2017). C'est sans doute parce que les histones sont ubiquitaires et interviennent dans plusieurs voies de signalisation que le logiciel IPA ne les a pas identifiées formellement malgré le fait qu'elles soient fortement modulées par la température. Néanmoins, la modulation de leur expression permet de formuler de nouvelles hypothèses.

Tout d'abord, cette modulation peut signifier que les cellules endothéliales s'appêtent à dupliquer leur ADN à 40°C. Or, en comparant la prolifération des HCAEC à 37°C et à 40°C, aucune différence significative n'a été mise en évidence (Cf. **Annexe II, Figure 74**), suggérant que la modulation transcriptionnelle des histones n'est pas liée à une augmentation de la prolifération cellulaire.

À l'instar de ce que font les HSP avec les protéines, la liaison des histones à l'ADN pourrait constituer un mécanisme de protection du matériel génétique. Cette hypothèse n'a encore jamais été explorée mais que le stress thermique puisse avoir un impact sur la condensation de la chromatine nous semble être une piste à explorer.

Enfin, nous avons vu que les facteurs de transcription HSF1 et XBP1 étaient les principaux régulateurs de la transcription au sein des voies de signalisation activées par la température dans nos cellules. Cependant, l'adaptation au stress thermique pourrait également être un système de régulation multicouche comprenant non seulement des facteurs de transcription, mais aussi des régulateurs épigénétiques. Cela pourrait impliquer les histones et leurs modifications post-traductionnelles, qui fonctionneraient comme une forme de mémoire au stress thermique. Il existe en fait plusieurs indices dans la littérature montrant que la température peut imprimer des modifications épigénétiques. Par exemple, une étude menée sur les plantes a récemment montré qu'après un choc thermique, la méthylation de l'histone H3 sur sa lysine 4 (H3K4) est liée à l'expression soutenue des gènes inductibles par le choc thermique (Ohama *et al.*, 2017). Cette étude a également montré l'hyper-induction de ces gènes lors de l'application répétée du choc thermique. Un autre exemple de modification épigénétique thermo-dépendante est celui de la détermination du sexe gonadique chez certaines tortues. En effet, il a été montré que la protéine Forkhead L2 (FoxL2) et le facteur de transcription Dmrt1 sont impliqués dans la transduction du signal de température ambiante en un signal biologique qui détermine par la suite le sexe gonadique chez certaines espèces de tortue (Matsumoto and Crews, 2012). Des

mécanismes épigénétiques thermo-dépendants semblent être également impliqués dans le déterminisme gonadique de l'alligator (Yatsu *et al.*, 2016) et de certains poissons (Navarro-Martín *et al.*, 2011). Ainsi donc, l'augmentation du niveau d'expression des histones que nous avons mis en évidence à 40°C doit nous inciter à regarder également si elles subissent des modifications post-traductionnelles tant il semble évident que les signaux thermiques convergent vers cette famille de protéines qui pourrait inscrire une mémoire persistante dans le transcriptome des cellules endothéliales suite à un stress hyperthermique.

### III.2. Spécificité de la réponse thermique des cellules endothéliales

Lorsque la température du sang augmente, les cellules endothéliales font partie des premières cellules capables de percevoir les variations thermiques. Au cours de ce projet, nous avons étudié la réponse cellulaire mise en place par les HCAEC à 40°C et nous avons montré qu'elle mettait en jeu plusieurs voies de signalisation ainsi que différents régulateurs géniques. Or, nous avons vu que les perturbations hémodynamiques retrouvées au sein des vaisseaux sanguins étaient capables d'augmenter le transfert thermique entre le sang et la paroi vasculaire (Wei and Luo, 2003; Attia *et al.*, 2012), suggérant que les cellules de la paroi – notamment les cellules musculaires lisses et les fibroblastes – pourraient également être capables de ressentir les variations thermiques. Il est donc légitime de se questionner sur le degré de spécificité de la réponse étudiée.

Pour commencer à répondre à cette question, nous avons réalisé une expérience préliminaire nous permettant d'identifier les différences d'expression génique entre les HCAEC et des CML issues d'artères coronaires humaines, sur un panel de 91 gènes (Cf. **Annexe I, Tableau 19**). Au sein de ce panel, nous avons observé que 29% des gènes sont sur-exprimés à 40°C dans les CML dont quasiment tous sont également sur-exprimés dans les HCAEC (Cf. **Annexe II, Figure 75A**). À l'inverse, 24% des gènes sont sous-exprimés à 40°C dans les CML dont 77% sont en commun avec les gènes sous-exprimés dans les HCAEC (Cf. **Annexe II, Figure 75B**). De plus, nous avons constaté que les HSP et CIRBP font partie respectivement des gènes les plus exprimés et réprimés à 40°C par les CML. Ces données, encore préliminaires, révèlent de nombreuses similitudes d'expression génique entre les deux types cellulaires mais mettent aussi en lumière que la modulation de certains gènes est spécifique aux CML ou aux HCAEC. Ces expériences nécessitent d'être étendues afin de déterminer s'il existe une signature de réponse thermique spécifique à chaque type de cellule vasculaire. Il faut noter ici qu'il a été rapporté que l'activation de HSF1 n'est pas la même selon les espèces (Tomanek and Somero, 2002), entre les différents types cellulaires et entre les différents organes ou tissus (Sarge, 1998; Gothard *et*

*al.*, 2003). Étant donné qu'il existe une multitude de type de cellules endothéliales, spécifiques des organes ou des vaisseaux sanguins dans lesquels elles sont présentes (Ait-Oufella *et al.*, 2008), toutes les étapes de la signalisation devraient être étudiées en parallèle sur différents types cellulaires afin d'établir ce qui est propre aux cellules vasculaires, ce qui est propre aux cellules endothéliales, ce qui est propre aux cellules endothéliales coronaires et déterminer ce qu'elles ont en commun avec d'autres types cellulaires dans leur réponse à l'hyperthermie.

### III.3. Perception de la température par les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont capables de détecter et de réagir de diverses façons face à des variations thermiques. Tout d'abord, elles sont capables de changer leur métabolisme (Reynolds and Casterlin, 1980; Schulte, 2011), pouvant entraîner une modification de leur activité enzymatique mais également une modification de la dynamique intracellulaire, notamment en termes de mobilité moléculaire et de vitesse des réactions biochimiques.

Ce que nous montrons dans ce travail de thèse, c'est qu'en réponse à un changement thermique, les cellules endothéliales sont également capables de mobiliser des senseurs intracellulaires leur permettant de percevoir les repliements inappropriés des protéines, aussi bien dans le compartiment cytosolique (avec le facteur de transcription HSF1) que dans le compartiment du réticulum endoplasmique (avec la voie UPR). Cette mobilisation peut d'ailleurs être une des conséquences des changements métaboliques qui s'opèrent à la suite d'un stress thermique, conduisant à des altérations, notamment de la glycosylation.

Enfin, en réponse à des variations thermiques, les cellules endothéliales sont également capables d'activer des récepteurs thermiques de surface : les TRP (Sullivan and Earley, 2013). Nous avons montré que les TRP les plus exprimés par les HCAEC sont ceux de la famille des vanilloïdes, sélectifs pour le  $Ca^{2+}$  (notamment TRPV1, TRPV2 et TRPV4) et ceux de la famille des mélastatines (notamment TRPM3). TRPV1 peut être activé à partir de 42°C, TRPV2 à partir de 52°C, TRPV4 à partir de 27°C et TRPM3 à partir de 40°C (Patapoutian *et al.*, 2003). Dans nos expériences, nous n'avons observé aucune différence significative d'expression des TRP entre 37°C et 40°C. Cela est en accord avec le fait qu'aucun TRP n'a été identifié lors de nos analyses de *microarray*. Toutefois, l'activation des TRP ne requiert pas de régulation transcriptionnelle. L'analyse de l'effet de la température sur l'influx calcique des HCAEC en présence d'agonistes et d'antagonistes spécifiques de chaque TRP serait à cet égard plus pertinent.



Il est important de noter que certains thermo-TRP sont également des mécanorécepteurs (Pedersen, Owsianik and Nilius, 2005; Köhler and Hoyer, 2007; Zhang and Gutterman, 2011). Cela rend leur analyse et la compréhension de leur fonctionnement difficiles étant donné qu'un même TRP pourrait être capable de détecter à la fois une variation thermique et une variation mécanique. Le stress thermique et le stress mécanique convergent donc vers les mêmes systèmes moléculaires pour informer la cellule. Il découle de cela qu'il est complexe de découpler les deux fonctions dans notre contexte où nous soupçonnons que les variations hémodynamiques sont à l'origine des variations thermiques.

## IV. Conclusion générale

L'ensemble de ces travaux de thèse a donc permis de mettre en évidence que la biologie de l'endothélium est profondément impactée par l'augmentation de température. En effet, grâce aux nombreux récepteurs qu'elles possèdent à leur surface, les cellules endothéliales vasculaires sont capables de percevoir les variations thermiques et de mettre en place des mécanismes adaptés. Elles vont notamment déclencher trois voies de signalisation majeures, entraînant une modification considérable de leur transcriptome. Cela se traduit en particulier par une augmentation de l'expression de nombreuses protéines chaperonnes afin de pallier les défauts de repliement protéique, causés par l'hyperthermie. Nous avons également constaté que la perméabilité endothéliale, normalement indispensable pour éviter l'infiltration des cellules sanguines et immunitaires, est altérée face à ces variations thermiques. L'augmentation de température modifie donc de manière considérable le comportement de l'endothélium. La température pouvant augmenter de manière importante lorsque la fièvre est déclenchée à l'échelle de l'organisme ou lorsqu'une thermogenèse locale accompagne une réponse inflammatoire, ces adaptations mises en place par l'endothélium ouvre des perspectives importantes sur le rôle de la température dans les pathologies vasculaires.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Ait-Oufella, H. *et al.* (2008) 'L'endothélium : un nouvel organe', </data/revues/16240693/00170002/07002794/>. Available at: <https://www.em-consulte.com/en/article/119818> (Accessed: 5 May 2020).
- Åkerfelt, M., Morimoto, R. I. and Sistonen, L. (2010) 'Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(8), pp. 545–555. doi: 10.1038/nrm2938.
- Ali, A. *et al.* (1998) 'HSP90 Interacts with and Regulates the Activity of Heat Shock Factor 1 in *Xenopus* Oocytes', *Molecular and Cellular Biology*, 18(9), pp. 4949–4960.
- Amin-Wetzel, N. *et al.* (2017) 'A J-Protein Co-chaperone Recruits BiP to Monomerize IRE1 and Repress the Unfolded Protein Response', *Cell*, 171(7), pp. 1625–1637.e13. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.040.
- Amiri, M. and Khonsari, M. M. (2010) 'On the Thermodynamics of Friction and Wear—A Review', *Entropy*, 12(5), pp. 1021–1049. doi: 10.3390/e12051021.
- Anderson, J. M. and Van Itallie, C. M. (1995) 'Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 269(4), pp. G467–G475. doi: 10.1152/ajpgi.1995.269.4.G467.
- Arens, E. and Zhang, H. (2006) '16 - The skin's role in human thermoregulation and comfort', in Pan, N. and Gibson, P. (eds) *Thermal and Moisture Transport in Fibrous Materials*. Woodhead Publishing (Woodhead Publishing Series in Textiles), pp. 560–602. doi: 10.1533/9781845692261.3.560.
- Attia, J. A. *et al.* (2012) 'Convective heat transfer in foams under laminar flow in pipes and tube bundles', *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 55(25–26), pp. 7823–7831. doi: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2012.08.005.
- 'Aulus Cornelius Celsus' (2020) *Wikipedia*. Available at: [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Aulus\\_Cornelius\\_Celsus&oldid=973447002](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Aulus_Cornelius_Celsus&oldid=973447002) (Accessed: 31 August 2020).
- Baler, R., Dahl, G. and Voellmy, R. (1993) 'Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1', *Molecular and Cellular Biology*, 13(4), pp. 2486–2496. doi: 10.1128/mcb.13.4.2486.
- Ballermann, B. J. *et al.* (1998) 'Shear stress and the endothelium', *Kidney International. Supplement*, 67, pp. S100–108. doi: 10.1046/j.1523-1755.1998.06720.x.
- Bandell, M., Macpherson, L. J. and Patapoutian, A. (2007) 'From chills to chilis: Mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs', *Current opinion in neurobiology*, 17(4), pp. 490–497. doi: 10.1016/j.conb.2007.07.014.
- Barna, J., Csermely, P. and Vellai, T. (2018) 'Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 75(16), pp. 2897–2916. doi: 10.1007/s00018-018-2836-6.

- Bascands, J. L. and Girolami, J. P. (1996) 'La bradykinine', *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN : 0767-0974]*, 1996, Vol. 12, N° 5; p.582-92. doi: 10.4267/10608/787.
- Bascands, J.-L. *et al.* (2003) 'Les récepteurs de la bradykinine : de nouveaux rôles physiopathologiques', *M/S. Médecine sciences [ISSN papier : 0767-0974 ; ISSN numérique : 1958-5381]*, 2003, Vol. 19, N° 11; p. 1093-1100. doi: 10.1051/medsci/200319111093.
- Bennett, A. F. (1991) 'The evolution of activity capacity', *The Journal of Experimental Biology*, 160, pp. 1–23.
- Bennett, A. F. and Ruben, J. A. (1979) 'Endothermy and activity in vertebrates', *Science (New York, N.Y.)*, 206(4419), pp. 649–654. doi: 10.1126/science.493968.
- Böger, R. H. (2007) 'The Pharmacodynamics of L-Arginine', *The Journal of Nutrition*, 137(6), pp. 1650S-1655S. doi: 10.1093/jn/137.6.1650S.
- Boo, Y. C. *et al.* (2002) 'Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(5), pp. 3388–3396. doi: 10.1074/jbc.M108789200.
- Brengelmann, G. L. *et al.* (1981) 'Absence of active cutaneous vasodilation associated with congenital absence of sweat glands in humans', *The American Journal of Physiology*, 240(4), pp. H571-575. doi: 10.1152/ajpheart.1981.240.4.H571.
- Brown, D. J. A. *et al.* (2012) 'Accidental Hypothermia', *New England Journal of Medicine*, 367(20), pp. 1930–1938. doi: 10.1056/NEJMra1114208.
- Buckley, L. B., Hurlbert, A. H. and Jetz, W. (2012) 'Broad-scale ecological implications of ectothermy and endothermy in changing environments', *Global Ecology and Biogeography*, 21(9), pp. 873–885. doi: 10.1111/j.1466-8238.2011.00737.x.
- Bullard, D. C. *et al.* (1996) 'Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice', *The Journal of Experimental Medicine*, 183(5), pp. 2329–2336. doi: 10.1084/jem.183.5.2329.
- Calfon, M. *et al.* (2002) 'IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA', *Nature*, 415(6867), pp. 92–96. doi: 10.1038/415092a.
- Campinho, P., Vilfan, A. and Vermot, J. (2020) 'Blood Flow Forces in Shaping the Vascular System: A Focus on Endothelial Cell Behavior', *Frontiers in Physiology*, 11. doi: 10.3389/fphys.2020.00552.
- Casscells, W. *et al.* (1996) 'Thermal detection of cellular infiltrates in living atherosclerotic plaques: possible implications for plaque rupture and thrombosis', *Lancet (London, England)*, 347(9013), pp. 1447–1451. doi: 10.1016/s0140-6736(96)91684-0.
- Chandrasoma and Chandrasoma (2013) *Concise Pathology 3/e EB*. McGraw-Hill Medical. doi: 10.1036/9780071833554.
- Charkoudian, N. (2003) 'Skin Blood Flow in Adult Human Thermoregulation: How It Works, When It Does Not, and Why', *Mayo Clinic Proceedings*, 78(5), pp. 603–612. doi: 10.4065/78.5.603.
- Chatterjee, S. (2018) 'Endothelial Mechanotransduction, Redox Signaling and the Regulation of Vascular Inflammatory Pathways', *Frontiers in Physiology*, 9. doi: 10.3389/fphys.2018.00524.

- Chien Shu, Li Song and Shyy John Y-J. (1998) 'Effects of Mechanical Forces on Signal Transduction and Gene Expression in Endothelial Cells', *Hypertension*, 31(1), pp. 162–169. doi: 10.1161/01.HYP.31.1.162.
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N. and Bobryshev, Y. V. (2017) 'Effects of shear stress on endothelial cells: go with the flow', *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 219(2), pp. 382–408. doi: 10.1111/apha.12725.
- Chou, S.-D. *et al.* (2012) 'mTOR is essential for the proteotoxic stress response, HSF1 activation and heat shock protein synthesis', *PLoS One*, 7(6), p. e39679. doi: 10.1371/journal.pone.0039679.
- Cicha, I. *et al.* (2008) 'Pharmacological inhibition of RhoA signaling prevents connective tissue growth factor induction in endothelial cells exposed to non-uniform shear stress', *Atherosclerosis*, 196(1), pp. 136–145. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.03.016.
- Cicha, I. *et al.* (2009) 'Shear stress preconditioning modulates endothelial susceptibility to circulating TNF-alpha and monocytic cell recruitment in a simplified model of arterial bifurcations', *Atherosclerosis*, 207(1), pp. 93–102. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.04.034.
- Clapham, D. E. (2003) 'TRP channels as cellular sensors', *Nature*, 426(6966), pp. 517–524. doi: 10.1038/nature02196.
- Clavijo-Baque, S. and Bozinovic, F. (2012) 'Testing the fitness consequences of the thermoregulatory and parental care models for the origin of endothermy', *PLoS One*, 7(5), p. e37069. doi: 10.1371/journal.pone.0037069.
- Cossins, A. (1987) *Temperature Biology of Animals*. Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-94-009-3127-5.
- Cossins, A. R. (1977) 'Adaptation of biological membranes to temperature. The effect of temperature acclimation of goldfish upon the viscosity of synaptosomal membranes', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 470(3), pp. 395–411. doi: 10.1016/0005-2736(77)90131-6.
- Cossins, A. R. and Prosser, C. L. (1978) 'Evolutionary adaptation of membranes to temperature', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(4), pp. 2040–2043. doi: 10.1073/pnas.75.4.2040.
- Crawshaw, L. I. (1979) 'Responses to Rapid Temperature Change in Vertebrate Ectotherms', *Integrative and Comparative Biology*, 19(1), pp. 225–237. doi: 10.1093/icb/19.1.225.
- Danzl, D. F. and Pozos, R. S. (2010) *Accidental Hypothermia*, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199412293312607>. Massachusetts Medical Society. doi: 10.1056/NEJM199412293312607.
- Davies, P. F. (1995) 'Flow-Mediated Endothelial Mechanotransduction', *Physiological reviews*, 75(3), pp. 519–560.
- Davignon Jean and Ganz Peter (2004) 'Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis', *Circulation*, 109(23\_suppl\_1), p. III–27. doi: 10.1161/01.CIR.0000131515.03336.f8.
- Dayalan Naidu, S. *et al.* (2016) 'Heat Shock Factor 1 Is a Substrate for p38 Mitogen-Activated Protein Kinases', *Molecular and Cellular Biology*, 36(18), pp. 2403–2417. doi: 10.1128/MCB.00292-16.
- Dayalan Naidu, S. and Dinkova-Kostova, A. T. (2017) 'Regulation of the mammalian heat shock factor 1', *The FEBS journal*, 284(11), pp. 1606–1627. doi: 10.1111/febs.13999.

- Degroot, D. W. and Kenney, W. L. (2007) 'Impaired defense of core temperature in aged humans during mild cold stress', *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 292(1), pp. R103-108. doi: 10.1152/ajpregu.00074.2006.
- Dejana, E. (1996) 'Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis', *The Journal of Clinical Investigation*, 98(9), pp. 1949–1953. doi: 10.1172/JCI118997.
- Demirovic, D. *et al.* (2014) 'Differential translocation of heat shock factor-1 after mild and severe stress to human skin fibroblasts undergoing aging in vitro', *Journal of Cell Communication and Signaling*, 8(4), pp. 333–339. doi: 10.1007/s12079-014-0244-8.
- Desai, S. *et al.* (2013) 'Heat Shock Factor 1 (HSF1) Controls Chemoresistance and Autophagy through Transcriptional Regulation of Autophagy-related Protein 7 (ATG7)', *The Journal of Biological Chemistry*, 288(13), pp. 9165–9176. doi: 10.1074/jbc.M112.422071.
- Di Lorenzo, A. *et al.* (2013) 'eNOS-derived nitric oxide regulates endothelial barrier function through VE-cadherin and Rho GTPases', *Journal of Cell Science*, 126(24), pp. 5541–5552. doi: 10.1242/jcs.115972.
- Diamantopoulos, L. *et al.* (2003) 'The effect of reduced blood-flow on the coronary wall temperature. Are significant lesions suitable for intravascular thermography?', *European Heart Journal*, 24(19), pp. 1788–1795. doi: 10.1016/s0195-668x(03)00440-8.
- Dimmeler, S. *et al.* (1998) 'Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis', *Circulation Research*, 83(3), pp. 334–341. doi: 10.1161/01.res.83.3.334.
- Dokladny, K. *et al.* (2013) 'Regulatory Coordination between Two Major Intracellular Homeostatic Systems', *The Journal of Biological Chemistry*, 288(21), pp. 14959–14972. doi: 10.1074/jbc.M113.462408.
- Dossou, A. S. and Basu, A. (2019) 'The Emerging Roles of mTORC1 in Macromanaging Autophagy', *Cancers*, 11(10). doi: 10.3390/cancers11101422.
- Durán, W. N., Beuve, A. V. and Sánchez, F. A. (2013) 'Nitric oxide, S-nitrosation and endothelial permeability', *IUBMB life*, 65(10), pp. 819–826. doi: 10.1002/iub.1204.
- Earley, S. and Brayden, J. E. (2015) 'Transient Receptor Potential Channels in the Vasculature', *Physiological Reviews*, 95(2), pp. 645–690. doi: 10.1152/physrev.00026.2014.
- Eletto, D., Dersh, D. and Argon, Y. (2010) 'GRP94 in ER Quality Control and Stress Responses', *Seminars in cell & developmental biology*, 21(5), pp. 479–485. doi: 10.1016/j.semcd.2010.03.004.
- Ellis, R. J., van der Vies, S. M. and Hemmingsen, S. M. (1989) 'The molecular chaperone concept', *Biochemical Society Symposium*, 55, pp. 145–153.
- Erikson, H. *et al.* (1956) 'The Critical Temperature in Naked Man', *Acta Physiologica Scandinavica*, 37(1), pp. 35–39. doi: 10.1111/j.1748-1716.1956.tb01339.x.
- Evans, S. S., Repasky, E. A. and Fisher, D. T. (2015) 'Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat', *Nature Reviews. Immunology*, 15(6), pp. 335–349. doi: 10.1038/nri3843.

- Eyolfson, D. A. *et al.* (2001) 'Measurement and prediction of peak shivering intensity in humans', *European Journal of Applied Physiology*, 84(1–2), pp. 100–106. doi: 10.1007/s004210000329.
- Félétoù, M. (2011) *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences (Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57149/> (Accessed: 5 May 2020).
- Fox, R. H. and Hilton, S. M. (1958) 'Bradykinin formation in human skin as a factor in heat vasodilatation', *The Journal of Physiology*, 142(2), pp. 219–232. doi: 10.1113/jphysiol.1958.sp006011.
- Gan, N. *et al.* (2010) 'Sulforaphane Activates Heat Shock Response and Enhances Proteasome Activity through Up-regulation of Hsp27', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(46), pp. 35528–35536. doi: 10.1074/jbc.M110.152686.
- Garami, A., Steiner, A. A. and Romanovsky, A. A. (2018) 'Fever and hypothermia in systemic inflammation', *Handbook of Clinical Neurology*, 157, pp. 565–597. doi: 10.1016/B978-0-444-64074-1.00034-3.
- Garrick, R. A., Ryan, U. S. and Chinard, F. P. (1988) 'Water permeability of isolated endothelial cells at different temperatures', *The American Journal of Physiology*, 255(3 Pt 1), pp. C311–314. doi: 10.1152/ajpcell.1988.255.3.C311.
- Gavard, J. and Gutkind, J. S. (2006) 'VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the  $\beta$ -arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin', *Nature Cell Biology*, 8(11), pp. 1223–1234. doi: 10.1038/ncb1486.
- Gevaert, A. B. *et al.* (2017) 'Targeting Endothelial Function to Treat Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: The Promise of Exercise Training', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, p. 4865756. doi: 10.1155/2017/4865756.
- Ghimire, K. *et al.* (2017) 'Nitric oxide: what's new to NO?', *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 312(3), pp. C254–C262. doi: 10.1152/ajpcell.00315.2016.
- Ghosh, R. *et al.* (2014) 'Allosteric inhibition of the IRE1 $\alpha$  RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress', *Cell*, 158(3), pp. 534–548. doi: 10.1016/j.cell.2014.07.002.
- Ghosn, M. G. *et al.* (2009) 'Effect of temperature on permeation of low-density lipoprotein particles through human carotid artery tissues', *Journal of Biophotonics*, 2(10), pp. 573–580. doi: 10.1002/jbio.200810071.
- Gothard, L. Q. *et al.* (2003) 'Lowered temperature set point for activation of the cellular stress response in T-lymphocytes', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11), pp. 9322–9326. doi: 10.1074/jbc.M209412200.
- Guettouche, T. *et al.* (2005) 'Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress', *BMC biochemistry*, 6, p. 4. doi: 10.1186/1471-2091-6-4.
- Hammond, C. M. *et al.* (2017) 'Histone chaperone networks shaping chromatin function', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(3), pp. 141–158. doi: 10.1038/nrm.2016.159.
- Han, D. *et al.* (2009) 'IRE1 $\alpha$  kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates', *Cell*, 138(3), pp. 562–575. doi: 10.1016/j.cell.2009.07.017.

- Hardy, J. D., Du Bois, E. F. and Soderstrom, G. F. (1938) 'Basal Metabolism, Radiation, Convection and Vaporization at Temperatures of 22 to 35°C. Six Figures', *The Journal of Nutrition*, 15(5), pp. 477–497. doi: 10.1093/jn/15.5.477.
- Heldens, L. *et al.* (2010) 'Co-chaperones are limiting in a depleted chaperone network', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 67(23), pp. 4035–4048. doi: 10.1007/s00018-010-0430-7.
- Heldens, L. *et al.* (2011) 'An Atypical Unfolded Protein Response in Heat Shocked Cells', *PLOS ONE*, 6(8), p. e23512. doi: 10.1371/journal.pone.0023512.
- Hetz, C. (2012) 'The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(2), pp. 89–102. doi: 10.1038/nrm3270.
- Hietakangas, V. *et al.* (2006) 'PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(1), pp. 45–50. doi: 10.1073/pnas.0503698102.
- Hochachka, P. W. and Somero, G. N. (1968) 'The adaptation of enzymes to temperature', *Comparative Biochemistry and Physiology*, 27(3), pp. 659–668. doi: 10.1016/0010-406X(68)90605-1.
- Holmberg, C. I. *et al.* (2001) 'Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1', *The EMBO Journal*, 20(14), pp. 3800–3810. doi: 10.1093/emboj/20.14.3800.
- Huber, P. (2000) 'De cadhérine en cadhérine, la VE-cadhérine de l'endothélium vasculaire.', *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN: 0767-0974]*, 2000, Vol. 16, N° 1; p.116-7. doi: 10.4267/10608/1513.
- Ivanov, K. P. (2006) 'The development of the concepts of homeothermy and thermoregulation', *Journal of Thermal Biology*, 31(1), pp. 24–29. doi: 10.1016/j.jtherbio.2005.12.005.
- Jamali, M. S. A. and Ismail, Z. (2019) *Simulation of Heat Transfer on Blood Flow through a Stenosed Bifurcated Artery*. Available at: /paper/Simulation-of-Heat-Transfer-on-Blood-Flow-through-a-Jamali-Ismail/2b7c936f797e6d6fb48563b8fc9b785b9beb617 (Accessed: 2 September 2020).
- Johnson, J. M., Minson, C. T. and Kellogg, D. L. (2014) 'Cutaneous Vasodilator and Vasoconstrictor Mechanisms in Temperature Regulation', in *Comprehensive Physiology*. American Cancer Society, pp. 33–89. doi: 10.1002/cphy.c130015.
- Kaneko, Y. and Szallasi, A. (2014) 'Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective', *British Journal of Pharmacology*, 171(10), pp. 2474–2507. doi: 10.1111/bph.12414.
- Kim, H. Y. *et al.* (2016) 'ERK-mediated phosphorylation of BIS regulates nuclear translocation of HSF1 under oxidative stress', *Experimental & Molecular Medicine*, 48(9), p. e260. doi: 10.1038/emm.2016.84.
- Kim, S. and Gross, D. S. (2013) 'Mediator Recruitment to Heat Shock Genes Requires Dual Hsf1 Activation Domains and Mediator Tail Subunits Med15 and Med16', *The Journal of Biological Chemistry*, 288(17), pp. 12197–12213. doi: 10.1074/jbc.M112.449553.
- Kim, S. and Woo, C.-H. (2018) 'Laminar Flow Inhibits ER Stress-Induced Endothelial Apoptosis through PI3K/Akt-Dependent Signaling Pathway', *Molecules and Cells*, 41(11), pp. 964–970. doi: 10.14348/molcells.2018.0111.



- Kluger, M. J. *et al.* (1996) 'THE ADAPTIVE VALUE OF FEVER', *Infectious Disease Clinics of North America*, 10(1), pp. 1–20. doi: 10.1016/S0891-5520(05)70282-8.
- Köhler, R. and Hoyer, J. (2007) 'Role of TRPV4 in the Mechanotransduction of Shear Stress in Endothelial Cells', in Liedtke, W. B. and Heller, S. (eds) *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis (Frontiers in Neuroscience). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5250/> (Accessed: 17 July 2020).
- Kovács, D. *et al.* (2019) 'HSF1Base: A Comprehensive Database of HSF1 (Heat Shock Factor 1) Target Genes', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22). doi: 10.3390/ijms20225815.
- Kumsta, C. *et al.* (2017) 'Hormetic heat stress and HSF-1 induce autophagy to improve survival and proteostasis in *C. elegans*', *Nature Communications*, 8. doi: 10.1038/ncomms14337.
- L, A. and H, T. (2012) 'Effects of Solar Radiation on Animal Thermoregulation', *Solar Radiation*, p. undefined-undefined. doi: 10.5772/34771.
- Lamming, D. W. (2016) 'Inhibition of the Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)–Rapamycin and Beyond', *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(5). doi: 10.1101/cshperspect.a025924.
- Lee, A.-H., Iwakoshi, N. N. and Glimcher, L. H. (2003) 'XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response', *Molecular and Cellular Biology*, 23(21), pp. 7448–7459. doi: 10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003.
- Lee, W. L. and Slutsky, A. S. (2010) 'Sepsis and endothelial permeability', *The New England Journal of Medicine*, 363(7), pp. 689–691. doi: 10.1056/NEJMcibr1007320.
- Lehoux, S. and Tedgui, A. (2004) 'Bases cellulaires de la mécanotransduction dans la cellule endothéliale', *médecine/sciences*, 20(5), pp. 551–556. doi: 10.1051/medsci/2004205551.
- Ley, K. *et al.* (2007) 'Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated', *Nature Reviews Immunology*, 7(9), pp. 678–689. doi: 10.1038/nri2156.
- Ley, O. and Kim, T. (2007) 'Calculation of arterial wall temperature in atherosclerotic arteries: effect of pulsatile flow, arterial geometry, and plaque structure', *Biomedical Engineering Online*, 6, p. 8. doi: 10.1186/1475-925X-6-8.
- Li, X.-K. *et al.* (2017) 'Endothelial activation and dysfunction in severe fever with thrombocytopenia syndrome', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(8). doi: 10.1371/journal.pntd.0005746.
- Li, Y.-S. J., Haga, J. H. and Chien, S. (2005) 'Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells', *Journal of Biomechanics*, 38(10), pp. 1949–1971. doi: 10.1016/j.jbiomech.2004.09.030.
- Lindquist, S. (1986) 'The heat-shock response', *Annual Review of Biochemistry*, 55, pp. 1151–1191. doi: 10.1146/annurev.bi.55.070186.005443.
- Liu, C. Y. and Kaufman, R. J. (2003) 'The unfolded protein response', *Journal of Cell Science*, 116(10), pp. 1861–1862. doi: 10.1242/jcs.00408.

- Liu, G. *et al.* (2014) 'Non-invasive temperature mapping using temperature-responsive water saturation shift referencing (T-WASSR) MRI', *NMR in biomedicine*, 27(3), p. 320. doi: 10.1002/nbm.3066.
- Liu, L. *et al.* (2019) 'Adaptive endoplasmic reticulum stress signalling via IRE1 $\alpha$ -XBP1 preserves self-renewal of haematopoietic and pre-leukaemic stem cells', *Nature Cell Biology*, 21(3), pp. 328–337. doi: 10.1038/s41556-019-0285-6.
- Lotz, G. P. *et al.* (2003) 'Aha1 Binds to the Middle Domain of Hsp90, Contributes to Client Protein Activation, and Stimulates the ATPase Activity of the Molecular Chaperone', *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), pp. 17228–17235. doi: 10.1074/jbc.M212761200.
- Mackowiak, P. A., Wasserman, S. S. and Levine, M. M. (1992) 'A critical appraisal of 98.6 degrees F, the upper limit of the normal body temperature, and other legacies of Carl Reinhold August Wunderlich', *JAMA*, 268(12), pp. 1578–1580.
- Madjid, M. *et al.* (2002) 'Thermal detection of vulnerable plaque', *The American Journal of Cardiology*, 90(10C), pp. 36L-39L. doi: 10.1016/s0002-9149(02)02962-4.
- Mallat, R. K. *et al.* (2017) 'The vascular endothelium: A regulator of arterial tone and interface for the immune system', *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 54(7–8), pp. 458–470. doi: 10.1080/10408363.2017.1394267.
- Matsumoto, Y. and Crews, D. (2012) 'Molecular mechanisms of temperature-dependent sex determination in the context of ecological developmental biology', *Molecular and Cellular Endocrinology*, 354(1–2), pp. 103–110. doi: 10.1016/j.mce.2011.10.012.
- Mattson, M. P. (2008) 'Hormesis defined', *Ageing Research Reviews*, 7(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.arr.2007.08.007.
- Michel, J. B. and Arnal, J. F. (1993) 'Monoxyde d'azote et hypertension artérielle', *M/S. Médecine sciences [revue papier, ISSN : 0767-0974]*, 1993, Vol. 9, N° 10; p.1061-7. doi: 10.4267/10608/2809.
- Michiels, C. (2003) 'Endothelial cell functions', *Journal of Cellular Physiology*, 196(3), pp. 430–443. doi: 10.1002/jcp.10333.
- Minke, B. (2010) 'The history of the Drosophila TRP channel: the birth of a new channel superfamily', *Journal of Neurogenetics*, 24(4), pp. 216–233. doi: 10.3109/01677063.2010.514369.
- Miyata, Y., Badolato, M. and Neamati, N. (2018) 'HSPA5', in Choi, S. (ed.) *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Cham: Springer International Publishing, pp. 2429–2451. doi: 10.1007/978-3-319-67199-4\_101802.
- Najmi, J. and Irtiza Ali Shah, S. (no date) *Analysis Of Velocity Profile For Laminar Flow In A Round Pipe*, *ResearchGate*. Available at: <https://www.researchgate.net/project/Analysis-Of-Velocity-Profile-For-Laminar-Flow-In-A-Round-Pipe> (Accessed: 2 September 2020).
- Navarro-Martín, L. *et al.* (2011) 'DNA Methylation of the Gonadal Aromatase (cyp19a) Promoter Is Involved in Temperature-Dependent Sex Ratio Shifts in the European Sea Bass', *PLOS Genetics*, 7(12), p. e1002447. doi: 10.1371/journal.pgen.1002447.
- Nilius, B. and Voets, T. (2005) 'TRP channels: a TR(I)P through a world of multifunctional cation channels', *Pflügers Archiv*, 451(1), pp. 1–10. doi: 10.1007/s00424-005-1462-y.

- Nourshargh, S. and Alon, R. (2014) 'Leukocyte Migration into Inflamed Tissues', *Immunity*, 41(5), pp. 694–707. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.008.
- Ohama, N. *et al.* (2017) 'Transcriptional Regulatory Network of Plant Heat Stress Response', *Trends in Plant Science*, 22(1), pp. 53–65. doi: 10.1016/j.tplants.2016.08.015.
- Ohashi, T. and Sato, M. (2005) 'Remodeling of vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress: experimental and numerical approach', *Fluid Dynamics Research*, 37(1), pp. 40–59. doi: 10.1016/j.fluidyn.2004.08.005.
- Okabe, K. *et al.* (2018) 'Intracellular thermometry with fluorescent sensors for thermal biology', *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 470(5), pp. 717–731. doi: 10.1007/s00424-018-2113-4.
- Owsianik, G. *et al.* (2006) 'Permeation and selectivity of TRP channels', *Annual Review of Physiology*, 68, pp. 685–717. doi: 10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406.
- Pardal, A. J., Fernandes-Duarte, F. and Bowman, A. J. (2019) 'The histone chaperoning pathway: from ribosome to nucleosome', *Essays in Biochemistry*, 63(1), pp. 29–43. doi: 10.1042/EBC20180055.
- Park, J. M. *et al.* (2001) 'Mediator, not holoenzyme, is directly recruited to the heat shock promoter by HSF upon heat shock', *Molecular Cell*, 8(1), pp. 9–19. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00296-9.
- Patapoutian, A. *et al.* (2003) 'ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation', *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(7), pp. 529–539. doi: 10.1038/nrn1141.
- Pedersen, S. F., Owsianik, G. and Nilius, B. (2005) 'TRP channels: An overview', *Cell Calcium*, 38(3), pp. 233–252. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.028.
- Prischi, F. *et al.* (2014) 'Phosphoregulation of Ire1 RNase splicing activity', *Nature Communications*, 5(1), p. 3554. doi: 10.1038/ncomms4554.
- PW, H. and Somero, G. (2002) *Bio-Chemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*.
- Resnick, N. *et al.* (2003) 'Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse', *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 81(3), pp. 177–199. doi: 10.1016/s0079-6107(02)00052-4.
- Reynolds, W. W. and Casterlin, M. E. (1980) 'The Role of Temperature in the Environmental Physiology of Fishes', in Ali, M. A. (ed.) *Environmental Physiology of Fishes*. Boston, MA: Springer US (NATO Advanced Study Institutes Series), pp. 497–518. doi: 10.1007/978-1-4899-3659-2\_19.
- Samarasinghe, B. *et al.* (2014) 'Heat Shock Factor 1 Confers Resistance to Hsp90 Inhibitors through p62/SQSTM1 Expression and Promotion of Autophagic Flux', *Biochemical pharmacology*, 87(3), pp. 445–455. doi: 10.1016/j.bcp.2013.11.014.
- Sarge, K. D. (1998) 'Regulation of HSF1 activation and Hsp expression in mouse tissues under physiological stress conditions', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851, pp. 112–116. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08983.x.
- Sarge, K. D., Murphy, S. P. and Morimoto, R. I. (1993) 'Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear

- localization and can occur in the absence of stress', *Molecular and Cellular Biology*, 13(3), pp. 1392–1407. doi: 10.1128/mcb.13.3.1392.
- Sasi, B. K. *et al.* (2014) 'Coordinated Transcriptional Regulation of Hspa1a Gene by Multiple Transcription Factors: Crucial Roles for HSF-1, NF-Y, NF- $\kappa$ B, and CREB', *Journal of Molecular Biology*, 426(1), pp. 116–135. doi: 10.1016/j.jmb.2013.09.008.
- Sawaji, Y. *et al.* (2002) 'Anti-angiogenic action of hyperthermia by suppressing gene expression and production of tumour-derived vascular endothelial growth factor in vivo and in vitro', *British Journal of Cancer*, 86(10), pp. 1597–1603. doi: 10.1038/sj.bjc.6600268.
- Schulte, P. M. (2011) 'TEMPERATURE | Effects of Temperature: An Introduction', in Farrell, A. P. (ed.) *Encyclopedia of Fish Physiology*. San Diego: Academic Press, pp. 1688–1694. doi: 10.1016/B978-0-12-374553-8.00159-3.
- Shaffer, A. L. *et al.* (2004) 'XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation', *Immunity*, 21(1), pp. 81–93. doi: 10.1016/j.immuni.2004.06.010.
- Shi, Y., Mosser, D. D. and Morimoto, R. I. (1998) 'Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors', *Genes & Development*, 12(5), pp. 654–666. doi: 10.1101/gad.12.5.654.
- Simon, H. B. (2010) *Hyperthermia*, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199308123290708>. Massachusetts Medical Society. doi: 10.1056/NEJM199308123290708.
- Sisti, G. *et al.* (2015) 'Interaction between the inducible 70-kDa heat shock protein and autophagy: effects on fertility and pregnancy', *Cell Stress & Chaperones*, 20(5), pp. 753–758. doi: 10.1007/s12192-015-0609-9.
- Soar, J. *et al.* (2010) 'European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2010 Section 8. Cardiac arrest in special circumstances: Electrolyte abnormalities, poisoning, drowning, accidental hypothermia, hyperthermia, asthma, anaphylaxis, cardiac surgery, trauma, pregnancy, electrocution', *Resuscitation*, 81(10), pp. 1400–1433. doi: 10.1016/j.resuscitation.2010.08.015.
- Srikiatkachorn, A. and Kelley, J. F. (2014) 'Endothelial Cells in Dengue Hemorrhagic Fever', *Antiviral research*, 0, pp. 160–170. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.07.005.
- Stefanadis, C. *et al.* (1999) 'Thermal heterogeneity within human atherosclerotic coronary arteries detected in vivo: A new method of detection by application of a special thermography catheter', *Circulation*, 99(15), pp. 1965–1971. doi: 10.1161/01.cir.99.15.1965.
- Stefanadis, C. *et al.* (2003) 'Thermal heterogeneity in stable human coronary atherosclerotic plaques is underestimated in vivo: the "cooling effect" of blood flow', *Journal of the American College of Cardiology*, 41(3), pp. 403–408. doi: 10.1016/s0735-1097(02)02817-6.
- Sullivan, M. N. and Earley, S. (2013) 'TRP channel Ca(2+) sparklets: fundamental signals underlying endothelium-dependent hyperpolarization', *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 305(10), pp. C999–C1008. doi: 10.1152/ajpcell.00273.2013.
- Sund-Levander, M., Forsberg, C. and Wahren, L. K. (2002) 'Normal oral, rectal, tympanic and axillary body temperature in adult men and women: a systematic literature review', *Scandinavian Journal of Caring Sciences*, 16(2), pp. 122–128. doi: 10.1046/j.1471-6712.2002.00069.x.

- Tang, C.-H. A. *et al.* (2014) 'Inhibition of ER stress-associated IRE-1/XBP-1 pathway reduces leukemic cell survival', *The Journal of Clinical Investigation*, 124(6), pp. 2585–2598. doi: 10.1172/JCI73448.
- Tang, Z. *et al.* (2015) 'MEK guards proteome stability and inhibits tumor-suppressive amyloidogenesis via HSF1', *Cell*, 160(4), pp. 729–744. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.028.
- Tansey, E. A. and Johnson, C. D. (2015) 'Recent advances in thermoregulation', *Advances in Physiology Education*, 39(3), pp. 139–148. doi: 10.1152/advan.00126.2014.
- Tkáčová, J. and Angelovičová, M. (2012) 'Heat Shock Proteins (HSPs): a Review', *Lucrari Stiintifice : Zootehnie si Biotehnologii*, 45.
- Tomanek, L. and Somero, G. N. (2002) 'Interspecific- and acclimation-induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus Tegula): implications for regulation of hsp gene expression', *The Journal of Experimental Biology*, 205(Pt 5), pp. 677–685.
- Topper, J. N. and Gimbrone, M. A. (1999) 'Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype', *Molecular Medicine Today*, 5(1), pp. 40–46. doi: 10.1016/s1357-4310(98)01372-0.
- Tur, E. (1997) 'Physiology of the skin—Differences between women and men', *Clinics in Dermatology*, 15(1), pp. 5–16. doi: 10.1016/S0738-081X(96)00105-8.
- Uchiyama, S. *et al.* (2015) 'A cationic fluorescent polymeric thermometer for the ratiometric sensing of intracellular temperature', *The Analyst*, 140(13), pp. 4498–4506. doi: 10.1039/c5an00420a.
- Uetz, H. and Föhl, J. (1978) 'Wear as an energy transformation process', *Wear*, 49(2), pp. 253–264. doi: 10.1016/0043-1648(78)90091-1.
- Urschel, K. *et al.* (2010) 'Role of shear stress patterns in the TNF- $\alpha$ -induced atherogenic protein expression and monocytic cell adhesion to endothelium', *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 46(2–3), pp. 203–210. doi: 10.3233/CH-2010-1346.
- Vachharajani, V. T. *et al.* (2016) 'Sirtuins Link Inflammation and Metabolism', *Journal of Immunology Research*, 2016. doi: 10.1155/2016/8167273.
- Vallance Patrick and Leiper James (2004) 'Cardiovascular Biology of the Asymmetric Dimethylarginine:Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Pathway', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(6), pp. 1023–1030. doi: 10.1161/01.ATV.0000128897.54893.26.
- Van Someren, E. J. W. *et al.* (2002) 'Circadian and age-related modulation of thermoreception and temperature regulation: mechanisms and functional implications', *Ageing Research Reviews*, 1(4), pp. 721–778. doi: 10.1016/s1568-1637(02)00030-2.
- Van Someren, E. J. W. (2006) 'Mechanisms and functions of coupling between sleep and temperature rhythms', in Kalsbeek, A. *et al.* (eds) *Progress in Brain Research*. Elsevier (Hypothalamic Integration of Energy Metabolism), pp. 309–324. doi: 10.1016/S0079-6123(06)53018-3.
- Verheye, S. *et al.* (2002) 'In vivo temperature heterogeneity of atherosclerotic plaques is determined by plaque composition', *Circulation*, 105(13), pp. 1596–1601. doi: 10.1161/01.cir.0000012527.94843.bf.

- Vestweber, D. (2000) 'Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts', *The Journal of Pathology*, 190(3), pp. 281–291. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(200002)190:3<281::AID-PATH527>3.0.CO;2-Z.
- Vlad, M. *et al.* (2010) 'Morphological changes during acute experimental short-term hyperthermia', *Romanian Journal of Morphology and Embryology = Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie*, 51(4), pp. 739–744.
- Wagner, M. *et al.* (1999) 'Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock', *The American Journal of Physiology*, 277(5), pp. L1026-1033. doi: 10.1152/ajplung.1999.277.5.L1026.
- Walter, E. J. *et al.* (2016) 'The pathophysiological basis and consequences of fever', *Critical Care*, 20. doi: 10.1186/s13054-016-1375-5.
- Walter, P. and Ron, D. (2011) 'The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation', *Science*, 334(6059), pp. 1081–1086. doi: 10.1126/science.1209038.
- Wasserman, S. M. *et al.* (2002) 'Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid shear stress', *Physiological Genomics*, 12(1), pp. 13–23. doi: 10.1152/physiolgenomics.00102.2002.
- Watanabe, H. *et al.* (2009) 'The pathological role of transient receptor potential channels in heart disease', *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society*, 73(3), pp. 419–427. doi: 10.1253/circj.cj-08-1153.
- Wei, D. and Luo, H. (2003) 'Finite element solutions of heat transfer in molten polymer flow in tubes with viscous dissipation', *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 46(16), pp. 3097–3108. doi: 10.1016/S0017-9310(03)00069-3.
- Welty, J. R. (2008) 'Fundamentals of momentum, heat, and mass transfer'. Hoboken, N.J. ; Chichester : Wiley. Available at: <https://trove.nla.gov.au/work/10957591> (Accessed: 6 May 2020).
- Westerheide, S. D. *et al.* (2009) 'Stress-Inducible Regulation of Heat Shock Factor 1 by the Deacetylase SIRT1', *Science (New York, N.Y.)*, 323(5917), pp. 1063–1066. doi: 10.1126/science.1165946.
- Wodtke, E. (1978) 'Lipid adaptation in liver mitochondrial membranes of carp acclimated to different environmental temperatures: Phospholipid composition, fatty acid pattern, and cholesterol content', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 529(2), pp. 280–291. doi: 10.1016/0005-2760(78)90071-1.
- Woodford, M. R. *et al.* (2016) 'The FNIP co-chaperones decelerate the Hsp90 chaperone cycle and enhance drug binding', *Nature Communications*, 7. doi: 10.1038/ncomms12037.
- Wunderlich, C. A. (Carl A. *et al.* (1871) *Medical thermometry, and human temperature*. New York : Wood. Available at: <http://archive.org/details/32731270R.nlm.nih.gov> (Accessed: 6 May 2020).
- Xu, Q. *et al.* (1994) 'Surface staining and cytotoxic activity of heat-shock protein 60 antibody in stressed aortic endothelial cells', *Circulation Research*, 75(6), pp. 1078–1085. doi: 10.1161/01.res.75.6.1078.
- Xuan, C. *et al.* (2015) 'L-citrulline for protection of endothelial function from ADMA-induced injury in porcine coronary artery', *Scientific Reports*, 5. doi: 10.1038/srep10987.

- Yatsu, R. *et al.* (2016) 'RNA-seq analysis of the gonadal transcriptome during Alligator mississippiensis temperature-dependent sex determination and differentiation', *BMC Genomics*, 17(1), p. 77. doi: 10.1186/s12864-016-2396-9.
- Yoshida, H. *et al.* (2001) 'XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor', *Cell*, 107(7), pp. 881–891. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00611-0.
- Yoshihara, T. *et al.* (2013) 'Heat stress activates the Akt/mTOR signalling pathway in rat skeletal muscle', *Acta Physiologica*, 207(2), pp. 416–426. doi: 10.1111/apha.12040.
- Youn, D. Y. *et al.* (2019) 'The subunit assembly state of the Mediator complex is nutrient-regulated and is dysregulated in a genetic model of insulin resistance and obesity', *The Journal of Biological Chemistry*, 294(23), pp. 9076–9083. doi: 10.1074/jbc.RA119.007850.
- Zhang, D. X. and Gutterman, D. D. (2011) 'TRP channel activation and endothelium-dependent dilation in the systemic circulation', *Journal of cardiovascular pharmacology*, 57(2), pp. 133–139. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181fd35d1.
- Zheng, Z. *et al.* (2019) 'Endoplasmic Reticulum Stress Signaling Pathways: Activation and Diseases', *Current Protein & Peptide Science*, 20(9), pp. 935–943. doi: 10.2174/1389203720666190621103145.
- Zhou, J. *et al.* (2006) 'The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), pp. 14343–14348. doi: 10.1073/pnas.0606480103.
- Zhou, J., Li, Y.-S. and Chien, S. (2014) 'Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(10), pp. 2191–2198. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.303422.

# ANNEXES



## ANNEXE I

Gène (Acronyme)	Nom complet du gène	Référence de la sonde (ThermoFisher®)
XBP1 unspliced (forme non épissée de XBP1)	X-Box Binding Protein 1	Hs02856596_m1
XBP1 spliced (forme épissée de XBP1)	X-Box Binding Protein 1	Hs03929085_g1
TRPV1	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1	Hs00218912_m1
TRPV2	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 2	Hs00901648_m1
TRPV3	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 3	Hs00376854_m1
TRPV4	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 4	Hs01099348_m1
TRPM3	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 3	Hs00257553_m1
TRPM8	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 8	Hs01066596_m1
TRPA1	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily A Member 1	Hs00175798_m1
TRPC5	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily C Member 5	Hs00202960_m1
TBP	TATA box binding protein	Hs00427620_m1
HPRT1	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	Hs02800695_m1
18S	ARN ribosomal 18S	Hs99999901_s1

**TABLEAU 18 : LISTE ET RÉFÉRENCES DES GÈNES DONT L'EXPRESSION A ÉTÉ ÉTUDIÉE PAR RT-QPCR.**

Gène (Acronyme)	Nom complet du gène	Référence de la sonde (ThermoFisher®)
18S (gène de ménage)	ARN ribosomal 18S	Hs99999901_s1
ABCD3	ATP Binding Cassette Subfamily D Member 3	Hs00161065_m1
ABTB2	Ankyrin Repeat And BTB Domain Containing 2	Hs00377559_m1
ACADS	Acyl-CoA Dehydrogenase Short Chain	Hs00163506_m1
ACRC	Germ Cell Nuclear Acidic Peptidase	Hs00369516_m1
ALKBH3	AlkB Homolog 3, Alpha-Ketoglutarate Dependent Dioxygenase	Hs00286731_m1
APLN	Apelin	Hs00175572_m1
ATP5SL	Distal Membrane Arm Assembly Complex 2	Hs01547812_m1
ATXN7L1	Ataxin 7 Like 1	Hs01095934_m1
AUNIP	Aurora Kinase A And Ninein Interacting Protein	Hs00225211_m1
CABYR	Calcium Binding Tyrosine Phosphorylation Regulated	Hs00201830_m1
CARD8	Caspase Recruitment Domain Family Member 8	Hs01088221_m1
CCT6B	Chaperonin Containing TCP1 Subunit 6B	Hs01018742_m1
CHAF1B	Chromatin Assembly Factor 1 Subunit B	Hs01123302_m1
CHORDC1	Cysteine And Histidine Rich Domain Containing 1	Hs00854389_g1
CIRBP	Cold Inducible RNA Binding Protein	Hs00154457_m1
CRELD1	Cysteine Rich With EGF Like Domains 1	Hs00210086_m1
CTU1	Cytosolic Thiouridylase Subunit 1	Hs00293325_m1
DDX43	DEAD-Box Helicase 43	Hs00218682_m1
DNAJB6	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B6	Hs00369717_m1
E2F2	E2F Transcription Factor 2	Hs00918090_m1
E2F8	E2F Transcription Factor 8	Hs00226635_m1
EIF4A2	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A2	Hs00756996_g1
F2RL2	Coagulation Factor II Thrombin Receptor Like 2	Hs00187982_m1
FAM222A	Family With Sequence Similarity 222 Member A	Hs00757936_m1
FKBP4	FKBP Prolyl Isomerase 4	Hs00427038_g1
GALNT15	Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 15	Hs01551883_m1
GBP5	Guanylate Binding Protein 5	Hs00369472_m1
GCFC2	GC-Rich Sequence DNA-Binding Factor 2	Hs00895283_m1
GJC2	Gap Junction Protein Gamma 2	Hs00954083_m1
GJD3	Gap Junction Protein Delta 3	Hs00987388_s1
GLS	Glutaminase	Hs01014020_m1
GLYCK	Glycerate Kinase	Hs00611135_m1
HELLS	Helicase, Lymphoid Specific	Hs00934778_m1
HIST1H1D	H1.3 Linker Histone, Cluster Member	Hs00271187_s1
HIST1H2BK	H2B Clustered Histone 12	Hs00955067_g1
HPDL	4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Like	Hs00536325_s1
HPRT1 (gène de ménage)	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	Hs02800695_m1
HSP90AA1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1	Hs00743767_sH
HSP90B1	Heat Shock Protein 90 Beta Family Member 1	Hs00427665_g1
HSPA1A	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1A	Hs00359163_s1

Gène (Acronyme)	Nom complet du gène	Référence de la sonde (ThermoFisher®)
HSPA1B	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 1B	Hs01040501_sH
HSPH1	Heat Shock Protein Family H (Hsp110) Member 1	Hs00971475_m1
IFNAR1	Interferon Alpha And Beta Receptor Subunit 1	Hs01066116_m1
KAT2A	Lysine Acetyltransferase 2A	Hs00221499_m1
KDM4C	Lysine Demethylase 4C	Hs00909585_m1
KDM4D	Lysine Demethylase 4D	Hs00250616_s1
KIF19	Kinesin Family Member 19	Hs01061617_m1
KLHL7	Kelch Like Family Member 7	Hs01074832_m1
LAMP5	Lysosomal Associated Membrane Protein Family Member 5	Hs00202136_m1
LRRC70	Leucine Rich Repeat Containing 70	Hs00704102_s1
LSMEM1	Leucine Rich Single-Pass Membrane Protein 1	Hs00699509_m1
LYG1	Lysozyme G1	Hs00380597_m1
LYRM9	LYR Motif Containing 9	Hs00953770_m1
MED23	Mediator Complex Subunit 23	Hs00968955_m1
MIA3	MIA SH3 Domain ER Export Factor 3	Hs01558382_m1
MX1	MX Dynamin Like GTPase 1	Hs00895608_m1
NAT6	N-Alpha-Acetyltransferase 80, NatH Catalytic Subunit	Hs04187949_m1
OSCP1	Organic Solute Carrier Partner 1	Hs00376771_m1
P4HA1	Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 1	Hs00914594_m1
P4HA2	Prolyl 4-Hydroxylase Subunit Alpha 2	Hs00990001_m1
PAIP1	Poly(A) Binding Protein Interacting Protein 1	Hs04978543_m1
PDE4DIP	Phosphodiesterase 4D Interacting Protein	Hs00206200_m1
PDIA4	Protein Disulfide Isomerase Family A Member 4	Hs01115905_m1
PDK1	Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1	Hs01561847_m1
PDLIM4	PDZ And LIM Domain 4	Hs00925320_m1
PEX6	Peroxisomal Biogenesis Factor 6	Hs00165457_m1
PHF14	PHD Finger Protein 14	Hs01022135_m1
PLGLB1	Plasminogen Like B1	Hs03680195_mH
PRDM2	PR/SET Domain 2	Hs00202013_m1
PRKACB	Protein Kinase CAMP-Activated Catalytic Subunit Beta	Hs01086757_m1
REP15	RAB15 Effector Protein	Hs02576335_s1
RIMBP3C	RIMS Binding Protein 3C	Hs00825376_s1
RSRP1	Arginine And Serine Rich Protein 1	Hs00220428_m1
SERPINB9	Serpin Family B Member 9	Hs00394497_m1
SLC37A2	Solute Carrier Family 37 Member 2	Hs00400129_m1
SLC46A3	Solute Carrier Family 46 Member 3	Hs00287694_m1
SMIM7	Small Integral Membrane Protein 7	Hs01585052_m1
STON1-GTF2A1L	STON1-GTF2A1L Readthrough	Hs01121086_m1
TBP (gène de ménage)	TATA-Box Binding Protein	Hs00427620_m1
THAP2	THAP Domain Containing 2	Hs00230167_m1
THAP3	THAP Domain Containing 3	Hs00379102_m1
TIMM23	Translocase Of Inner Mitochondrial Membrane 23	Hs00197056_m1
TLR1	Toll Like Receptor 1	Hs00413978_m1

Gène (Acronyme)	Nom complet du gène	Référence de la sonde (ThermoFisher®)
TMEM129	Transmembrane Protein 129, E3 Ubiquitin Ligase	Hs00293336_m1
TMEM99	Transmembrane Protein 99 (Putative)	Hs01886751_s1
TXNRD3	Thioredoxin Reductase 3	Hs00395452_m1
TYMSOS	TYMS Opposite Strand	Hs00826708_m1
UBE3B	Ubiquitin Protein Ligase E3B	Hs01096309_m1
UBFD1	Ubiquitin Family Domain Containing 1	Hs04965022_s1
USB1	U6 SnRNA Biogenesis Phosphodiesterase 1	Hs00984809_m1
VMAC	Vimentin Type Intermediate Filament Associated Coiled-Coil Protein	Hs00418522_m1
ZCCHC2	Zinc Finger CCHC-Type Containing 2	Hs00214742_m1
ZNF397	Zinc Finger Protein 397	Hs01061031_m1

**TABLEAU 19 : LISTE ET RÉFÉRENCES DES 91 GÈNES DONT L'EXPRESSION A ÉTÉ ÉTUDIÉE PAR TLDA.**

Gène (Acronyme)	Nom complet du gène	Référence de la sonde (ThermoFisher®)
ARN 18S (gène de ménage)	ARN ribosomal 18S	Hs99999901_s1
AHSA1	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)	Hs00201602_m1
APLN	apelin	Hs00175572_m1
ATP2A2	ATPase, Ca <sup>++</sup> transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	Hs00544877_m1
BAD	BCL2-associated agonist of cell death	Hs00188930_m1
BAX	BCL2-associated X protein	Hs00180269_m1
BDKRB2	bradykinin receptor B2	Hs00176121_m1
CACYBP	calcyclin binding protein	Hs00761998_s1
CBX3	chromobox homolog 3	Hs04234989_g1
CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	Hs00234140_m1
CIRBP	cold inducible RNA binding protein	Hs00989762_g1
CORO1A	coronin, actin binding protein, 1A	Hs00200039_m1
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	Hs00358796_g1
DNAJB9	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B9	Hs01052402_m1
EIF4A2	eukaryotic translation initiation factor 4A2	Hs00756996_g1
ERN1	Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1	Hs00980095_m1
F2RL2	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	Hs00187982_m1
FKBP4	FK506 binding protein 4, 59kDa	Hs00427038_g1
FLT4	fms-related tyrosine kinase 4	Hs01047677_m1
GPSM1	G-protein signaling modulator 1	Hs00404577_g1
HERC4	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 4	Hs00905784_m1
HIST1H2BK	histone cluster 2, H2be	Hs00955067_g1
HPRT1 (gène de ménage)	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	Hs02800695_m1
HSF1	Heat Shock Factor 1	Hs01027616_g1
HSP90AA1	heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	Hs00743767_sH
HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	Hs00427665_g1
HSPA1A	heat shock 70kDa protein 1A	Hs00359163_s1
HSPA1B	heat shock 70kDa protein 1B	Hs01040501_sH
HSPA4L	heat shock 70kDa protein 4-like	Hs01554771_m1
HSPA5	heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	Hs00607129_gH
HSPH1	heat shock 105kDa/110kDa protein 1	Hs00971475_m1
IDI1	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1	Hs00743568_s1
IL7R	interleukin 7 receptor	Hs00902334_m1
KDM5B	Lysine Demethylase 5B	Hs00981910_m1
KLF2	Kruppel-like factor 2	Hs00360439_g1
P4HA1	prolyl 4-hydroxylase, alpha polypeptide I	Hs00914594_m1
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	Hs01561847_m1
PRKACB	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta	Hs01086757_m1
SDF2L1	stromal cell-derived factor 2-like 1	Hs00222786_m1

Gène (Acronyme)	Nom complet du gène	Référence de la sonde (ThermoFisher®)
SELE	selectin E	Hs00174057_m1
SELPLG	selectin P ligand	Hs05033974_s1
STARD4	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4	Hs00758758_m1
STIP1	stress-induced phosphoprotein 1	Hs00428979_m1
TBP (gène de ménage)	Tata-Box binding Protein	Hs00427620_m1
TES	testis derived transcript (3 LIM domains)	Hs00210319_m1

**TABLEAU 20** : LISTE ET RÉFÉRENCES DES 42 GÈNES DU PANEL DE RÉFÉRENCE DONT L'EXPRESSION A ÉTÉ ÉTUDIÉE PAR TLDA.

Gène (Acronyme)	Nom complet du gène	Référence de la sonde (ThermoFisher®)
ARN 18S (gène de ménage)	ARN ribosomal 18S	Hs99999901_s1
ANGPT2	Angiopoietin 2	Hs00169867_m1
BMP6	Bone Morphogenetic Protein 6	Hs01099594_m1
CCNB1	Cyclin B1	Hs01030099_m1
CXCR4	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4	Hs00237052_m1
EDN1	Endothelin 1	Hs00174961_m1
EDNRA	Endothelin Receptor Type A	Hs03988672_m1
EDNRB	Endothelin Receptor Type B	Hs00240747_m1
ENG	Endoglin	Hs00923996_m1
HEY2	Hes Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 2	Hs01012057_m1
HPRT1 (gène de ménage)	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	Hs02800695_m1
ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1	Hs00164932_m1
ID3	Inhibitor Of DNA Binding 3, HLH Protein	Hs00171409_m1
IL1RL1	Interleukin 1 Receptor Like 1	Hs00249384_m1
JAG2	Jagged 2	Hs00171432_m1
MMP2	Matrix Metalloproteinase 2	Hs01548727_m1
NDRG1	N-Myc Downstream Regulated 1	Hs00608387_m1
NOS3	Nitric Oxide Synthase 3	Hs01574665_m1
NQO1	NAD(P)H:menadione oxidoreductase	Hs00168547_m1
PGF	Placental Growth Factor	Hs00182176_m1
PPP1R15A	Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A	Hs00169585_m1
PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2	Hs00153133_m1
SELE	Selectin E	Hs00174057_m1
SERPINE1	Serpin Family E Member 1	Hs00167155_m1
SERPINE2	Serpin Family E Member 2	Hs00299953_m1
SNAI1	Snail Family Transcriptional Repressor 1	Hs00195591_m1
SOD1	Superoxide Dismutase 1	Hs00533490_m1
TBP (gène de ménage)	Tata-Box binding Protein	Hs00427620_m1
TGFB1	Transforming Growth Factor Beta 1	Hs00998133_m1
THBD	Thrombomodulin	Hs00264920_s1
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1	Hs01003372_m1

**TABLEAU 21 : LISTE ET RÉFÉRENCES DES 28 GÈNES MODULÉS PAR LES FORCES DE CISAILLEMENT ET DONT L'EXPRESSION A ÉTÉ ÉTUDIÉE PAR TLDA.**

## ANNEXE II

Nom du gène	Sur-expression en <i>microarray</i>	Sous-expression en <i>microarray</i>	TI obtenu en TLDA (40°C vs 37°C)
ABCD3		✓	0.9
ABTB2	✓		3.4
ACADS		✓	0.6
ACRC	✓		5.9
ALKBH3		✓	0.4
APLN		✓	0.6
ATP5SL		✓	1.4
ATXN7L1	✓		0.8
AUNIP		✓	0.5
CABYR		✓	0.7
CARD8		✓	2.2
CCT6B		✓	0.4
CHAF1B		✓	0.5
CHORDC1	✓		6.4
CIRBP		✓	0.4
CRELD1	✓		5.8
CTU1	✓		1.7
DDX43		✓	0.7
DNAJB6	✓		4.9
E2F2		✓	0.3
E2F8		✓	0.5
EIF4A2	✓		2.8
F2RL2		✓	0.5
FAM222A	✓		4.5
FKBP4	✓		8.4
GALNT15		✓	0.4
GBP5		✓	1.3
GCFC2		✓	0.4
GJC2	✓		2.7
GJD3		✓	0.4
GLS	✓		2.8
GLYCK		✓	0.9
HELLS		✓	0.3
HIST1H1D		✓	0.9
HIST1H2BK	✓		3.1
HPDL		✓	1.3
HSP90AA1	✓		10.6
HSP90B1	✓		5.2
HSPA1A	✓		58.4



Nom du gène	Sur-expression en <i>microarray</i>	Sous-expression en <i>microarray</i>	TI obtenu en TLDA (40°C vs 37°C)
HSPA1B	✓		35.4
HSPH1	✓		6.1
IFNAR1	✓		1.3
KAT2A	✓		2.8
KDM4C		✓	1.6
KDM4D		✓	0.4
KIF19		✓	2.4
KLHL7		✓	0.9
LAMP5		✓	0.9
LRRC70		✓	0.8
LSMEM1	✓		5.7
LYG1	✓		4.2
LYRM9		✓	0.6
MED23		✓	1.3
MIA3	✓		1.8
MX1		✓	1.0
NAT6		✓	0.6
OSCP1		✓	2.8
P4HA1	✓		3.3
P4HA2	✓		3.0
PAIP1		✓	1.0
PDE4DIP	✓		6.8
PDIA4	✓		6.3
PDK1		✓	0.8
PDLIM4	✓		2.0
PEX6	✓		3.6
PHF14		✓	0.1
PLGLB1	✓		3.8
PRDM2	✓		2.7
PRKACB		✓	2.1
REP15	✓		4.7
RIMBP3C	✓		9.0
RSRP1	✓		11.9
SERPINB9		✓	0.3
SLC37A2		✓	1.6
SLC46A3		✓	1.2
SMIM7		✓	0.4
STON1-GTF2A1L	✓		3.5
THAP2	✓		5.4
THAP3	✓		6.2
TIMM23		✓	0.9
TLR1		✓	0.8
TMEM129		✓	0.5

Nom du gène	Sur-expression en <i>microarray</i>	Sous-expression en <i>microarray</i>	TI obtenu en TLDA (40°C vs 37°C)
TMEM99	✓		2.0
TXNRD3		✓	0.3
TYMSOS		✓	0.6
UBE3B		✓	1.3
UBFD1	✓		2.1
USB1		✓	1.5
VMAC		✓	1.8
ZCCHC2	✓		2.4
ZNF397	✓		1.6

**TABLEAU 22 : LISTE DES 91 GÈNES DONT L'EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA**

Les cellules endothéliales ont été cultivées en condition statique pendant 24h puis soumises à 37°C ou à 40°C pendant 6h. Leurs expressions géniques ont été étudiées par TLDA et comparées avec celles obtenues en *microarray*.

L'expression des gènes a été considérée comme confirmée par TLDA lorsque le taux d'induction (TI) était supérieur ou égal à 2 (pour les gènes sur-exprimés en *microarray*) ou inférieur ou égal à 0,5 (pour les gènes sous-exprimés en *microarray*).

Les valeurs des taux d'induction sont représentatives d'une moyenne de 3 expériences.

Nom du gène	Sur-expression en <i>microarray</i>	Sous-expression en <i>microarray</i>	Expression inchangée en <i>microarray</i>	TI obtenu en statique (40°C vs 37°C)	TI obtenu en flux (40°C vs 37°C)
AHSA1	✓			1.8	3.5
BAX		✓		0.9	0.9
CBX3	✓			1.2	1.0
EIF4A2	✓			3.3	7.0
FKBP4	✓			4.0	10.4
HERC4	✓			1.0	1.1
HSF1			✓	1.6	1.2
HSP90AA1	✓			2.7	8.2
HSPA1A	✓			8.7	18.8
HSPA1B	✓			5.1	9.0
HSPH1	✓			3.3	7.2
IL7R	✓			2.5	45,7
STIP1	✓			2.7	9.7
ATP2A2	✓			1.3	8.7
DDIT3	✓			1.5	3.3
DNAJB9	✓			1.5	2.9
ERN1			✓	1.4	2.8
HSP90B1	✓			3.6	3.3
HSPA5	✓			3.8	3.4
SDF2L1	✓			2.0	2.7
APLN		✓		0.3	0.2
BDKRB2		✓		0.7	0.7
FLT4		✓		1.2	7.3
GPSM1		✓		0.8	1.0
CACYBP	✓			1.6	6.6
CORO1A	✓			1.3	11.7
IDI1	✓			1.1	2.7
P4HA1	✓			3.1	2.3
PDK1		✓		0.7	9.2
STARD4	✓			1.1	4.6
TES	✓			1.2	1.0
CCL2		✓		0.6	0.3
SELE		✓		0.6	0.2
SELPLG	✓			7.4	162,5
F2RL2		✓		0.4	0.3
BAD		✓		0.8	0.8
CIRBP		✓		0.4	0.3
HIST1H2BK			✓	1.5	2.0
HSPA4L	✓			2.4	2.4
KDM5B			✓	1.2	1.2
KLF2			✓	1.3	7.3
PRKACB		✓		1.2	2.1

**TABLEAU 23** : PANEL DES 42 GÈNES DE RÉFÉRENCE DONT L'EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA EN CONDITION STATIQUE ET EN CONDITION DE FLUX LAMINAIRE.

Les cellules endothéliales ont été cultivées en condition statique ou en condition de flux laminaire (10 dyn.cm<sup>2</sup>) pendant 24h puis soumises à 37°C ou à 40°C pendant 6h. Leurs expressions géniques ont été étudiées par TLDA et comparées avec celles obtenues en *microarray*.

L'expression des gènes a été considérée comme confirmée par TLDA (en statique comme en flux) lorsque le taux

*d'induction (TI) obtenu était supérieur ou égal à 2 (pour les gènes sur-exprimés en microarray), inférieur ou égal à 0,5 (pour les gènes sous-exprimés en microarray) ou compris entre 0,6 et 1,9 (pour les gènes dont l'expression reste inchangée en microarray).*

*Les valeurs des taux d'induction sont représentatives d'une moyenne de 3 expériences.*

Nom du gène	Gène modulé par le flux à 37°C	TI obtenu à 37°C (Flux vs Statique)	TI obtenu en statique (40°C vs 37°C)	TI obtenu en flux (40°C vs 37°C)
EDN1	✓	0.4	0.8	1.3
EDNRA	X	1.3	0.6	0.5
EDNRB	✓	3.7	1.2	1.1
NOS3	X	1.2	2.4	0.9
ANGPT2	✓	0.3	0.6	0.7
ENG	X	0.9	1.1	0.8
PGF	X	0.7	1.2	1.4
TGFB1	X	0.8	1.1	0.9
PTGS2	✓	2.4	0.4	1.0
CXCR4	✓	5.6	0.3	2.7
ICAM1	✓	0.3	0.5	0.7
IL1RL1	✓	0.4	1.2	0.7
SELE	✓	0.3	2.3	0.4
VCAM1	✓	3.5	0.4	0.4
NDRG1	✓	2.7	1.4	1.6
NQO1	✓	2.2	2.2	0.9
PPP1R15A	✓	0.5	1.1	0.8
SOD1	X	1.8	1.7	1.7
SERPINE1	X	1.7	0.7	1.1
SERPINE2	✓	6.3	0.9	0.9
THBD	✓	2.0	0.7	1.1
BMP6	✓	0.3	1.0	0.8
CCNB1	✓	0.4	1.1	1.0
HEY2	✓	2.1	1.0	0.8
ID3	✓	0.1	1.6	1.1
JAG2	✓	0.4	1.7	1.0
MMP2	✓	2.6	0.9	0.9
SNAI1	X	0.8	1.5	1.3

**TABLEAU 24 : LISTE DES GÈNES THÉORIQUÉMENT MODULÉS PAR LES FORCES DE CISAILLEMENT ET DONT L'EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA.**

Les cellules endothéliales ont été cultivées en condition statique ou en condition de flux laminaire (10 dyn.cm<sup>2</sup>) pendant 24h puis soumises à 37°C ou à 40°C pendant 6h. Leurs expressions géniques ont été étudiées par TLDA.

Les gènes ont été considérés comme modulés par le flux lorsque le taux d'induction (TI) obtenu était supérieur ou égal à 2 ou inférieur ou égal à 0,5. ✓ : gène modulé par le flux, X : gène non modulé par le flux.

L'expression des gènes a été considérée comme modulée à 40°C (en statique comme en flux) lorsque le taux d'induction obtenu était supérieur ou égal à 2 ou inférieur ou égal à 0,5.

Les valeurs des taux d'induction sont représentatives d'une moyenne de 3 expériences.

Nom du gène	TI obtenu en statique 40°C vs 37°C (HCAEC)	TI obtenu en statique 40°C vs 37°C (Telo-HAEC)
AHSA1	1.8	2.9
EIF4A2	3.3	6.4
FKBP4	4.0	6.4
HSF1	1.6	1.8
HSP90AA1	2.7	6.6
HSPA1A	8.7	8.4
HSPA1B	5.1	4.6
HSPH1	3.3	4.0
IL7R	2.5	1.4
STIP1	2.7	2.3
DNAJB9	1.5	1.1
ERN1	1.4	1.8
HSP90B1	3.6	3.0
HSPA5	3.8	4.3
SDF2L1	2.0	2.6
APLN	0.3	0.6
BDKRB2	0.7	0.1
CACYBP	1.6	2.3
CORO1A	1.3	2.1
P4HA1	3.1	1.8
CCL2	0.6	0.7
SELE	0.6	0.5
SELPLG	7.4	2.6
F2RL2	0.4	0.7
CIRBP	0.4	0.4
HSPA4L	2.4	3.8

**TABLEAU 25 : PANEL DE RÉFÉRENCE DONT L'EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA DANS LES TELO-HAEC EN CONDITION STATIQUE.**

*Les Telo-HAEC ont été cultivées en condition statique pendant 24h puis soumises à 37°C ou à 40°C pendant 6h. Leurs expressions géniques ont été étudiées par TLDA et comparées avec celles des HCAEC cultivées dans les mêmes conditions.*

*L'expression des gènes a été considérée comme confirmée par TLDA lorsque le taux d'induction (TI) obtenu était supérieur ou égal à 2 (pour les gènes sur-exprimés en microarray), inférieur ou égal à 0,5 (pour les gènes sous-exprimés en microarray) ou compris entre 0,6 et 1,9 (pour les gènes dont l'expression reste inchangée en microarray).*

*Les valeurs des taux d'induction sont représentatives d'une moyenne de 4 expériences.*

Nom du gène	TI obtenu en statique 40°C vs 37°C (Telo-HAEC)	TI obtenu avec la rapamycine à 37°C (vs 37°C sans traitement)	TI obtenu avec la rapamycine à 40°C (vs 40°C sans traitement)
AHSA1	3.3	0.8	0.6
EIF4A2	2.5	1.0	1.9
FKBP4	4.2	0.8	0.6
HSF1	2.2	1.4	0.7
HSP90AA1	6.0	0.7	1.4
HSPA1A	11.2	0.8	0.4
HSPA1B	5.0	0.5	0.5
HSPH1	4.1	0.7	0.4
IL7R	2.9	0.7	0.5
STIP1	2.3	0.7	0.4
DNAJB9	2.3	1.0	0.6
ERN1	1.4	1.2	1.7
HSP90B1	3.7	1.7	1.0
HSPA5	4.5	0.6	0.6
SDF2L1	3.5	0.7	0.6
APLN	0.4	0.6	0.9
BDKRB2	0.3	1.9	1.5
CACYBP	3.0	0.6	0.5
CORO1A	1.9	0.4	0.3
P4HA1	4.8	0.7	0.4
CCL2	1.1	0.8	0.5
SELE	0.6	0.7	0.9
SELPLG	2.9	1.1	1.0
F2RL2	0.9	0.8	0.7
CIRBP	0.5	1.0	1.5
HSPA4L	2.4	1.2	0.8

**TABLEAU 26 : PANEL DE RÉFÉRENCE DONT L'EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA EN PRÉSENCE DE RAPAMYCINE ET EN CONDITION STATIQUE.**

Les Telo-HAEC ont été cultivées en condition statique pendant 24h puis soumises à 37°C ou à 40°C pendant 6h en présence de rapamycine (20 nM). Leurs expressions géniques ont été étudiées par TLDA et comparées avec celles des Telo-HAEC cultivées dans les mêmes conditions mais sans traitement à la rapamycine.

L'expression des gènes a été considérée comme confirmée par TLDA lorsque le taux d'induction (TI) obtenu était supérieur ou égal à 2 (pour les gènes sur-exprimés en microarray), inférieur ou égal à 0,5 (pour les gènes sous-exprimés en microarray) ou compris entre 0,6 et 1,9 (pour les gènes dont l'expression reste inchangée en microarray).

L'expression des gènes a été considérée comme modulée par la rapamycine (à 37°C comme à 40°C) lorsque le taux d'induction (TI) était soit supérieur ou égal à 2, soit inférieur ou égal à 0,5.

Les valeurs des taux d'induction sont représentatives d'une moyenne de 4 expériences.

Nom du gène	TI obtenu en statique 40°C vs 37°C (HCAEC)	TI obtenu avec le B-I09 à 37°C (vs 37°C sans traitement)	TI obtenu avec le B-I09 à 40°C (vs 40°C sans traitement)
AHSA1	1.4	0.8	1.2
EIF4A2	2.0	0.9	0.9
FKBP4	2.6	0.9	1.1
HSF1	1.1	0.8	1.1
HSP90AA1	2.7	1.1	1.0
HSPA1A	11.1	1.1	1.2
HSPA1B	2.2	1.0	1.1
HSPH1	2.2	0.8	1.4
IL7R	1.9	0.7	1.2
STIP1	1.5	1.0	1.2
DNAJB9	1.8	0.5	0.5
ERN1	0.7	0.7	1.1
HSP90B1	3.6	0.8	0.9
HSPA5	3.9	0.8	1.2
SDF2L1	1.9	0.7	0.9
APLN	0.5	0.8	1.1
BDKRB2	0.4	0.9	0.9
CACYBP	1.3	0.8	1.3
CORO1A	1.8	0.9	1.2
P4HA1	2.8	0.9	1.0
CCL2	0.2	1.0	1.1
SELE	0.2	1.1	1.7
SELPLG	1.5	1.1	1.4
F2RL2	0.4	0.9	0.9
CIRBP	0.3	0.9	0.9
HSPA4L	1.4	1.0	1.2

**TABLEAU 27** : PANEL DE RÉFÉRENCE DONT L'EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA EN PRÉSENCE DE B-I09 ET EN CONDITION STATIQUE.

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique pendant 24h puis soumises à 37°C ou à 40°C pendant 6h en présence de B-I09 (20 µM). Leurs expressions géniques ont été étudiées par TLDA et comparées avec celles des HCAEC cultivées dans les mêmes conditions mais sans traitement au B-I09.

L'expression des gènes a été considérée comme confirmée par TLDA lorsque le taux d'induction (TI) obtenu était supérieur ou égal à 2 (pour les gènes sur-exprimés en microarray), inférieur ou égal à 0,5 (pour les gènes sous-exprimés en microarray) ou compris entre 0,6 et 1,9 (pour les gènes dont l'expression reste inchangée en microarray).

L'expression des gènes a été considérée comme modulée par le B-I09 (à 37°C comme à 40°C) lorsque le taux d'induction (TI) était soit supérieur ou égal à 2, soit inférieur ou égal à 0,5.

Les valeurs des taux d'induction sont représentatives d'une moyenne de 3 expériences.



Nom du gène	TI obtenu en statique 40°C vs 37°C (HCAEC)	Gènes modulés par la rapamycine seule	Gènes modulés par le B-109 seul	TI obtenu avec les deux inhibiteurs à 37°C (vs 37°C sans traitement)	TI obtenu avec les deux inhibiteurs à 40°C (vs 40°C sans traitement)
AHSA1	2.5			0.7	0.8
EIF4A2	2.6			1.2	1.3
FKBP4	4.8			0.8	0.8
HSF1	1.1			1.1	1.4
HSP90AA1	3.6			0.8	0.8
HSPA1A	27.6	✓		0.6	0.3
HSPA1B	7.9			0.5	0.5
HSPH1	4.0	✓		0.6	0.7
IL7R	4.5	✓		0.6	0.5
STIP1	2.5			0.8	1.0
DNAJB9	2.8		✓	0.8	0.7
ERN1	1.2			1.3	1.6
HSP90B1	4.0			0.8	1.0
HSPA5	5.6			0.7	1.0
SDF2L1	3.0			0.7	0.7
APLN	0.4			0.6	0.9
BDKRB2	0.3			3.1	3.7
CACYBP	1.4	✓		1.0	1.5
CORO1A	2.4	✓		0.7	0.5
P4HA1	3.5			1.3	1.1
CCL2	0.5			1.4	1.4
SELE	0.6			2.0	2.2
SELPLG	3.3			1.8	1.4
F2RL2	0.6			1.2	1.4
CIRBP	0.4			1.4	1.7
HSPA4L	3.1	✓		0.9	0.7

**TABLEAU 28 : PANEL DE RÉFÉRENCE DONT L'EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA EN PRÉSENCE DE RAPAMYCINE ET DE B-109 EN CONDITION STATIQUE.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique pendant 24h puis soumises à 37°C ou à 40°C pendant 6h en présence de rapamycine seule (20 nM), de B-109 seul (20 µM) ou d'un mélange des deux inhibiteurs (rapamycine 20 nM + B-109 20 µM). Leurs expressions géniques ont été étudiées par TLDA et comparées avec celles des HCAEC cultivées dans les mêmes conditions mais sans traitement.

L'expression des gènes a été considérée comme confirmée par TLDA lorsque le taux d'induction (TI) obtenu était supérieur ou égal à 2 (pour les gènes sur-exprimés en microarray), inférieur ou égal à 0,5 (pour les gènes sous-exprimés en microarray) ou compris entre 0,6 et 1,9 (pour les gènes dont l'expression reste inchangée en microarray).

L'expression des gènes a été considérée comme modulée par la rapamycine seule, le B-109 seul ou le mélange des deux inhibiteurs (à 37°C comme à 40°C) lorsque le taux d'induction (TI) était soit supérieur ou égal à 2, soit inférieur ou égal à 0,5.

Les valeurs des taux d'induction sont représentatives d'une moyenne de 2 expériences.

Nom du gène	TI obtenu en statique 40°C vs 37°C (HCAEC)	TI obtenu avec l'ADMA à 37°C (vs 37°C sans traitement)	TI obtenu avec l'ADMA à 40°C (vs 40°C sans traitement)
AHSA1	2.5	0.8	0.9
EIF4A2	2.6	0.9	1.3
FKBP4	4.8	1.0	1.0
HSF1	1.1	1.1	1.3
HSP90AA1	3.6	0.9	0.9
HSPA1A	27.6	0.9	1.0
HSPA1B	7.9	0.9	0.9
HSPH1	4.1	0.9	0.8
IL7R	4.5	0.8	0.7
STIP1	2.5	1.0	1.1
DNAJB9	2.8	1.0	0.9
ERN1	1.2	1.0	1.1
HSP90B1	4.0	0.9	1.3
HSPA5	5.6	1.0	1.1
SDF2L1	3.0	1.0	1.1
APLN	0.4	0.9	1.1
BDKRB2	0.3	1.4	3.1
CACYBP	1.4	1.4	1.7
CORO1A	2.4	1.0	1.3
P4HA1	3.5	1.2	1.1
CCL2	0.5	0.9	1.1
SELE	0.6	0.9	0.9
SELPLG	3.3	1.0	0.9
F2RL2	0.6	1.0	1.1
CIRBP	0.4	1.2	1.2
HSPA4L	3.1	1.2	1.1

**TABLEAU 29** : PANEL DE RÉFÉRENCE DONT L'EXPRESSION A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR TLDA EN PRÉSENCE D'ADMA EN CONDITION STATIQUE.

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique pendant 24h puis soumises à 37°C ou à 40°C pendant 6h en présence d'ADMA (1 mM). Leurs expressions géniques ont été étudiées par TLDA et comparées avec celles des HCAEC cultivées dans les mêmes conditions mais sans traitement.

L'expression des gènes a été considérée comme confirmée par TLDA lorsque le taux d'induction (TI) obtenu était supérieur ou égal à 2 (pour les gènes sur-exprimés en microarray), inférieur ou égal à 0,5 (pour les gènes sous-exprimés en microarray) ou compris entre 0,6 et 1,9 (pour les gènes dont l'expression reste inchangée en microarray).

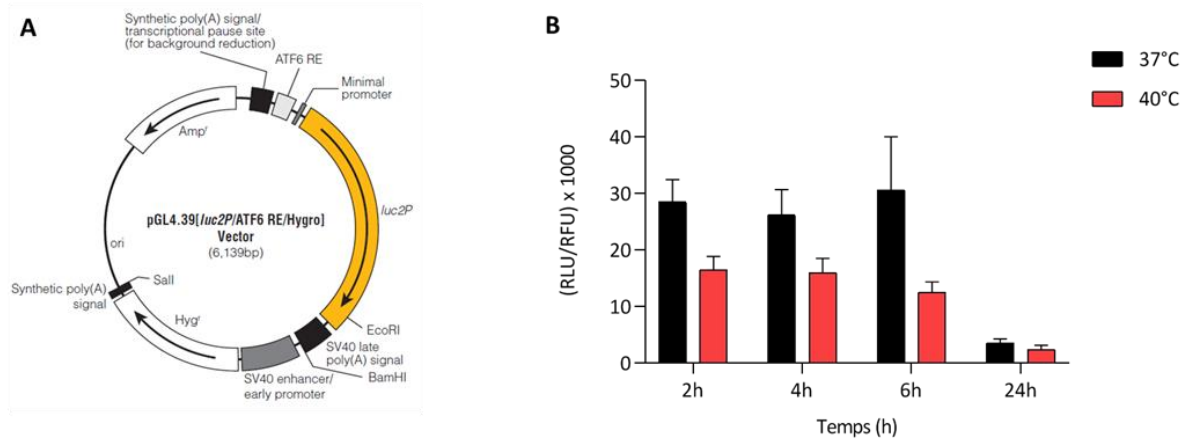
L'expression des gènes a été considérée comme modulée par l'ADMA (à 37°C comme à 40°C) lorsque le taux d'induction (TI) était soit supérieur ou égal à 2, soit inférieur ou égal à 0,5.

Les valeurs des taux d'induction sont représentatives d'une moyenne de 2 expériences.

Nom du gène	Taux d'induction obtenu après 6h (40°C vs 37°C)	Taux d'induction obtenu après 12h (40°C vs 37°C)	Taux d'induction obtenu après 24h (40°C vs 37°C)
HIST1H4H	1.89	8.15	22.02
HIST1H2BK	1.82	4.84	11.06
HIST1H2BM	1.21	2.89	5.23
HIST1H2BI	1.21	2.94	4.93
HIST1H2BG	1.07	2.19	3.61
HIST1H2BD	1.18	2.83	4.29
HIST1H2BL	1.13	2.12	3.27
HIST1H2BC	1.02	2.22	3.63
HIST1H2BH	1.13	2.24	3.25
HIST1H2AC	8.34	30.94	11.43
HIST1H1A	-1.18	-2.09	-4.23
HIST1H1B	-1.60	-2.72	-4.09
HIST1H2AG	-1.85	-2.05	-3.86
HIST1H2BE	-1.51	-2.19	-2.61
HIST2H3A	-1.91	-2.31	-4.03

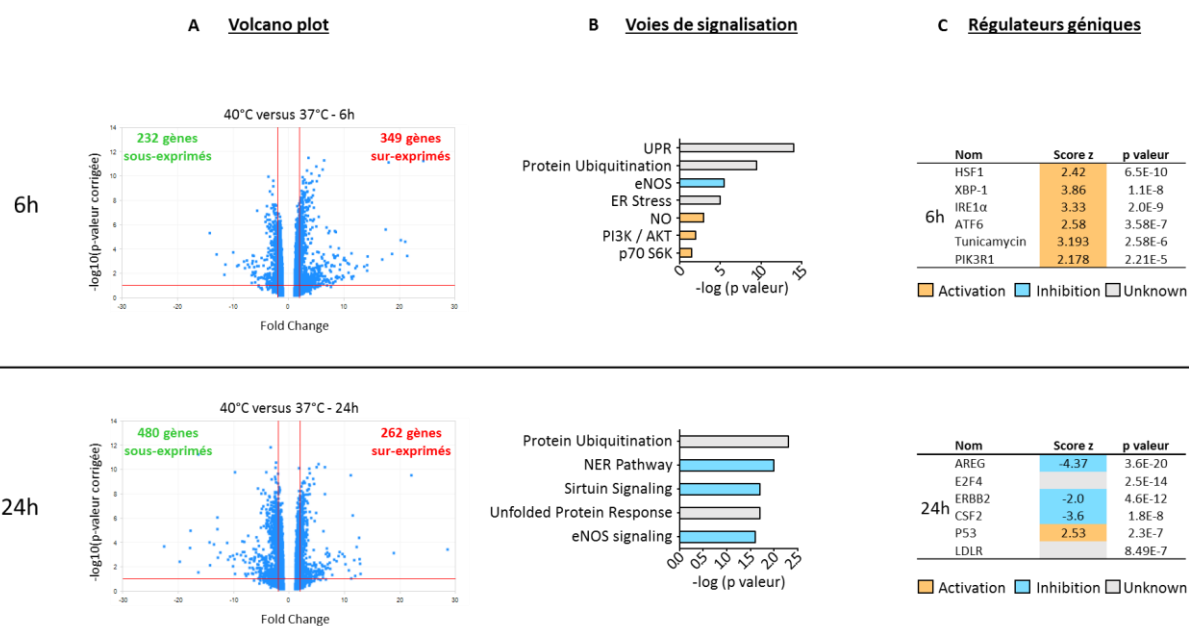
**TABLEAU 30 : TAUX D'INDUCTION DES DIFFÉRENTES HISTONES À 40°C.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique pendant 6h, 12h ou 24h à 40°C. Leurs expressions géniques ont été comparées avec celles des HCAEC cultivées dans les mêmes conditions à 37°C. En orange, l'expression des gènes est augmentée, en vert, elle est diminuée. Ces valeurs sont issues de l'analyse de microarray.



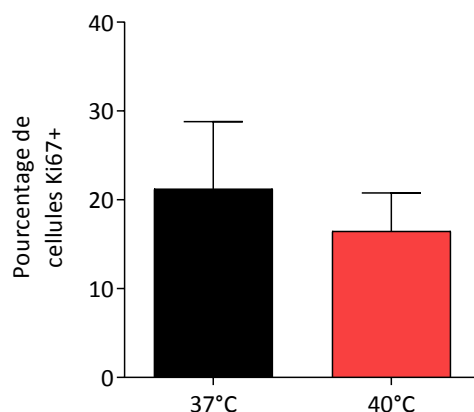
**FIGURE 72** : LE PROMOTEUR ENRICHÉ EN ÉLÉMENTS DE RÉPONSE ERSE N'EST PAS ACTIVÉ EN RÉPONSE À UNE AUGMENTATION DE LA TEMPÉRATURE.

Les Telo-HAEC ont été transfectées avec les plasmides pGL4.39 (A) et pmaxGFP puis cultivées en condition statique à 37°C ou à 40°C pendant 2h, 4h, 6h ou 24h. Après chaque temps d'incubation, l'intensité de fluorescence de la GFP a été mesurée afin d'évaluer la qualité de la transfection. Les cellules ont ensuite été lysées et de la luciférine (125  $\mu$ M) a été ajoutée avant mesure de la luminescence. Un ratio luminescence/fluorescence a été effectué afin d'obtenir une valeur traduisant de façon proportionnelle l'activité de HSF1 (B). Plus ce ratio augmente et plus l'activité est élevée et inversement. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 4 expériences +/- SEM.



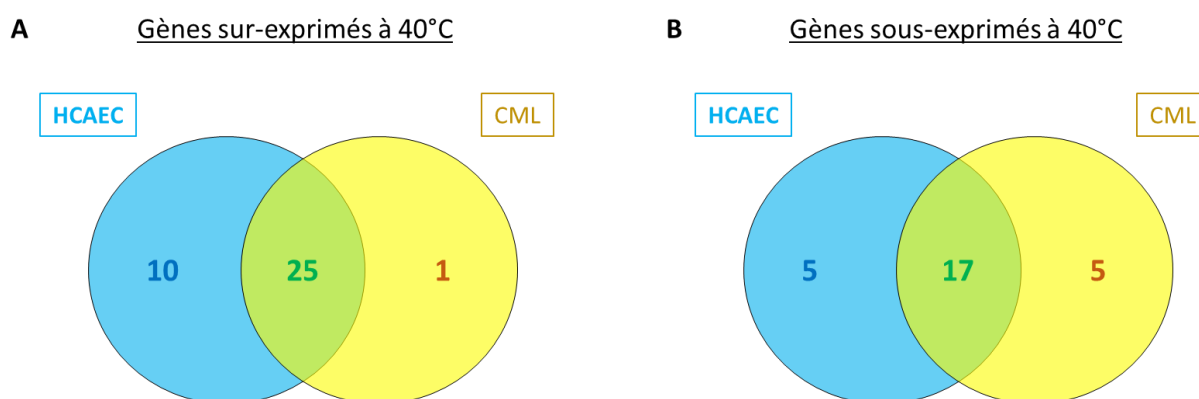
**FIGURE 73 : VOLCANO PLOT, VOIES DE SIGNALISATION ET RÉGULATEURS GÉNÉTIQUES MIS EN ÉVIDENCE PAR LE LOGICIEL IPA APRÈS 6H OU 24H À 40°C.**

Les HCAEC ont été cultivées à 37°C ou à 40°C pendant 6h ou 24h. **(A)** Chaque volcano plot est issu d'une analyse statistique ANOVA, réalisée avec le logiciel ArrayStudio®. Ces analyses ont été réalisées en comparant les échantillons soumis à 40°C avec ceux soumis à 37°C pendant 6h ou 24h, en définissant des taux d'induction  $\geq 2$  ou  $\leq -2$  et une p-valeur corrigée  $\leq 0,05$ . Les gènes différentiellement exprimés après 6h ou 24h à 40°C ont été intégrés dans le logiciel IPA, permettant de mettre en évidence **(B)** des voies de signalisation ou **(C)** des régulateurs génétiques possiblement impliqués dans la réponse cellulaire mise en place après 6h ou 24h à 40°C.



**FIGURE 74 : LA TEMPÉRATURE N'A PAS D'EFFET SUR LA PROLIFÉRATION DES HCAEC.**

Les HCAEC ont été cultivées en condition statique à 37°C puis une blessure a été créée au milieu du tapis cellulaire. Les cellules ont ensuite été placées à 37°C ou à 40°C pendant 24h puis elles ont été fixées et marquées avec un anticorps dirigé la protéine nucléaire Ki67. Les résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences +/- SEM.



**FIGURE 75 : DIAGRAMME DE VENN REGROUPANT LES GÈNES SUR-EXPRIMÉS À 40°C DANS LES CML ET LES HCAEC.**

Le diagramme de Venn a été généré grâce au site Internet « Bioinformatics & Evolutionary Genomics » (BEG). C'est une représentation permettant d'établir des relations entre différents groupes. Ici, les cercles bleus représentent les gènes sur-exprimés (A) ou sous-exprimés (B) après 6h à 40°C chez les HCAEC et les cercles jaunes représentent les gènes sur-exprimés (A) ou sous-exprimés (B) après 6h à 40°C chez les CML. Les régions où les cercles se chevauchent représentent les gènes communs aux deux types cellulaires. Ces résultats ont été obtenus sur une moyenne de 3 expériences (HCAEC) et 1 expérience (CML).

## ANNEXE III

---

**Title** : Adaptation of endothelial cells to moderate hyperthermia involves mTORC1 and HSF1 cytosolic pathways and an ERN1 UPR response.

**One sentence summary** : Adaptation of endothelial cells to moderate hyperthermia

**Authors** : Julie Vorbe<sup>1</sup>, Florence Massey<sup>1</sup>, Laetitia Ledein<sup>1</sup>, Corinne Rocher<sup>1</sup>, Galina Boldina<sup>1</sup>, Philip Janiak<sup>1</sup>, Gregory Franck<sup>2†</sup>, Stéphane Illiano<sup>1§</sup>, Antonino Nicoletti<sup>2§</sup>

**Affiliations** :

<sup>1</sup> Department of Cardiovascular and Diabetes, Sanofi-Aventis R&D, Chilly-Mazarin, France.

<sup>2</sup> UMR 1148 Inserm-Paris 7 University, Xavier Bichat Hospital, 75018 Paris, France.

<sup>§</sup> These authors have equally contributed to this article.

<sup>†</sup> Corresponding author.

## **Abstract**

Temperature is an abiotic variable that regulates the functioning of life. While the vascular tree is instrumental in the distribution of heat throughout the whole body, the functional consequences of temperature changes on vascular cells remains largely unexplored. We investigated the response developed by ECs to adapt to moderate hyperthermia (37°C-40°C).

Microarray transcriptomic profiles were obtained from Human Coronary Artery ECs (HCAECs) cultured at 37°C or 40°C during 6h. The expression of thermosensitive genes was confirmed by RT-qPCR in cells grown under static and laminar flow conditions. Key signaling pathways and upstream regulators predicted for each temperature were identified using ingenuity pathway analysis and confirmed at the protein level using mechanistic approaches including reporter assays and inhibitors. Under both static and laminar flow conditions, HCAECs set up a heat shock response involving HSF1 pathway and upregulation of HSPs. Moderate hyperthermia also activated the unfolded protein response (UPR), with IRE1alpha activation leading to XBP1 splicing, synthesis and increase of specific genes. Unexpected adaptation activation of mTORC1 pathway was also observed as confirmed with rapamycin (mTORC1-specific inhibitor) which partially reversed the effect of temperature. Beyond activation of classical adaptative pathways such as HSF1, HCAECs subjected to moderate hyperthermia, switch on additional signaling pathway (UPR and mTORC1) and activate specific genes that might collectively protect ECs under stress conditions. This study unravels the mechanism through which the endothelium detects and reacts to intravascular temperature variations which may be involved during febrile hyperthermic episodes and/or at local inflammatory foci.



## **Introduction**

Temperature is a physical parameter essential to life. Temperature determines the rates of all biological and chemical reactions. It deeply affects biochemical reactions catalyzed by enzymes, by modulating equilibrium and catalytic constants<sup>1</sup>. In humans, natural physiological temperature changes are observed in day-night (36 - 37.5°C)<sup>2</sup>, menstrual (+ 0.5°C after the ovulation)<sup>3</sup> and seasonal temperature cycles, as well as during febrile episodes (38 - 41°C). Temperature also varies between peripheral tissues (33 - 35°C)<sup>4</sup> and core body temperature (37°C)<sup>5</sup>. Heat is distributed quickly and efficiently to the whole organism through the circulation. While vascular reactivity is instrumental in the distribution of heat throughout the whole body, the functional consequences of temperature changes on vascular cells, especially endothelial cells (ECs) which are directly confronted with thermal heterogeneity, remains largely unexplored. Fever-range temperatures promote both innate and adaptative immunity<sup>6</sup> and could impact the efficiency of immune cell recruitment by ECs<sup>6,7</sup>. However, the few studies investigating heat shock response of ECs were focused on the impact of temperatures far above physiological ranges, in the context of tumor hyperthermia therapy<sup>8</sup> or retinal laser treatment<sup>9</sup>.

In this study and for the first time, we decided to explore the adaptation systems set up by human primary vascular endothelial cells (HCAECs) in response to moderate hyperthermia (40°C). To match as close as possible to physiological conditions, experiments were performed in static and under flow conditions. The transcriptomic modulation induced by thermal variations was analyzed and several signaling pathways were identified and their functional relevance tested.

## **Results**

### ***Hyperthermia has a major impact on the transcriptome of human primary ECs***

To understand the effect of a moderate temperature elevation, HCAECs were cultured at 37°C or 40°C during 6h and their transcriptome was analyzed using microarrays. 581 genes were differentially expressed between 37°C and 40°C (volcano plot, Fig. 1A). 232 genes were up-regulated while 349 genes were down-regulated. Unsupervised hierarchical clustering analysis was applied to the dataset of 581 genes in order to group genes with similar expression patterns. The identified clusters corresponded to the temperature treatment (Fig. 1B) and indicated that HCAECs cultured at 40°C have a clearly distinct expression profile from those cultured at 37°C.

### ***Cytosolic signaling pathways triggered by moderate hyperthermia***

A bioinformatic analysis (IPA software) was used to determine which signaling pathways could be involved in the EC response to moderate change in temperature. Many genes induced by moderate hyperthermia belong to the Heat Shock Protein (HSP) family and to the HSF1 pathway (Fig. 2A). Upregulation of these genes, including HSPA1A and HSP90AA1 (Fig. 2B) was confirmed by TLDA (table S1) and also by immunostaining (Fig. 2C and Fig. 2D).

The microarray analysis revealed that besides gene encoding HSPs, a significant number of additional genes were modulated by temperature elevation. In response to moderate hyperthermia, two signaling pathways and of one upstream factor were predicted to be activated in ECs, in addition to HSF1 (Fig. 3 and table S2). The UPR pathway (Fig. 3A) belongs to the endoplasmic reticulum (ER) stress response and represents a sophisticated signaling network controlled by three sensor proteins that monitor the folding state of proteins in the lumen of the endoplasmic reticulum: Serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease (IRE1), RNA-dependent protein kinase (PRK) -like ER kinase (PERK) and activation of transcription factor

6 (ATF6). IRE1 protein (also called “ERN1” when refers to the gene) was one of the upstream regulators identified by IPA (Fig. 3B).

The mTORC1 pathway was also identified IPA analysis (Fig. 3C) This cytosolic pathway is involved in the cell morphological growth and it is known to interact with many cellular factors, including HSF1.

### **EC adaptation to moderate hyperthermia is exacerbated under flow condition**

Since ECs are physiologically subjected to flow-induced shear stress that can modulate a variety of cellular functions, we had to determine whether the observations that had been made under static condition were still valid under flow conditions (Fig. 4A and Fig. 4B). Before that, we validated our flow conditions by studying the expression of genes modulated by flow<sup>10,11</sup>. As expected, this specific set of genes was modulated when cells were grown in an IBIDI system under laminar flow (vs static conditions) but was not modulated by temperature (table S3). Interestingly, our thermosensitive gene panel selected from the microarray data was modulated (up- or down-regulated) in a similar manner under flow and static conditions at 40°C versus 37°C, but differences were amplified under flow conditions (Fig. 4A and Fig. 4B, white vs black bars). Besides the fact that these RT-qPCR data confirmed the validity of the microarray approach, they highlighted the similarity of cell reactivity to temperature under static or flow conditions. Hence, to overcome the technical limitations inherent to cell cultures under flow conditions, we continued to explore the endothelial response to moderate hyperthermia under static conditions for the rest of our study.

### **Functional confirmation of HSF1, mTORC1, and IRE1 activation by moderate hyperthermia**

HSF1 is a transcription factor activated by post-translational modifications. When activated, HSF1 is able to translocate to the nucleus where it binds promoters containing HSE sequences

and triggers the transcription of its target genes<sup>12</sup>. In hyperthermic conditions, HSF1 undergoes a series of activating phosphorylating events including phosphorylation on Ser326<sup>13,14</sup>. In HCAECs, HSF1 was transiently activated in response to moderate hyperthermia since its phosphorylation on Ser326 peaked after two hours (Fig. 5A and Fig. 5B). To confirm the capacity of HSF1 to trigger a transcriptional response, ECs were transfected with a reporter plasmid where the luciferase gene is placed under the control of a promoter comprising repeated HSE sequences. The luciferase activity was measured at 2, 4 and 6 hours. It remained at a steady level at 37°C but increased continuously over 6 hours at 40°C (Fig. 5C). This result, together with additional RT-qPCR data obtained on the expression of genes displaying HSE sequences in their promoter (fig. S1), confirms HSF1 activation in response to moderate hyperthermia.

Since mTORC1 emerged from the bioinformatic analysis of our dataset, we investigated mTORC1 involvement in endothelial response to temperature elevation and its link with HSF1. Threonine 389 phosphorylation of p70-S6 kinase, a direct substrate of mTORC1<sup>15</sup>, was used as an index of mTORC activation. After exposition to moderate hyperthermia (40°C), a transient phosphorylation of p70-S6 kinase with a peak at 30 min was observed (Fig. 6A and Fig. 6B), suggesting an early activation of mTORC1. Some of the genes placed downstream of HSF1 were also inhibited by rapamycin, a selective inhibitor of mTORC1 (Fig. 6C), revealing a link between mTORC1 and the activation of HSF1 following moderate hyperthermia.

The UPR signaling pathway involving the IRE1 upstream regulator was another pathway identified in microarray in the response of ECs to moderate hyperthermia. IRE1 is a transmembrane protein in the endoplasmic reticulum. Its endoribonuclease activity is involved in the cytosolic splicing of the XBP1 transcripts<sup>16,17</sup>. The unspliced XBP1 mRNA is composed of 5 exons. Its cytosolic editing by IRE1 results in the splicing of a 26-base pair intron within exon 4, shifting the reading frame and altering the conformation and functionality of the final protein. The XBP1s protein resulting from the spliced transcript is able to translocate into the

nucleus and bind ERSE sequences to promote transcription of its target genes<sup>16</sup>. A transient increase of the spliced form of XBP1 between 1h and 3h and a return to baseline at 6h was measured by RT-qPCR after exposure to moderate hyperthermia (Fig. 7A). In contrast, the amount of unspliced XBP1 mRNA was not significantly modified in response to an increase in temperature (fig. S2). In parallel, the amount of the XBP1s protein resulting from the spliced XBP1 mRNA remained at 37°C while it increased at 1h and culminated at 3h before returning to basal level at 4h in cells exposed to 40°C (Fig. 7B and Fig. 7C). B-I09, an inhibitor of the IRE1 endoribonuclease activity<sup>18</sup>, fully prevented the splicing of XBP1 after 2h of incubation at 40°C, and as a consequence, the unspliced form was increased at 2h at 40°C (Fig. 7D). Many genes of the downstream UPR can be modulated by XBP1 but also by PERK and ATF6. However, the expression of DNAJB9 is specifically under the control of XBP1. As shown in Fig. 7E, the induction of DNAJB9 by moderate hyperthermia was fully abolished in B-I09-treated cells while the expression of other genes exhibiting ERSE sequences in their promoters was not affected (fig. S3), indicating that they may be controlled by other UPR factors. Taken together, these data demonstrate that the endoribonuclease activity of IRE1 is turned on following a moderate hyperthermia leading to the production and activation of the spliced form of XBP1.

## **Discussion**

One of the crucial functions of the vascular system is the regulation of heat distribution through vasodilation (heat dissipation) and vasoconstriction (heat preservation). Vessels therefore experience temperature fluctuations. This can be even more pronounced when fever is triggered at the scale of the organism or when a local thermogenesis accompanies an inflammatory response<sup>19,20</sup>. Thus, whether in physiological conditions or in pathological conditions, the temperature of the blood can vary by several degrees. ECs are critically positioned to sense temperature variations as they are in direct contact with the blood. Studies in this field of research are scarce and have been performed with heat shocks of large amplitudes and using only cell lines<sup>13,14,21–23</sup>. Herein, we used an experimental system with human primary arterial ECs subjected to moderate hyperthermic conditions. We have identified several signaling pathways that these cells utilize to adapt to physiologically relevant temperature variations and we have shown that the genes of these pathways were also induced in ECs under shear stress conditions.

We found that, in response to moderate hyperthermia, HCAECs upregulate many genes in particular HSPs. HSPs are molecular chaperones that ensure proteostasis by favoring proper folding/refolding of proteins, thereby protecting cells from hyperthermia-induced protein aggregation<sup>24</sup>. HSPs can interact with many proteins, notably with HSF1<sup>25,26</sup>, a major cytosolic regulator of transcriptional response to proteotoxic stress. HSPs also interact with IRE1<sup>27,28</sup>, an endoplasmic reticulum-specific factor. Our results show that HCAECs are able to trigger both cytosolic and endoplasmic-reticulum-specific signaling pathways in response to a moderate hyperthermia.

Indeed, we found that HCAECs were able to activate the heat shock response (HSR), involving the HSF1 factor. Many genes, carrying HSE sequences in their promoters, were upregulated at 40°C, suggesting that HSF1 is a key upstream regulator orchestrating the cell response to a moderate hyperthermia. Our results support a scenario where, in response to a moderate

hyperthermia of 6h, HSPs first dissociate from HSF1. Following this dissociation, HSF1 translocates to the nucleus and binds to element heat shock (HSE) on promoters of heat shock (HS) responsive genes, including HSPs (HSP40, HSP70 and HSP90). This may allow HCAECs to fight against protein aggregation by producing a sufficient pool of HSPs that can bind to and rescue misfolded proteins located in the cytosol.

In parallel, we observed that mild hyperthermia was accompanied by an early activation of mTORC1. This observation is in agreement with previous studies reporting early increase of Thr389 phosphorylation of mTORC1 at 43°C in HeLa cells<sup>14</sup> and *in vivo*, in the soleus and plantaris muscles of rats exposed for 30 minutes at 41°C<sup>22</sup>. HSF1 can be phosphorylated by MAPK p38<sup>29</sup>, MAPK MEK<sup>30</sup> or mTORC1<sup>14</sup>. We have tried to measure Ser326 phosphorylation on HSF1 as a hallmark of mTORC1 activation, but inconsistent results did not allow us to draw a conclusion. However, we found that inhibiting mTORC1 with rapamycin could inhibit the expression of several genes containing HSE sequences in their promoters. These results suggest that mTORC1 and HSF1 are connected in primary ECs exposed to moderate hyperthermia. While additional factors responsible for the activation of HSF1 remain to be identified, our results point at mTORC1 as an important regulator of the transcriptional activity of HSF1 under moderate hyperthermia.

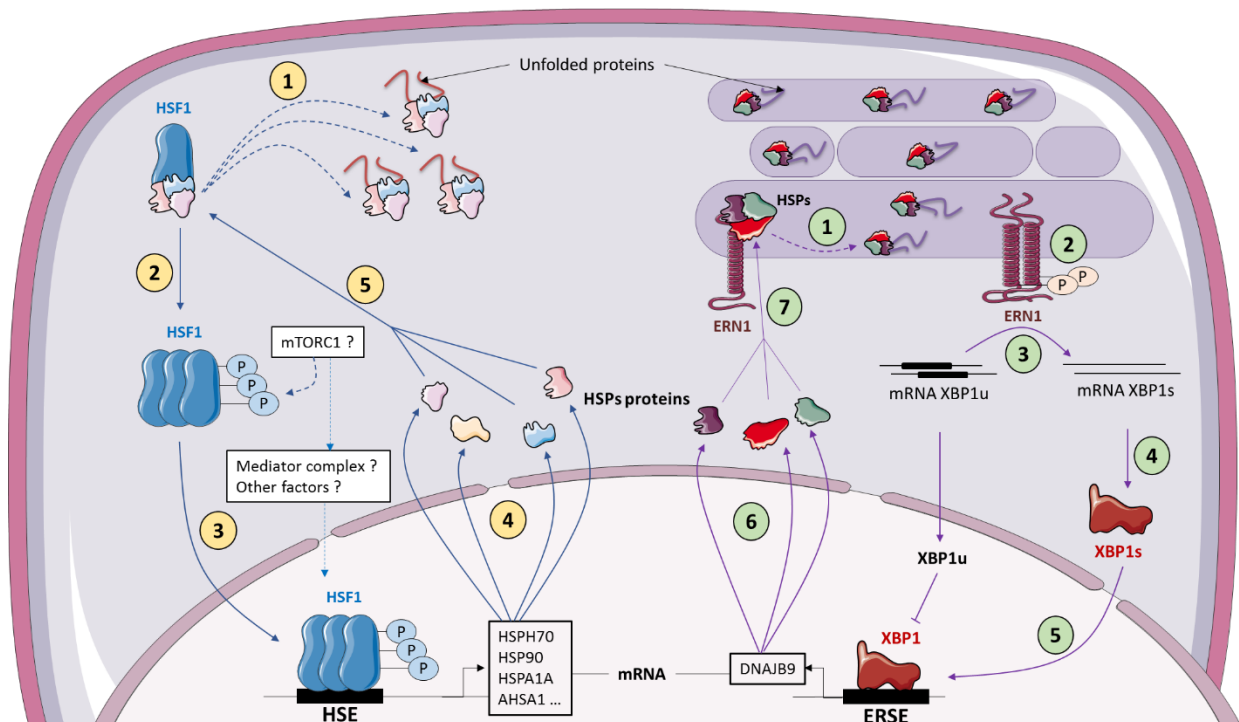
Besides the cytosolic pathways, we also found that the UPR pathway is activated by moderate hyperthermia in HCAECs. Activation of UPR likely protects cells against defects in protein folding in the endoplasmic reticulum (ER), which consists in three sub-pathways involving IRE1, ATF6 and/or PERK<sup>31</sup>. We have shown that the IRE1 is activated at 40°C. Activated IRE1 catalyzes the excision of a 26-nucleotide unconventional intron from ubiquitously expressed XBP1u mRNA resulting in the translation of XBP1s isoform. We showed that IRE1 achieves a transient XBP1 splicing at 40°C, resulting in an increased level of XBP1s protein. To follow more specifically XBP1s transcriptional activation, we decided to focus on DNAJB9<sup>32</sup>.

DNAJB9 is one of seven endoplasmic reticulum-resident DNAJ-like cochaperones involved in the ERAD system<sup>33</sup> but also in many other EC functions. DNAJB9 protein was originally identified following its upregulation during *in vitro* angiogenesis<sup>34,35</sup>. Its expression is increased in response to inflammatory stimuli and DNAJB9 is able to modulate the pro-inflammatory response of ECs by regulating IL-8 secretion during TNF<sup>36</sup>. Both pro-inflammatory EC activation and angiogenesis are mechanisms dependent on proteins that traffic through the endoplasmic reticulum. When an endoplasmic reticulum stress occurs, DNAJB9 is upregulated<sup>37,38</sup>, suppressing cell death<sup>37</sup> and its expression reflects different functional states of ECs<sup>35</sup>. In this study, we showed that a moderate hyperthermia leads to enhanced XBP1s production associated with increased expression of DNAJB9. Prevention of XBP1 splicing with B-I09, an inhibitor of ribonuclease activity of IRE1, decreased DNAJB9 gene expression. This indicates that beyond the “classical” HSF1 pathway, HCAECs are able to activate the unexpected UPR pathway through IRE1 response as a cytoprotective response allowing ECs to adapt to proteotoxic stress while improving survival when subjected to a moderate hyperthermia.

Finally, our data indicate that after a moderate hyperthermia, HCAECs first devote their resources to increasing the cytoplasmic and the reticulum-endoplasmic chaperoning capacity to fight against protein misfolding. The HSP mobilization triggers the activation of several signaling pathways which take place in two different cell compartments (cytosol and endoplasmic reticulum) that are complementary and coordinated by the interaction of HSPs with compartment-specific regulatory proteins, namely HSF1 and IRE1. So, this study unravels the mechanisms through which the endothelium can react to intravascular temperature variations which may be at play during febrile hyperthermic episodes and/or local inflammatory foci. Additional work might be needed to determine how EC functions are altered by temperature to better understand the vascular complications that may arise from chronic or



repeated exposure to increase in temperature. In addition, we have confirmed in this study that EC adaptation to temperature was also induced under laminar flow conditions. Interestingly, the set of thermosensitive genes was up- or down-regulated similarly under static and flow conditions. In contrast, genes involved in shear stress regulation were not modulated by moderate hyperthermia highlighting the specificity of our set of thermosensitive genes. Laminar shear stress can protect ECs from inflammation but disturbed or oscillatory flows near arterial bifurcations and curvatures are associated with atheroma formation<sup>38</sup>. Therefore, it would be interesting to determine whether the adaptation of ECs to temperature is the same in areas of disturbed flow, already subject to the development of cardiovascular pathologies such as atherosclerosis<sup>39</sup>. This would open up interesting perspectives making it possible to establish a link between disturbed flow, local increased temperature and vascular pathologies.



- 1 HSP/HSF1 dissociation
- 2 HSF1 phosphorylation
- 3 HSF1 nuclear translocation and gene transcription
- 4 mRNA translation into proteins
- 5 Feedback loop  
→ HSP/HSF1 association

- 1 HSP/ERN1 dissociation
- 2 ERN1 phosphorylation
- 3 XBP1 splicing
- 4 XBP1s translation into protein
- 5 XBP1s nuclear translocation and gene transcription
- 6 mRNA translation into proteins
- 7 Feedback loop  
→ HSP/ERN1 association

## **Materials and Methods**

### *Cell culture*

Primary human coronary artery endothelial cells (HCAECs, #CC-2585, Lonza) were cultured in EBM-2 basal medium (#CC-3156, Lonza) supplemented with EGM-2 MV microvascular endothelium cell growth medium (#CC-3202, Lonza) and maintained at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator. Human aortic endothelial cell line (TeloHAECs, #CRL-4052, ATCC) were immortalized by stably expressing human telomerase catalytic subunit hTERT. They were cultured in Vascular Cell basal medium (#PCS-100-030, ATCC) supplemented with Vascular Endothelial Cell Growth Kit-VEGF (#PCS-100-041, ATCC). To mimic a fever-range temperature environment, ECs (HCAECs or TeloHAECs) were cultured under static conditions at 40°C. In some experiments, cells were treated for 6 hours with rapamycin (20 nM, #R8781, Sigma), a selective mTORC1 inhibitor<sup>40</sup>, or with B-I09 (20 μM, #6009, Tocris), an inositol-requiring enzyme-1α (IRE1α) inhibitor that prevents XBP-1 splicing<sup>18</sup>. A 37°C control condition was included in every experiment.

Human monocytic cell line THP-1 (#TIB-202, ATCC) was transfected with the IncuCyte™ NucLight™ Red Fluorescent Protein (GFP) Lentivirus Reagents (Essen BioScience). THP-1-GFPs were cultured in RPMI 1640 medium (#11875093, Gibco) and 10% FBS (#10082139, Gibco).

### *Flow experiments*

In order to replicate the *in vivo* flow conditions of an artery, HCAECs were exposed to a laminar flow. Briefly,  $2.5 \times 10^5$  cells were seeded onto collagen I-coated laminar flow-through cell culture slides (0.4-mm Luer μ-slides I, #80176, Ibidi) and allowed to adhere for 2h30 without flow. Using a peristaltic pump (#1095, Ibidi), the cell monolayer inside the slide channel was perfused with complete medium at physiologic arterial-like shear stress (10 dyne/cm<sup>2</sup>)<sup>41,42</sup> for

24h at 37°C. The flow parameters were thereafter maintained but cells were then exposed at 40°C or left at 37°C during 6h. Cells were next fixed and permeabilized with a cytoperm/cytofix solution (#554714, Becton Dickinson) and immunostained or collected for RT-qPCR/TLDA experiments.

### Microarray

HCAECs were seeded at a density of  $5 \cdot 10^5$  a well in a 6-well plate and cultured in complete medium during 6h at 37°C or 40°C. Then, cells were lysed using Qiazol and total RNAs were isolated using miRNEasy mini kit (#217004, Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The quality of the RNA samples was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). The mRNAs from total RNAs samples were converted into complementary dsDNA. Then, T7 polymerase was used to generate Cyanine 3-labeled cRNAs. The labelled cRNAs were purified using RNEasy mini kit (74104, Qiagen) and concentrations were measured using NanoDrop spectrophotometer (ND-2000, ThermoFisher). The cRNAs were fragmented and subsequently hybridized to SurePrint G3 Human Gene Expression v3 8x60K Microarray Kit (G4851C, Agilent) during 17h at 65°C. Then, microarrays were washed, and the analysis was performed. Quality control of the microarray data was done, and the original array data was preprocessed with background adjustment and quartile normalization.

### RT-qPCR and TLDA

Total RNAs were isolated from HCAECs or TeloHAECs by using RNEasy mini kit (74104, Qiagen) and RNA concentrations were determined by using a NanoDrop spectrophotometer (ND-2000, ThermoFischer). 500 nanograms of total RNAs were reversely transcribed into cDNA by using SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (#11754050, Invitrogen). The real-time PCR was carried out with TaqMan Universal PCR Master Mix (#4369016, Invitrogen) on

Stratagene Mx3000P (Agilent) detection system for classic PCR or on ABI PRISM® 7900HT Sequence (Applied Biosystems) detection system for TLDA. The only difference between conventional PCR and TLDA is the number of genes can be analyzed in a single plate, it is much larger in TLDA. Primer sets used in our study (ThermoFischer) are listed in table S4. The relative gene expressions were determined by  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method<sup>43</sup>.

### *Western Blot*

HCAECs were lysed in ice-cold cell extraction buffer (#FNN0011, Invitrogen) supplemented with protease/phosphatase inhibitor mixture (Sigma) and collected by scraping. Protein concentrations were quantified using the Pierce BCA Protein Assay Kit (#23225, Thermo Fischer). For western blotting, 9 µg of each sample were loaded onto prefabricated 3-8% Tris Acetate SDS-PAGE gels (#EA0375PK2, Invitrogen) and electro-transferred (10 minutes, 13V) to a 0.22 µm PVDF membrane (#1704156, BioRad). Membranes were blocked in TBS containing 10% non-fat dry milk (#1706404, BioRad) and then incubated with primary antibodies against phospho-HSF1 (Ser-326) (#Ab76076, Abcam, 1:1000), total HSF1 (#Ab52757, Abcam, 1:1000), phospho-p70-S6K (#9234, Thr389) (Cell Signaling, 1:1000), total p70-S6K (#9202, Cell Signaling, 1:1000), XBP1s (#12782, Cell Signaling, 1:1000), β-actin (#A5441, Sigma, 1:10000) with gentle agitation overnight at 4°C. The membranes were washed three times for 10 min with TBST (containing 0.1% Tween-20) and incubated with horseradish-peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse-IgG (#115-035-003, Jackson ImmunoResearch, 1:10000) or HRP-conjugated anti-rabbit-IgG (#111-035-045, Jackson ImmunoResearch, 1:10000) followed by chemiluminescence detection using GE Healthcare ECL western blotting substrate (GERPN2109, Sigma) according to the manufacturer's protocol. The blot image was acquired using G:BOX Chemi XL 1.4 (Syngene) imaging system and the quantification was done as a colorimetric density analysis of the band intensity from

the western blot using GENETOOLS V4.03 (Syngene) software. Values were normalized to the relative  $\beta$ -actin levels.

### Immunostaining

After the different treatments, cells were fixed and permeabilized using an ice-cold fixation/permeabilization solution kit (#554714, Becton Dickinson), containing formaldehyde and saponin, for 10 minutes. After three washes with perm/wash buffer (#554714, Becton Dickinson) containing FBS and saponin, the samples were blocked with perm/wash 2% BSA for at least 1h at room temperature. Primary antibodies against HSPA1A (1/400, #GTX111088, Genetex) or HSP90 (1:400, #GTX109753, Genetex), diluted in perm/wash solution, were added and cells were incubated overnight at 4°C. After three washes with perm/wash, cells were incubated with secondary antibody Alexa Fluor 488 (1/500, #A-11008, Invitrogen) for 1h at room temperature. After washing again, the images were automatically captured with a  $\times 20$  objective on INCell 2200 device. Images processing and parameter quantification were performed with INCell software.

### Transfection and luciferase assay

TeloHAECs were seeded at the density of  $30 \times 10^3$  cells/well in a 96 well plate and maintained in complete medium at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator for 24 hours. They were transiently transfected with 0,2  $\mu\text{g}$ /well of the luciferase reporter constructs and 0.02  $\mu\text{g}$ /well of the GFP reporter using Lipofectamine 2000 (#11668019, Invitrogen) in Opti-MEM medium (#51985-026, Gibco) according to the manufacturer's instructions. Cells were incubated with transfection complexes at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator for 4 hours. Medium was then replaced with complete medium supplemented by 20% FBS for 24h. Cells were next washed, complete medium was added, and cells were exposed to 37°C or 40°C for 2h, 4h, 6h

or 24h. At the end of each incubation time, the medium was removed, fluorescence intensity was measured, cells were lysed and the Luc-Screen™ Extended-Glow Luciferase Reporter Gene Assay System (#T2300 and #T2302, Invitrogen) was used to detect luciferase activity (according to the manufacturer's instruction). Luminescence intensity was detected with a luminescent plate reader (CLARIOstar Plus, Bmg Labtech).

### *Statistical analysis*

In microarray, each spot intensity was converted into a raw value. Several quality parameters were then checked (background correction, normalization). Subsequently, these data were log transformed into log<sub>2</sub> in order to obtain induction values for each gene and for each condition. An ANOVA statistical analysis made it possible to identify significant gene expression variations. The gene expressions were compiled into a volcano plot et were considered to be significantly modulated by temperature for a two-fold up- or down-regulation in gene expression with a P-value < 0.05. All of these genes were then compiled into a hierarchical cluster of samples in order to highlight genes with a similar expression profile.

All the other values were presented as mean ± standard error of mean (SEM). Comparison between 2 groups was performed with t-tests. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software 7.0. A P value < 0.05 was interpreted to denote statistical significance.

## References and Notes

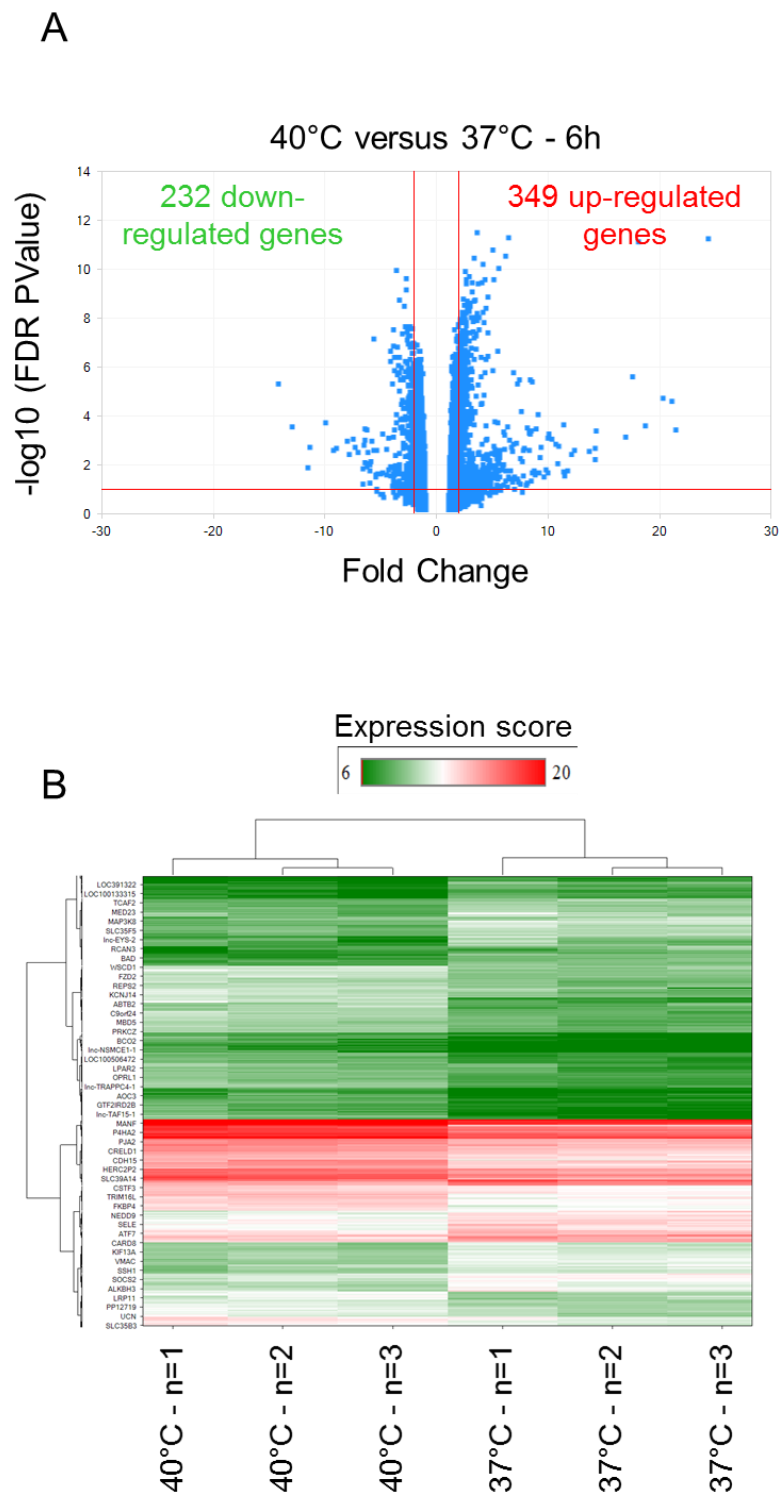
1. Peterson ME, Daniel RM, Danson MJ, Eisenthal R. The dependence of enzyme activity on temperature: determination and validation of parameters. *Biochem J.* 2007;402(2):331-337. doi:10.1042/BJ20061143
2. Van Someren EJW. Mechanisms and functions of coupling between sleep and temperature rhythms. In: Kalsbeek A, Fliers E, Hofman MA, Swaab DF, van Someren EJW, Buijs RM, eds. *Progress in Brain Research.* Vol 153. Hypothalamic Integration of Energy Metabolism. Elsevier; 2006:309-324. doi:10.1016/S0079-6123(06)53018-3
3. Tur E. Physiology of the skin—Differences between women and men. *Clinics in Dermatology.* 1997;15(1):5-16. doi:10.1016/S0738-081X(96)00105-8
4. Arens E, Zhang H. 16 - The skin's role in human thermoregulation and comfort. In: Pan N, Gibson P, eds. *Thermal and Moisture Transport in Fibrous Materials.* Woodhead Publishing Series in Textiles. Woodhead Publishing; 2006:560-602. doi:10.1533/9781845692261.3.560
5. Tansey EA, Johnson CD. Recent advances in thermoregulation. *Adv Physiol Educ.* 2015;39(3):139-148. doi:10.1152/advan.00126.2014
6. Evans SS, Repasky EA, Fisher DT. Fever and the thermal regulation of immunity: the immune system feels the heat. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(6):335-349. doi:10.1038/nri3843
7. Tulapurkar ME, Almutairy EA, Shah NG, et al. Febrile-Range Hyperthermia Modifies Endothelial and Neutrophilic Functions to Promote Extravasation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012;46(6):807-814. doi:10.1165/rcmb.2011-0378OC
8. Pelz J, Mollwitz M, Stremmel C, et al. The impact of surgery and mild hyperthermia on tumor response and angiogenesis of malignant melanoma in a rat perfusion model. *BMC Cancer.* 2004;4(1):53. doi:10.1186/1471-2407-4-53
9. Du S, Zhang Q, Zhang S, Wang L, Lian J. Heat shock protein 70 expression induced by diode laser irradiation on choroid-retinal endothelial cells in vitro. *Mol Vis.* 2012;18:2380-2387.
10. Wasserman SM, Mehraban F, Komuves LG, et al. Gene expression profile of human endothelial cells exposed to sustained fluid shear stress. *Physiol Genomics.* 2002;12(1):13-23. doi:10.1152/physiolgenomics.00102.2002
11. Chien Shu, Li Song, Shyy John Y-J. Effects of Mechanical Forces on Signal Transduction and Gene Expression in Endothelial Cells. *Hypertension.* 1998;31(1):162-169. doi:10.1161/01.HYP.31.1.162
12. Dayalan Naidu S, Dinkova-Kostova AT. Regulation of the mammalian heat shock factor 1. *FEBS J.* 2017;284(11):1606-1627. doi:10.1111/febs.13999
13. Guettouche T, Boellmann F, Lane WS, Voellmy R. Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem.* 2005;6:4. doi:10.1186/1471-2091-6-4



14. Chou S-D, Prince T, Gong J, Calderwood SK. mTOR is essential for the proteotoxic stress response, HSF1 activation and heat shock protein synthesis. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e39679. doi:10.1371/journal.pone.0039679
15. Nojima H, Tokunaga C, Eguchi S, et al. The Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Partner, Raptor, Binds the mTOR Substrates p70 S6 Kinase and 4E-BP1 through Their TOR Signaling (TOS) Motif. *J Biol Chem*. 2003;278(18):15461-15464. doi:10.1074/jbc.C200665200
16. Liu CY, Kaufman RJ. The unfolded protein response. *Journal of Cell Science*. 2003;116(10):1861-1862. doi:10.1242/jcs.00408
17. Ghosh R, Wang L, Wang ES, et al. Allosteric inhibition of the IRE1 $\alpha$  RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell*. 2014;158(3):534-548. doi:10.1016/j.cell.2014.07.002
18. Tang C-HA, Ranatunga S, Kriss CL, et al. Inhibition of ER stress-associated IRE-1/XBP-1 pathway reduces leukemic cell survival. *J Clin Invest*. 2014;124(6):2585-2598. doi:10.1172/JCI73448
19. Aulus Cornelius Celsus. In: *Wikipedia*. ; 2020. Accessed August 31, 2020. [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Aulus\\_Cornelius\\_Celsus&oldid=973447002](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Aulus_Cornelius_Celsus&oldid=973447002)
20. Chapter 3. The Acute Inflammatory Response | Concise Pathology, 3e | AccessPhysiotherapy | McGraw-Hill Medical. Accessed August 31, 2020. <http://accessphysiotherapy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=333&sectionid=40013175#40013682>
21. Demirovic D, de Toda IM, Nizard C, Rattan SIS. Differential translocation of heat shock factor-1 after mild and severe stress to human skin fibroblasts undergoing aging in vitro. *J Cell Commun Signal*. 2014;8(4):333-339. doi:10.1007/s12079-014-0244-8
22. Yoshihara T, Naito H, Kakigi R, et al. Heat stress activates the Akt/mTOR signalling pathway in rat skeletal muscle. *Acta Physiologica*. 2013;207(2):416-426. doi:10.1111/apha.12040
23. Heldens L, Hensen SMM, Onnekink C, Genesen ST van, Dirks RP, Lubsen NH. An Atypical Unfolded Protein Response in Heat Shocked Cells. *PLOS ONE*. 2011;6(8):e23512. doi:10.1371/journal.pone.0023512
24. Ellis RJ, van der Vies SM, Hemmingsen SM. The molecular chaperone concept. *Biochem Soc Symp*. 1989;55:145-153.
25. Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev*. 1998;12(5):654-666. doi:10.1101/gad.12.5.654
26. Ali A, Bharadwaj S, O'Carroll R, Ovsenek N. HSP90 Interacts with and Regulates the Activity of Heat Shock Factor 1 in *Xenopus* Oocytes. *Mol Cell Biol*. 1998;18(9):4949-4960.
27. Miyata Y, Badolato M, Neamati N. HSPA5. In: Choi S, ed. *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer International Publishing; 2018:2429-2451. doi:10.1007/978-3-319-67199-4\_101802

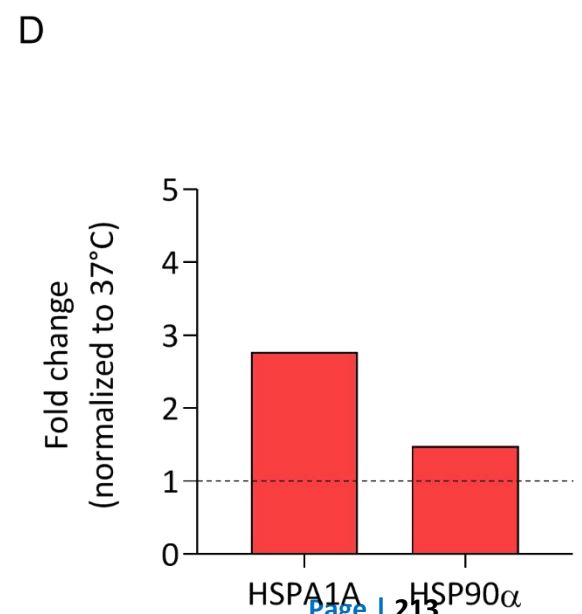
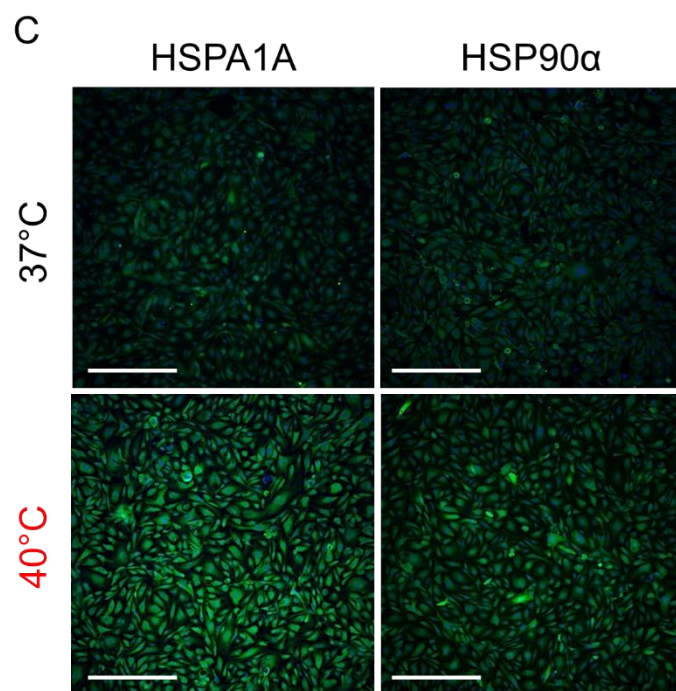
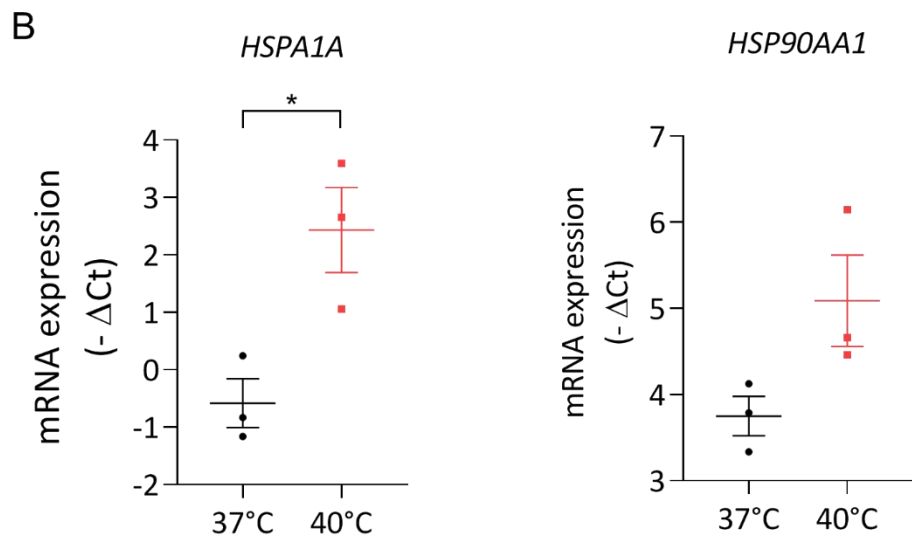
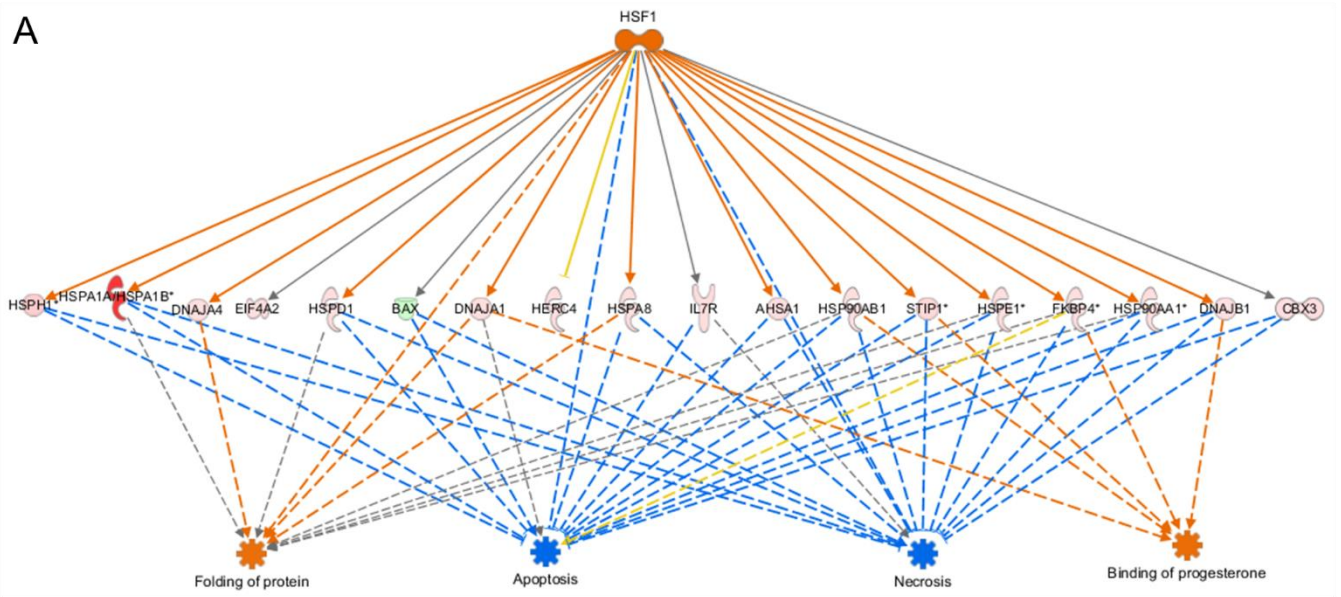
28. Amin-Wetzel N, Saunders RA, Kamphuis MJ, et al. A J-Protein Co-chaperone Recruits BiP to Monomerize IRE1 and Repress the Unfolded Protein Response. *Cell*. 2017;171(7):1625-1637.e13. doi:10.1016/j.cell.2017.10.040
29. Dayalan Naidu S, Sutherland C, Zhang Y, et al. Heat Shock Factor 1 Is a Substrate for p38 Mitogen-Activated Protein Kinases. *Mol Cell Biol*. 2016;36(18):2403-2417. doi:10.1128/MCB.00292-16
30. Tang Z, Dai S, He Y, et al. MEK guards proteome stability and inhibits tumor-suppressive amyloidogenesis via HSF1. *Cell*. 2015;160(4):729-744. doi:10.1016/j.cell.2015.01.028
31. Kadowaki H, Nishitoh H. Signaling Pathways from the Endoplasmic Reticulum and Their Roles in Disease. *Genes (Basel)*. 2013;4(3):306-333. doi:10.3390/genes4030306
32. Lee A-H, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 Regulates a Subset of Endoplasmic Reticulum Resident Chaperone Genes in the Unfolded Protein Response. *Mol Cell Biol*. 2003;23(21):7448-7459. doi:10.1128/MCB.23.21.7448-7459.2003
33. Lai CW, Otero JH, Hendershot LM, Snapp E. ERdj4 Protein Is a Soluble Endoplasmic Reticulum (ER) DnaJ Family Protein That Interacts with ER-associated Degradation Machinery. *J Biol Chem*. 2012;287(11):7969-7978. doi:10.1074/jbc.M111.311290
34. Pröls F, Mayer MP, Renner O, et al. Upregulation of the Cochaperone Mdg1 in Endothelial Cells Is Induced by Stress and during in Vitro Angiogenesis. *Experimental Cell Research*. 2001;269(1):42-53. doi:10.1006/excr.2001.5294
35. Berger BJ, Müller TS, Buschmann IR, et al. High levels of the molecular chaperone Mdg1/ERdj4 reflect the activation state of endothelial cells. *Exp Cell Res*. 2003;290(1):82-92. doi:10.1016/s0014-4827(03)00316-1
36. Tsaryk R, Bartholomä NM, Simiantonaki N, et al. Endoplasmic reticulum-resident chaperones modulate the inflammatory and angiogenic responses of endothelial cells. *Br J Dermatol*. 2015;173(2):416-427. doi:10.1111/bjd.13816
37. Kurisu J, Honma A, Miyajima H, Kondo S, Okumura M, Imaizumi K. MDG1/ERdj4, an ER-resident DnaJ family member, suppresses cell death induced by ER stress. *Genes Cells*. 2003;8(2):189-202. doi:10.1046/j.1365-2443.2003.00625.x
38. Shen Y, Meunier L, Hendershot LM. Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J Biol Chem*. 2002;277(18):15947-15956. doi:10.1074/jbc.M112214200
39. Warboys CM, Amini N, de Luca A, Evans PC. The role of blood flow in determining the sites of atherosclerotic plaques. *F1000 Med Rep*. 2011;3. doi:10.3410/M3-5
40. Lamming DW. Inhibition of the Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)–Rapamycin and Beyond. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(5). doi:10.1101/cshperspect.a025924

41. Resnick N, Yahav H, Shay-Salit A, et al. Fluid shear stress and the vascular endothelium: for better and for worse. *Prog Biophys Mol Biol.* 2003;81(3):177-199. doi:10.1016/s0079-6107(02)00052-4
42. Roux E, Bougaran P, Dufourcq P, Couffinhal T. Fluid Shear Stress Sensing by the Endothelial Layer. *Front Physiol.* 2020;11. doi:10.3389/fphys.2020.00861
43. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262

**Figures**

**Fig. 1: Microarray data analysis revealed a difference in gene expression between HCAECs subjected to 37°C and those subjected to 40°C.**

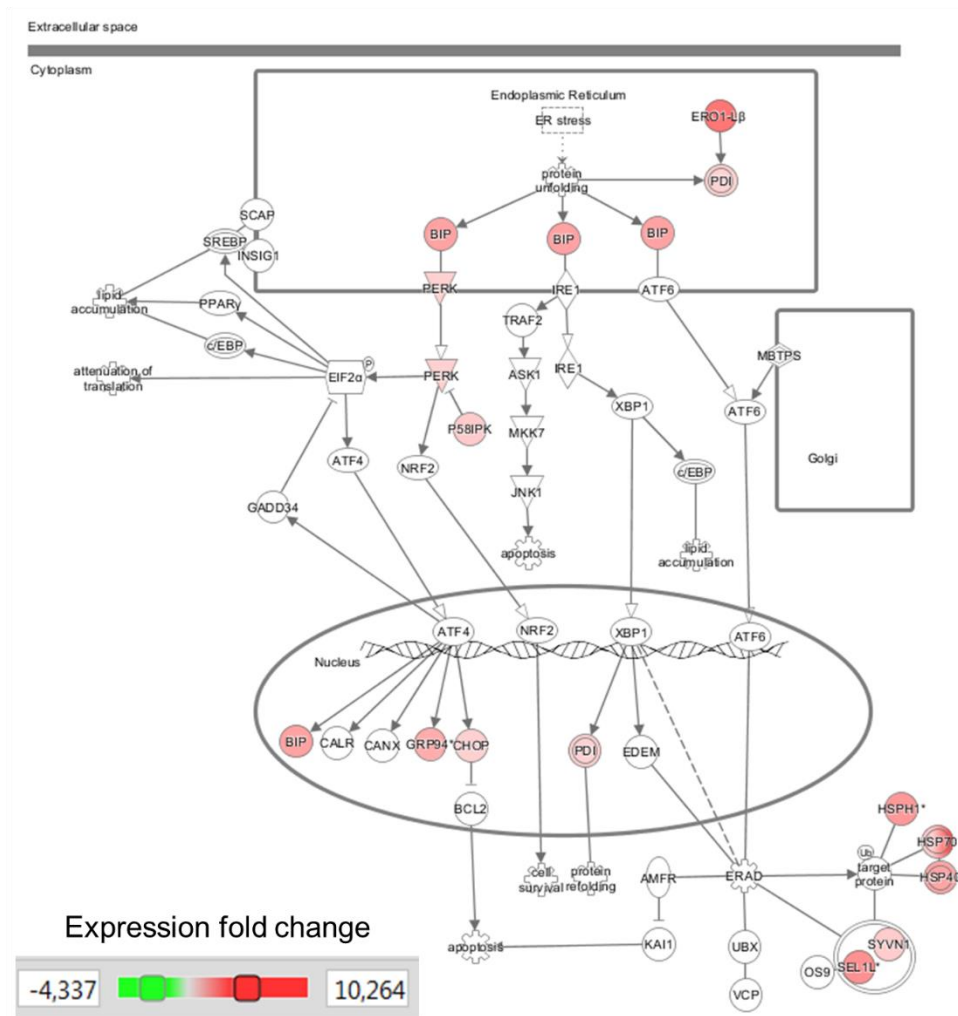
(A) Volcano plot was generated by ArrayStudio software and revealed that genes were significantly modulated at 40°C compared to 37°C (N=3 experiments). The x-axis is the mean ratio fold-change of the relative expression of each gene between the two temperatures. The y-axis represents the P-value of the ratio fold-change for each gene. The further the gene's position away from the (0, 0), the more significant the expression of the gene is. The x-axis significant threshold was fixed at -2 and +2 while the y-axis significant threshold was fixed at 0,05. (B) Unsupervised hierarchical cluster analysis of the differentially expressed gene in response to the temperature (N=3 experiments). Red denotes up-regulation and green down-regulation induced by temperature. Clustering was carried out to group similar gene expression profiles into nodes. The height of each node in the tree indicates the overall similarity of its members.



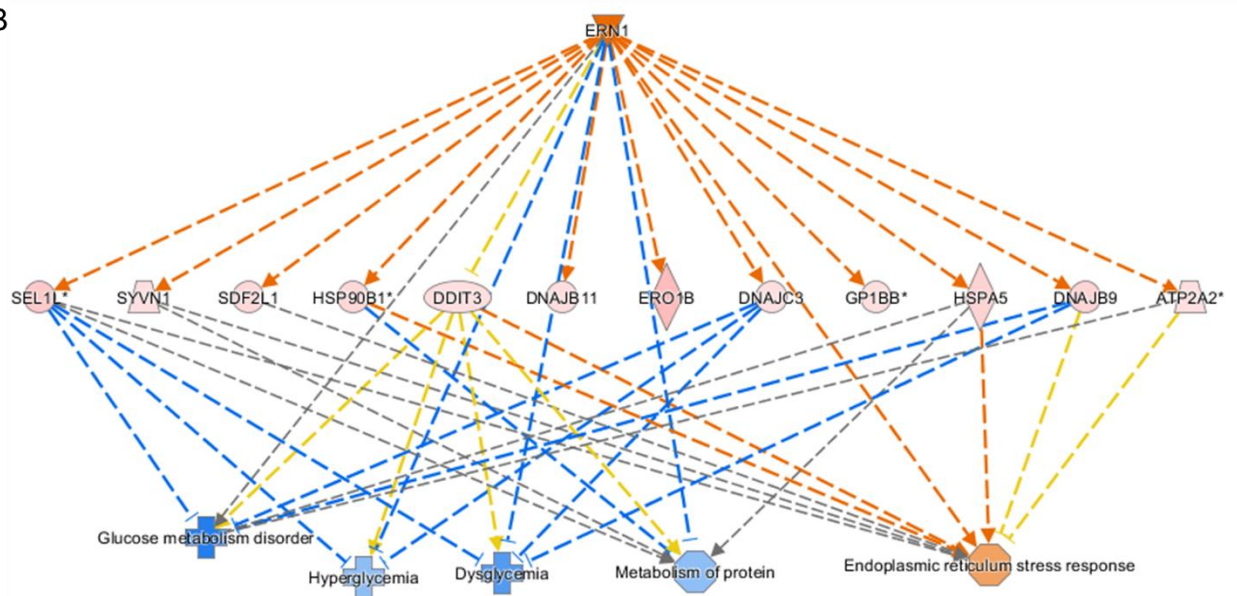
**Fig. 2: HSPs and moderate hyperthermia in ECs.**

(A) IPA analysis of 3 independent experiments highlighting HSF1 activation in ECs following exposure to moderate hyperthermia (40°C). Up-regulated genes are represented in red and down-regulated genes in green. Cellular functions predicted to be activated are represented in orange and those predicted to be inhibited are represented in blue. Scale bar, 100  $\mu$ m. (B) *HSPA1A* and *HSP90AA1* mRNA expression ( $-\Delta$ Ct) were normalized to *HPRT1* mRNA expression (N=3 experiments). (C) Representative images from 2 independent experiments illustrating the HSPA1A and HSP90 $\alpha$  protein expression in HCAECs cultured during 6h at 37°C or 40°C. (D) Quantification analysis with INCell imager of HSPA1A and HSP90 $\alpha$  protein immunodetection in HCAECs cultured during 6h at 37°C or 40°C (N=2 experiments). \*P<0.05 between the indicated groups, by student paired t-test (B).

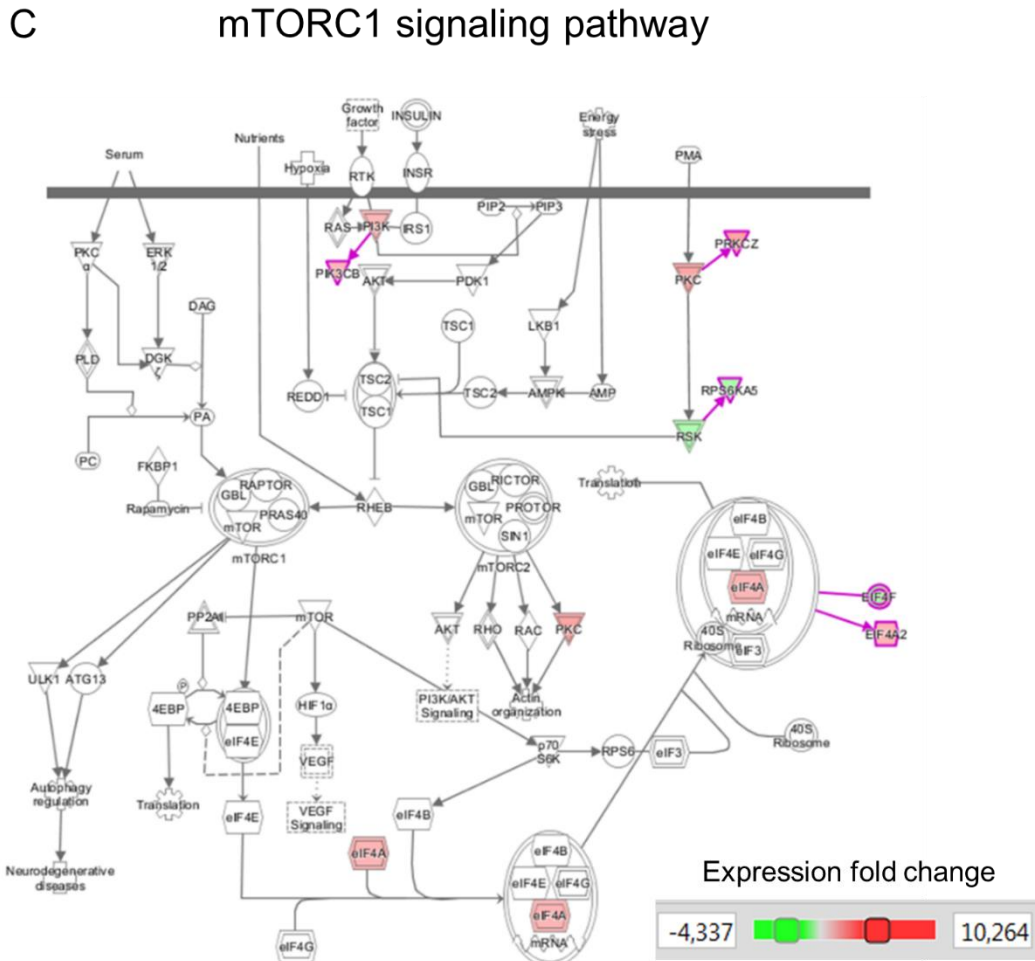
# A UPR signaling pathway



# B

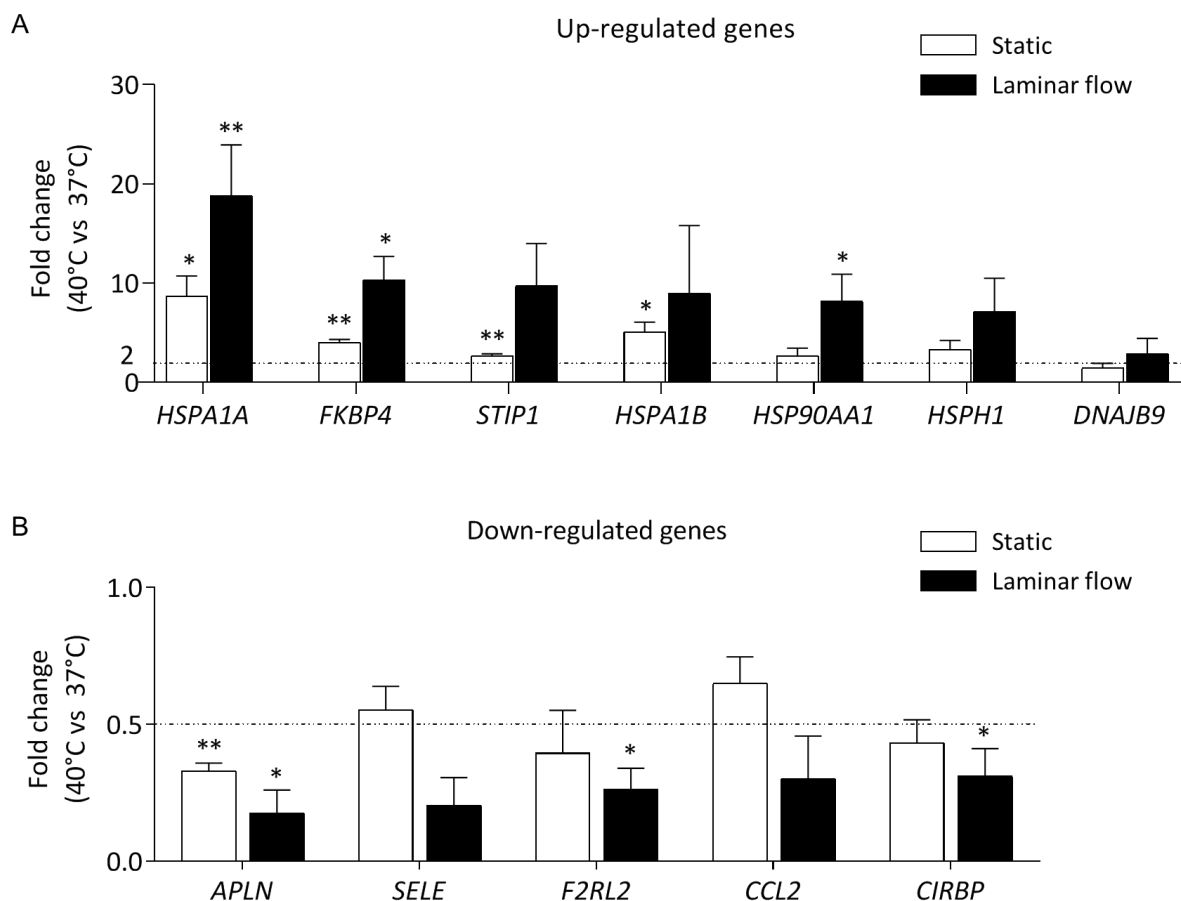






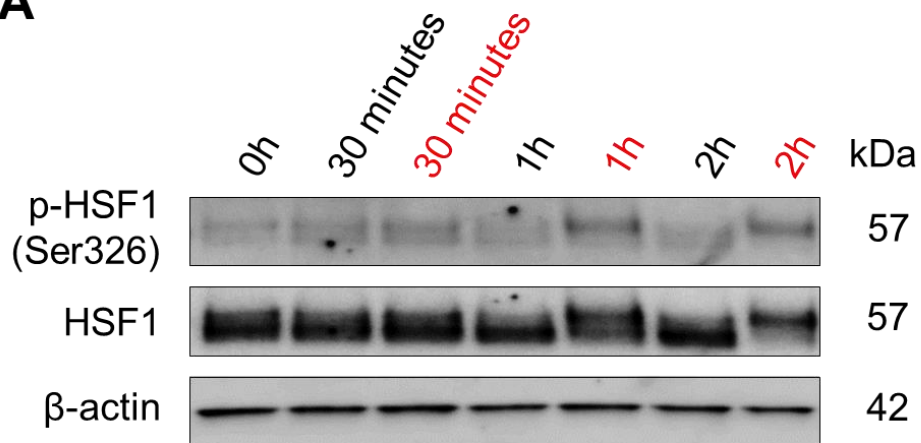
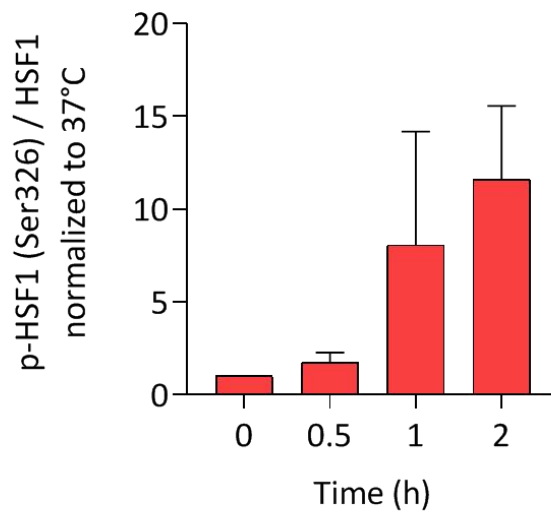
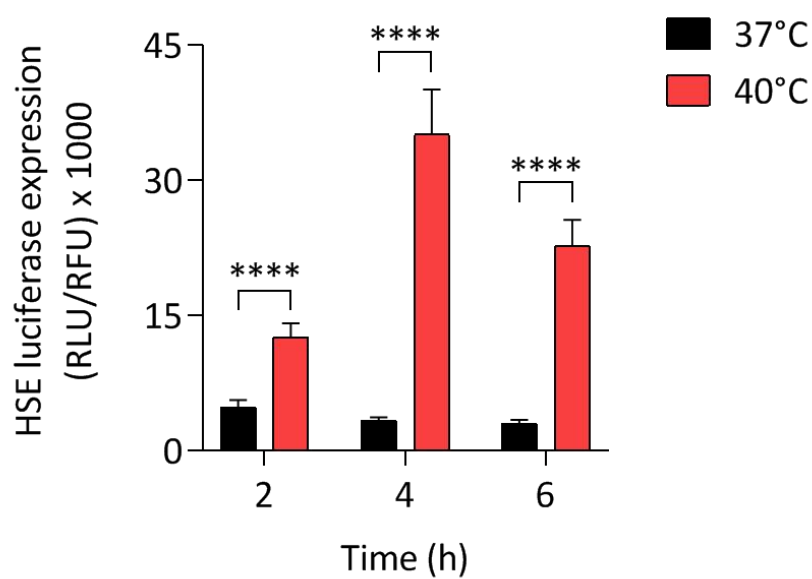
**Fig. 3:** IPA analysis revealed two signaling pathways and one additional upstream regulator possibly involved in cellular response to moderate hyperthermia.

(A) UPR and (B) mTORC1 signaling pathways predicted by IPA analysis to be involved in the endothelial response to the moderate hyperthermia. Up-regulated genes were represented in red and down-regulated genes in green. (C) The upstream regulator ERN1 predicted by IPA analysis to be activated by temperature. Up-regulated genes are represented in red and down-regulated genes in green. Cellular functions predicted to be activated are represented in orange and those predicted to be inhibited are represented in blue. This IPA analysis was performed from 3 independent experiments.



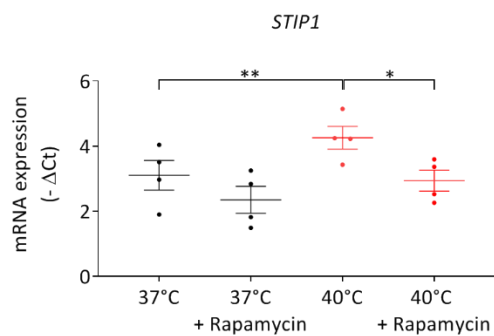
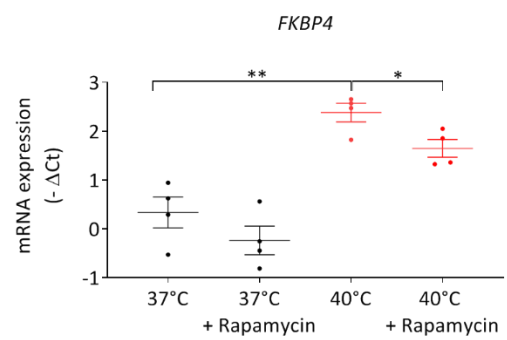
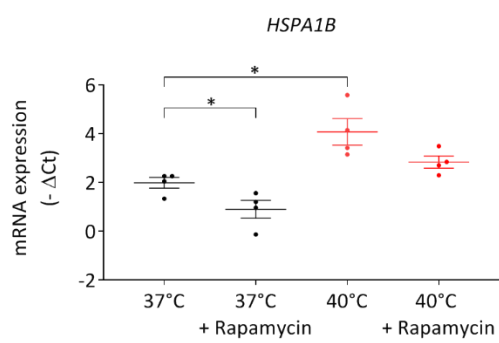
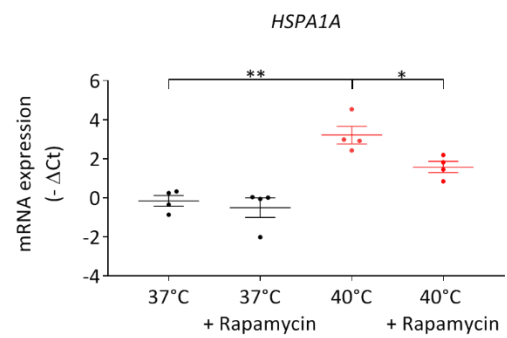
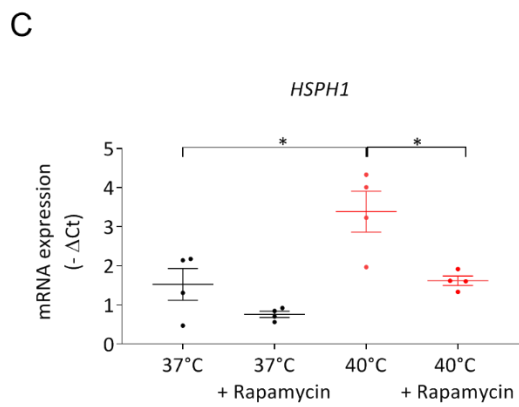
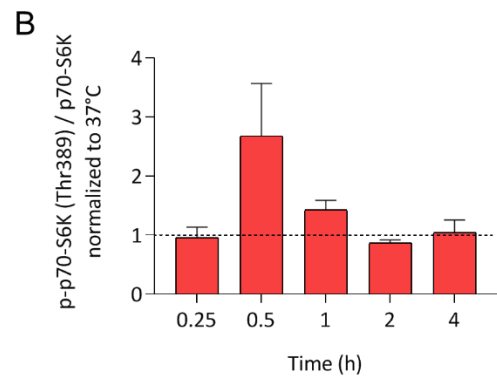
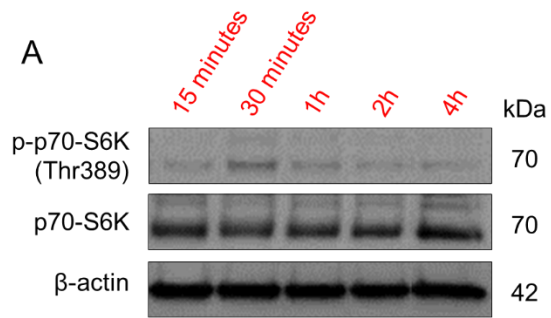
**Fig. 4: Flow conditions amplified HCAEC response to mild hyperthermia.**

HCAECs were cultured under static or laminar-flow (10 dyne.cm<sup>2</sup>) conditions for 24h before exposure to mild hyperthermia (40°C vs 37°C) during 6h. For each condition (static or laminar-flow conditions), gene expression measured by RT-qPCR was calculated by normalization to 37°C conditions (Fold change). Up-regulated (**A**) or down-regulated (**B**) genes are in white for static conditions and black for laminar flow conditions (N=3 different experiments for each condition). \*P<0.05 and \*\*P<0.01 between the indicated groups, by student paired t-test.

**A****B****C**

**Fig. 5: HSF1 is activated after moderate hyperthermia in HCAECs.**

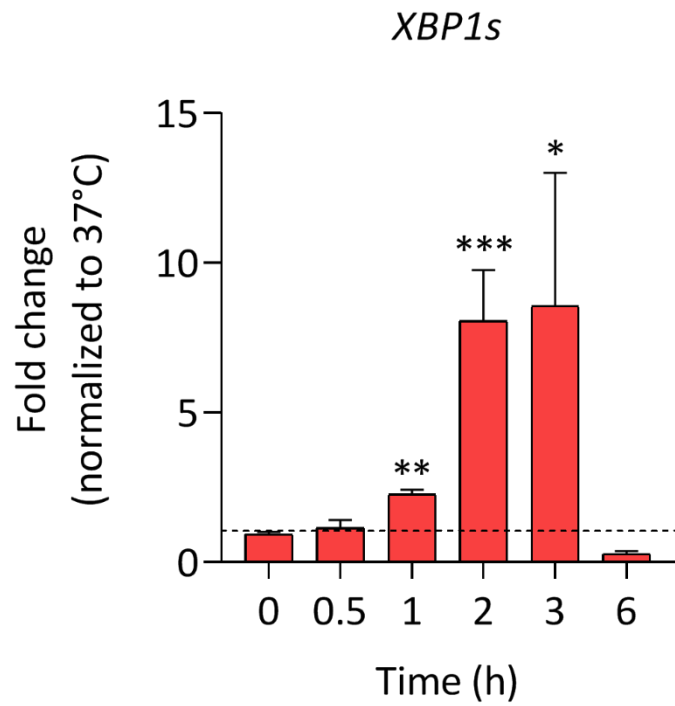
**(A)** Representative Western blot of phospho-HSF1 (p-HSF1; S326) and total HSF1 in HCAEC cultured under static conditions at 37°C or 40°C for 0h, 30 min, 1h and 2h.  $\beta$ -actin was used as a loading control. This blot is representative of 5 independent experiments. **(B)** Kinetics of p-HSF1 protein level in response to continuous exposure at 40°C (N=5 experiments). **(C)** Luciferase activity in TeloHAECs exposed to either normal (37°C) or hyperthermic (40°C) conditions and transduced with a plasmid construct comprising the luciferase gene placed under the control of an HSE-enriched promoter (N=5 experiments). \*\*\*\*P<0.0001 between the indicated groups, by student paired t-test (C).



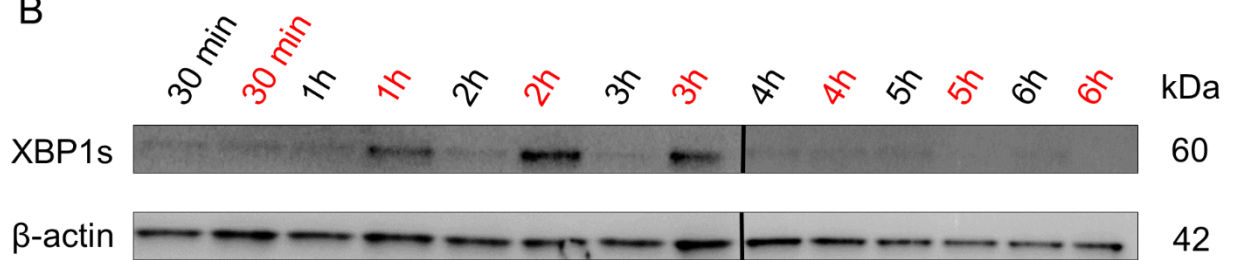
**Fig. 6: mTORC1 is activated during moderate hyperthermia .**

(A) Representative Western blot of phospho-p-70-S6K (p-p70-S6K; Thr389) and total p70-S6K in HCAEC cultured under static conditions at 37°C or 40°C for 15 min, 30 min, 1h, 2h and 4h.  $\beta$ -actin was used as a loading control. This blot is representative of 3 independent experiments. (B) Kinetics of p-p70-S6K protein level in response to continuous exposure at 40°C (N=3 experiments). (C) Expression of HSF1-dependent genes (*HSPH1*, *HSPA1A*, *HSPA1B*, *FKBP4* and *STIP1*), analyzed by RT-qPCR, in the presence or not of rapamycin (20 nM). mRNA expressions (- $\Delta$ Ct) were calculated by normalization to *HPRT1* gene expression (N=3 experiments). \*P<0.05 and \*\*P<0.01 between the indicated groups, by student paired t-test (C for the temperature effect) and by student unpaired t-test (C, for rapamycin effect).

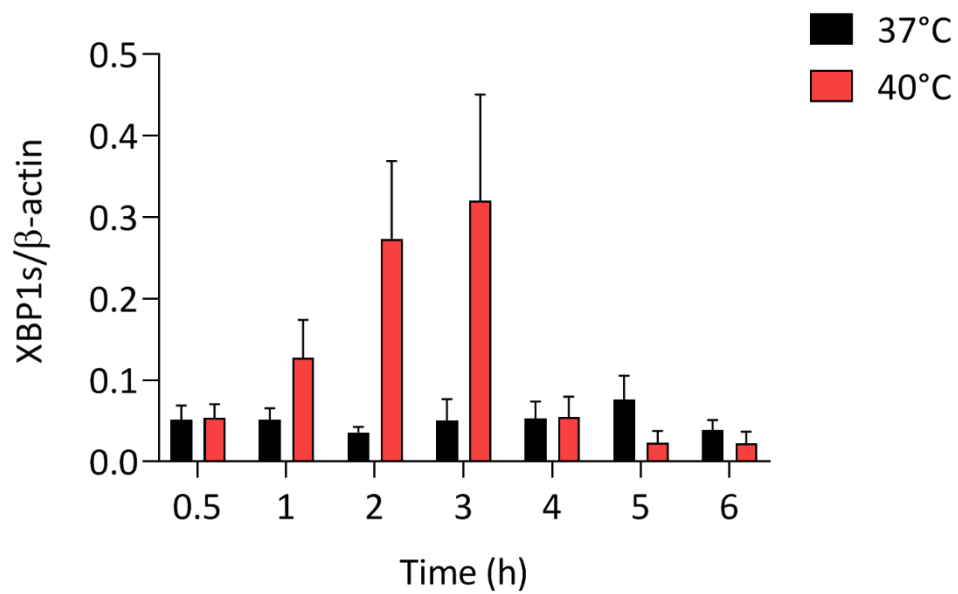
A



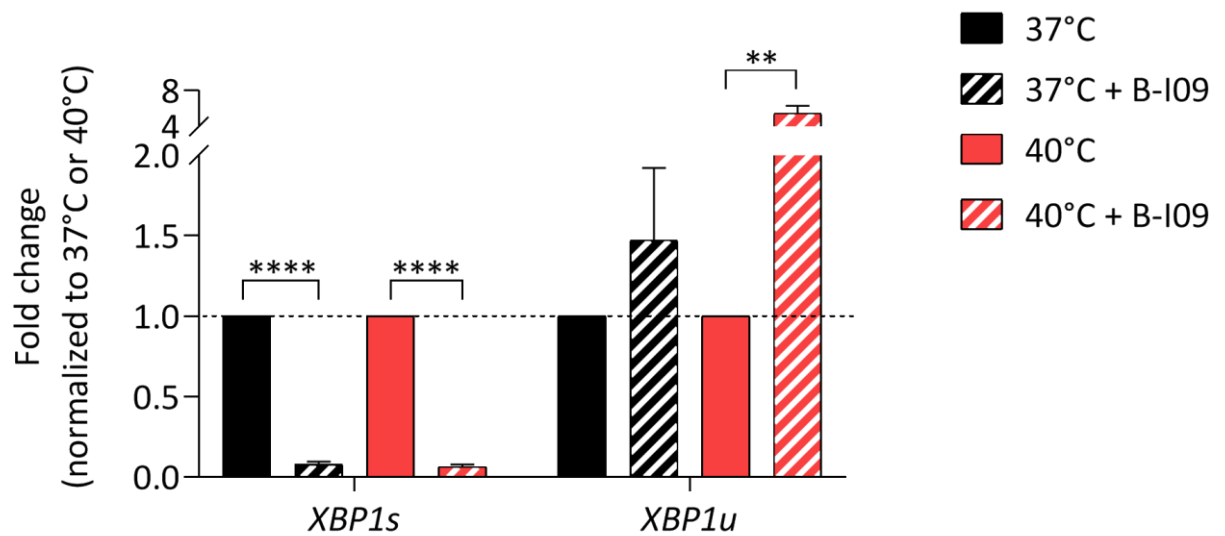
B



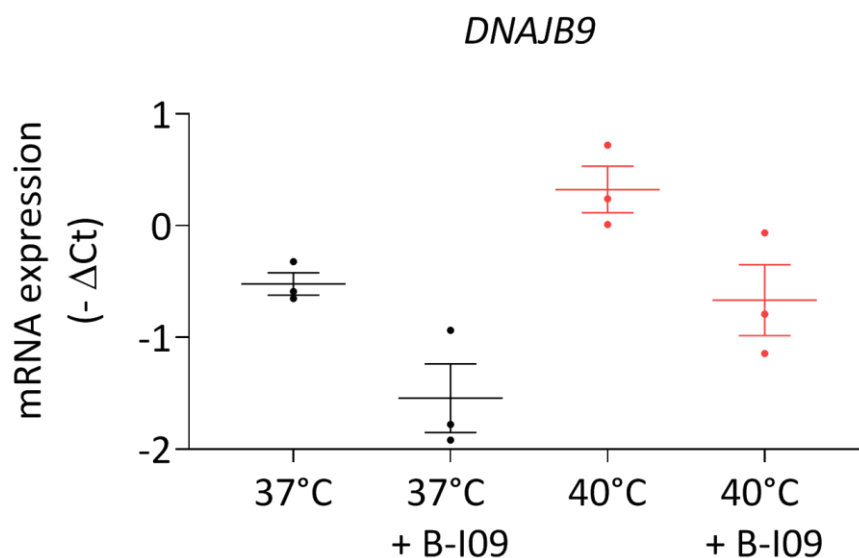
C



D



E

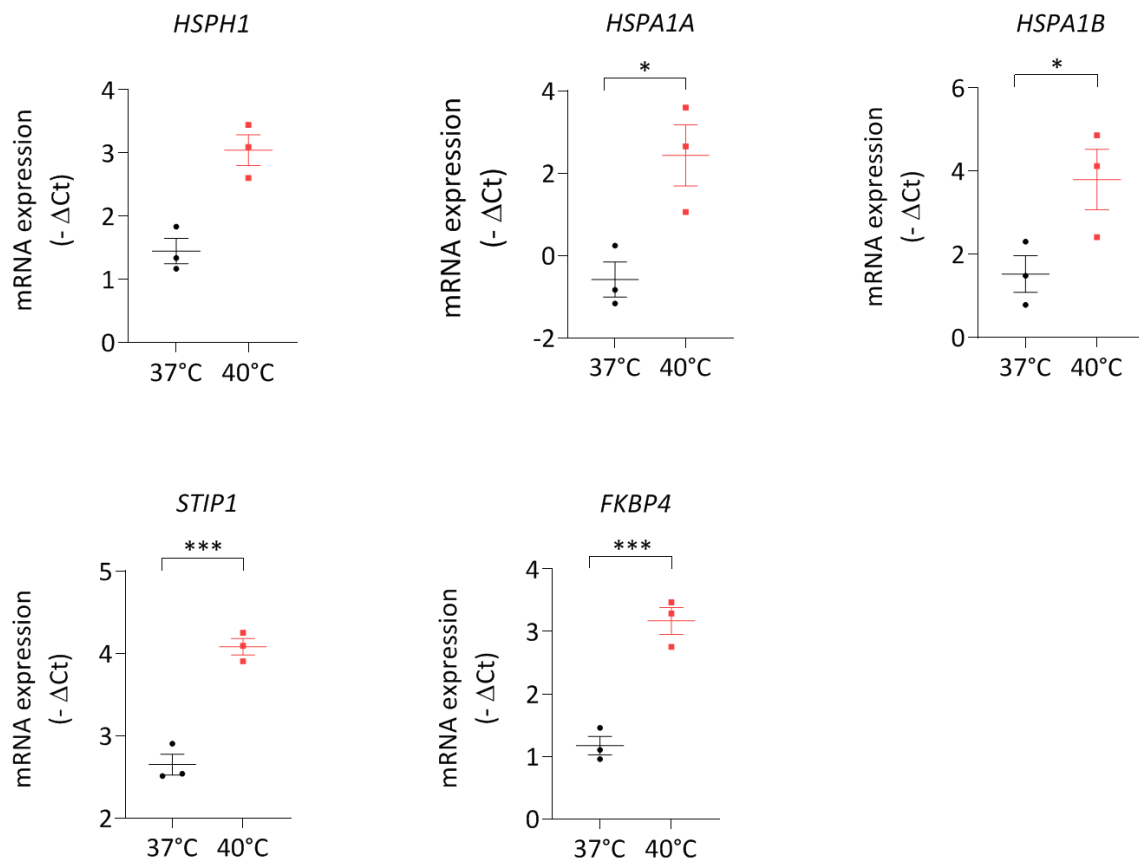


**Fig. 7: ERN1 activation by moderate hyperthermia.**

(A) Kinetics at 40°C of spliced *XBP1* (*XBP1s*) expression measured by RT-qPCR (N=3 experiments). (B) Western blot representative of *XBP1s* protein kinetic expression in HCAECs exposed to moderate hyperthermia (40°C vs 37°C).  $\beta$ -actin was used as a loading control. This blot is representative of 3 independent experiments. The black vertical line means they are two

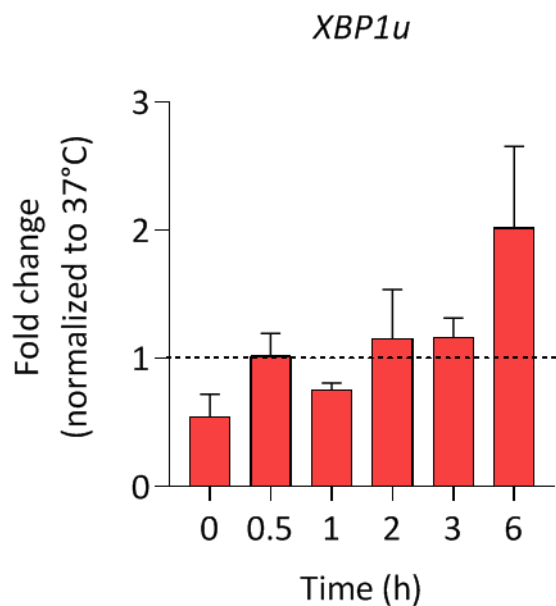


different blots. **(C)** Quantitative analysis of the kinetic of XBP1s protein expression in HCAECs exposed to 37°C or 40°C (N=3 experiments). **(D)** RT-qPCR showing the spliced *XBP1* (*XBP1s*) or unspliced *XBP1* (*XBP1u*) mRNA abundance in HCAEC cultured at 37°C or 40°C for 2h with or without B-I09 (20µM) (N=3 experiments). **(E)** *DNAJB9* gene expression quantified by RT-qPCR and normalized to *HPRT1* (N=3 experiments). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.0005 and \*\*\*\*P<0.0001 between the indicated groups, by student paired t-test (A) and student unpaired t-test (D).

**Supplementary Materials**

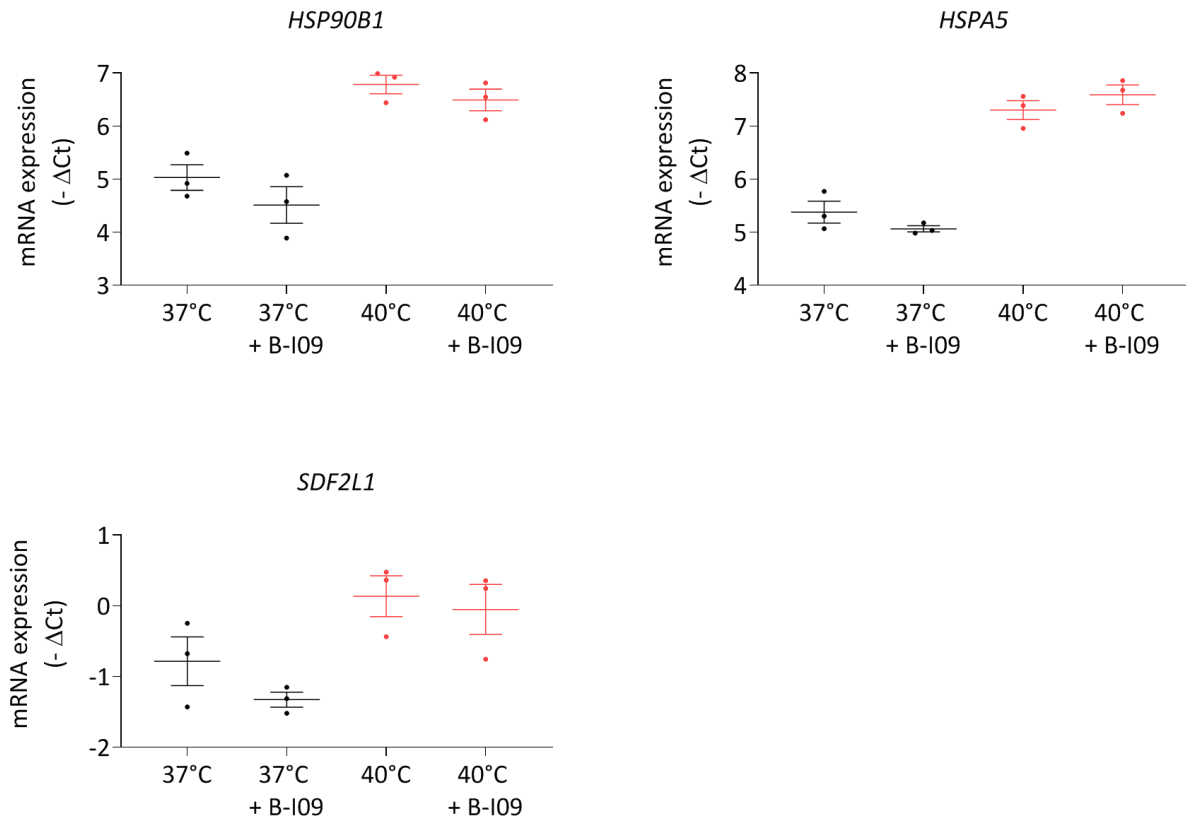
**fig. S1: Gene containing HSE sequences in their promoter are modulated by temperature.**

HCAECs were cultured under normal (37°C) or hyperthermic (40°C) conditions during 6h. The expression of genes containing HSE sequences in their promoters were quantified by RT-qPCR and normalized to *HPRT1* mRNA expression (N=3 experiments). \*P<0.05 and \*\*\*P<0.0005 between the indicated groups, by student paired t-test.



**fig. S2: Unspliced XBPI is not significantly modulated by temperature**

HCAECs were cultured under normal (37°C) or hyperthermic (40°C) conditions. This bar graph represents kinetic at 40°C of unspliced *XBPI* (*XBPIu*) expression measured by RT-qPCR (N=3 experiments).



**fig. S3 : Genes with ERSE sequences in their promoter and whose expression is modulated by temperature are not inhibited by B-109.**

HCAECs were cultured under normal (37°C) or hyperthermic (40°C) with or without B-109 (20 μM) during 6h. Expression of genes containing ERSE sequences in their promoters was quantified by RT-qPCR and normalized to *HPRT1* mRNA expression (N=3 experiments).

Gene symbol	Fold change 40°C vs 37°C
<i>AHSA1</i>	1.8
<i>EIF4A2</i>	3.3
<i>FKBP4</i>	4.0
<i>HSF1</i>	1.6
<i>HSP90AA1</i>	2.7
<i>HSPA1A</i>	8.7
<i>HSPA1B</i>	5.1
<i>HSPH1</i>	3.3
<i>IL7R</i>	2.5
<i>STIP1</i>	2.7

**table S1: List and differential expression of HSF1-dependent genes.**

HCAEC were cultured under normal (37°C) or hyperthermic (40°C) conditions during 6h. Expression of genes containing HSE sequences in their promoters was quantified by RT-qPCR and normalized to *HPRT1* mRNA expression (N=3 experiments). Fold change greater than 2 (in green) means that gene expression is up-regulated at 40°C (versus 37°C) while fold change below 2 (in black) means that the gene expression is not modulated by temperature.

<b>Pathway or upstream regulator</b>	<b>P-value</b>
Unfolded Protein	2.79E-11
mTORC1	< 1 E-7
HSF1	1.39E-10
ERN1	1.29E-7

**table S2:** Statistical analysis of IPA software of the different pathways explored in this study

Gene symbol	Modulated by the flow	Modulated by the temperature	Fold change (Flow vs Static)	Fold change (40°C vs 37°C)
<i>EDNI</i>	✓	✗	0.4	1.3
<i>EDNRB</i>	✓	✗	3.7	1.1
<i>NOS3</i>	✗	✗	1.2	0.9
<i>ANGPT2</i>	✓	✗	0.3	0.7
<i>PTGS2</i>	✓	✗	2.4	1.0
<i>ICAM1</i>	✓	✗	0.3	0.7
<i>IL1RL1</i>	✓	✗	0.4	0.7
<i>SELE</i>	✓	✓	0.3	0.4
<i>VCAM1</i>	✓	✓	3.5	0.4
<i>NDRG1</i>	✓	✗	2.7	1.6
<i>NQO1</i>	✓	✗	2.2	0.9
<i>PPP1R15A</i>	✓	✗	0.5	0.8
<i>SOD1</i>	✗	✗	1.8	1.7
<i>SERPINE1</i>	✗	✗	1.7	1.1
<i>SERPINE2</i>	✓	✗	6.3	0.9
<i>THBD</i>	✓	✗	2.0	1.1
<i>BMP6</i>	✓	✗	0.3	0.8
<i>CCNB1</i>	✓	✗	0.4	1.0
<i>HEY2</i>	✓	✗	2.1	0.8
<i>ID3</i>	✓	✗	0.1	1.1
<i>JAG2</i>	✓	✗	0.4	1.0
<i>MMP2</i>	✓	✗	2.6	0.9
<i>SNAIL</i>	✗	✗	0.8	1.3

**table S3: Genes modulated by shear stress are not modulated by temperature.**

HCAECs were cultured under static or laminar-flow (10 dyne.cm<sup>2</sup>) conditions for 24h before exposure to mild hyperthermia (40°C vs 37°C) during 6h. For HCAECs cultured at 37°C, gene expression measured by RT-qPCR was calculated by normalization to static conditions (Fold change flow vs static). For HCAEC cultured in flow, gene expression measured by RT-qPCR was calculated by normalization to 37°C conditions (Fold change 40°C vs 37°C). Fold change greater than 2 (in green) mean that gene expression is up-regulated by flow or by temperature and fold change smaller than 0,5 (in red) mean that gene expression is down regulated by flow or by temperature. Fold change between 0.5 and 1.9 (in black) mean that the gene expression is not modulated. N=3 experiments for each condition.

<b>Gene symbol</b>	<b>Gene name</b>	<b>Primer reference</b>
<i>AHSA1</i>	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)	Hs00201602_m1
<i>ANGPT2</i>	Angiopoietin 2	Hs00169867_m1
<i>APLN</i>	Apelin	Hs00175572_m1
<i>BMP6</i>	Bone Morphogenetic Protein 6	Hs01099594_m1
<i>CCL2</i>	chemokine (C-C motif) ligand 2	Hs00234140_m1
<i>CCNB1</i>	Cyclin B1	Hs01030099_m1
<i>CIRBP</i>	Cold inducible RNA binding protein	Hs00989762_g1
<i>DNAJB9</i>	DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member B9	Hs01052402_m1
<i>EDN1</i>	Endothelin 1	Hs00174961_m1
<i>EDNRB</i>	Endothelin Receptor Type B	Hs00240747_m1
<i>EIF4A2</i>	Eukaryotic translation initiation factor 4A2	Hs00756996_g1
<i>ERN1</i>	Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1	Hs00980095_m1
<i>F2RL2</i>	Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	Hs00187982_m1
<i>FKBP4</i>	FK506 binding protein 4, 59kDa	Hs00427038_g1
<i>HEY2</i>	Hes Related Family BHLH Transcription Factor With YRPW Motif 2	Hs01012057_m1
<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1	Hs02800695_m1
<i>HSF1</i>	Heat Shock Factor 1	Hs01027616_g1
<i>HSP90AA1</i>	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1	Hs00743767_sH
<i>HSP90B1</i>	Heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1	Hs00427665_g1
<i>HSPA1A</i>	Heat shock 70kDa protein 1A	Hs00359163_s1
<i>HSPA1B</i>	Heat shock 70kDa protein 1B	Hs01040501_sH
<i>HSPA5</i>	Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)	Hs00607129_gH
<i>HSPH1</i>	Heat shock 105kDa/110kDa protein 1	Hs00971475_m1
<i>ICAM1</i>	Intercellular Adhesion Molecule 1	Hs00164932_m1



<i>ID3</i>	Inhibitor Of DNA Binding 3, HLH Protein	Hs00171409_m1
<i>IL1RL1</i>	Interleukin 1 Receptor Like 1	Hs00249384_m1
<i>IL7R</i>	Interleukin 7 receptor	Hs00902334_m1
<i>JAG2</i>	Jagged 2	Hs00171432_m1
<i>MMP2</i>	Matrix Metallopeptidase 2	Hs01548727_m1
<i>NDRG1</i>	N-Myc Downstream Regulated 1	Hs00608387_m1
<i>NOS3</i>	Nitric Oxide Synthase 3	Hs01574665_m1
<i>NQO1</i>	NAD(P)H:menadione oxidoreductase	Hs00168547_m1
<i>PPP1R15A</i>	Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A	Hs00169585_m1
<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2	Hs00153133_m1
<i>SDF2L1</i>	Stromal cell-derived factor 2-like 1	Hs00222786_m1
<i>SELE</i>	Selectin E	Hs00174057_m1
<i>SERPINE1</i>	Serpin Family E Member 1	Hs00167155_m1
<i>SERPINE2</i>	Serpin Family E Member 2	Hs00299953_m1
<i>SNAI1</i>	Snail Family Transcriptional Repressor 1	Hs00195591_m1
<i>SOD1</i>	Superoxide Dismutase 1	Hs00533490_m1
<i>STIP1</i>	Stress-induced phosphoprotein 1	Hs00428979_m1
<i>THBD</i>	Thrombomodulin	Hs00264920_s1
<i>VCAM1</i>	Vascular Cell Adhesion Molecule 1	Hs01003372_m1
<i>XBPIs</i>	X-Box Binding Protein 1 (spliced form)	Hs03929085_g1
<i>XBPIu</i>	X-Box Binding Protein 1 (unspliced form)	Hs02856596_m1

**table S4 : List and reference of probes used in RT-qPCR.**

**Acknowledgment** :

The PhD work of JV was supported by a CIFRE tri-partite contract between ANRT (Agence Nationale Recherche et Technology), Sanofi and INSERM.

Special thanks to Michel Didier and Franck Auger to have provided expertise support for microarray and pathway analysis. Thanks to Bertrand Leger to technical and expertise support for the development of flow experiments.

**Funding** : JV, FM, CR, GB, LL, PJ, SI are Sanofi's employees. GF, TN are INSERM employees. G.F. was supported by the Lefoulon-Delalande foundation (Paris, France), the European Union PRESTIGE program [2017-1-0032], and the RHU iVASC [#ANR-16-RHUS-00010]

**Author contributions** : JV has performed and conceptualize all experiments, collected and interpreted the data, and wrote the draft version of the manuscript. FM has help to perform microarray experiments and contributed to their analysis. CR and GB have performed the IPA analysis. LL and GF have brought guidance to experimental design. PJ has participated to the conception of the project. TN and SI have contributed equally to the design, the supervision and the validation of the research project.

**Competing interest** : The authors declare no competing interest

**Data and materials availability** : none