

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTÉ DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2023

N° 79

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Estelle ARCHER

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 17 Octobre 2023

**ÉTUDE DU RÔLE DU FACTEUR PLAQUETTAIRE 4 SUR LES FIBROBLASTES
CARDIAQUES ET LES CARDIOMYOCYTES EN CONDITIONS D'ISCHÉMIE-
REPERFUSION**

JURY

Présidente : Pr Véronique MAUPOIL-DAVID – Professeure des Universités – Faculté de pharmacie Tours

Membres :

Pr Fabrice IVANES – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier – Service de Cardiologie – CHRU Tours

Directrice de thèse : Pr Claire POUPLARD – Professeure des Universités – Praticien Hospitalier – Service d'Hématologie Hémostase – CHRU Tours

Co-directeur de thèse : Dr Jérôme ROLLIN – Chercheur – Service d'Hématologie Hémostase – CHRU Tours

ANNEE : 2022 - 2023

Directeur : Pr Denys BRAND

Directeur Adjoint : M. Matthieu JUSTE

Assesseurs : M. Gildas PRIE, Mme Mélanie BOUVIN PLEY, Mme Emilie ALLARD-VANNIER, M. Bruno GIRAudeau, Mme Claire POUPLARD

ENSEIGNANTS

12 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUDESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

6 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAudeau	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

36 MAITRES DE CONFÉRENCES

AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER (disponibilité)	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE

DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE
JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LOUDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SAHLI	Ramla	PHARMACOGNOSIE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUES & ÉPIDÉMIOLOGIE
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

3 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

3 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

POUPIN	Pierre	BIOSTATISTIQUES ET SANTE PUBLIQUE
RAMDANI	Yanis	IMMUNOLOGIE
TULOUP	Vianney	PHARMACIE CLINIQUE

3 ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche)

AMRANE	Dyhia	CHIMIE ORGANIQUE
MEHENNI	Lyes	CHIMIE ANALYTIQUE
VERGER	Alexis	PHARMACIE GALENIQUE

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

1 contrat d'enseignement

GERBIER (contrat enseig)	Soledad	ANGLAIS
--------------------------	---------	---------

3 CHARGÉS DE RECHERCHE

EPARDAUD	Mathieu	INRAE
MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date : 06/11/2023

L'étudiant Estelle ARCHER

*Le Doyen de la Faculté
Professeur Denys BRAND*

Remerciements

Aux membres du jury,

Je remercie la **Professeure Véronique MAUPOIL-DAVID** d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse et je la remercie pour son écoute et ses conseils qui ont participé à l'obtention de mon année-recherche.

Merci au **Professeur Fabrice IVANES** d'être présent dans mon jury et d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Votre avis en tant que clinicien et scientifique est important pour enrichir les discussions autour de ma thèse.

Je tiens à remercier ensuite la **Professeure Claire POUPLARD** pour son implication et son investissement depuis mon premier stage en tant qu'interne dans son service et jusqu'à l'obtention de cette année-recherche. Votre soutien a été précieux et je vous remercie d'avoir toujours su trouver du temps à m'accorder quand il le fallait. Je vous suis aussi reconnaissante d'avoir contribué à mon choix de spécialisation en hématologie-hémostase et de me permettre de rester encore quelques temps dans votre service après mon internat.

Je remercie ensuite le **Docteur Jérôme Rollin** pour son encadrement et sa disponibilité tout au long de cette année-recherche, pour son éveil et son enseignement scientifique rigoureux ainsi que ses relectures précieuses au fur et à mesure de l'écriture de cette thèse.

À mes proches,

À mes parents, **Christine et Bruno**, je veux vous dire merci de m'avoir donné toutes les clés en main pour arriver jusqu'ici et d'avoir respecté et soutenu mes choix tout au long de ces dernières années. Je sais la chance que j'ai de vous avoir comme parents et je vous souhaite de continuer à profiter de votre jeune retraite avec d'autres voyages encore.

À **Thibaut** mon grand frère et à **Cyrielle** ma sœur jumelle, je suis très fière de vous avoir pour frère et sœur et je sais que je peux compter sur vous. Thibaut merci de nous avoir supporté avec Cyrielle, souvent à 2 contre toi, et plus pragmatiquement merci m'avoir hébergé si souvent cette année. Cyrielle, même si avec les années on se ressemble plus comme des sœurs que comme des jumelles il nous reste cette connexion invisible et spéciale que la distance n'efface pas et qui nous reliera toujours.

J'ai une pensée émue pour mes grands-parents, ici et ailleurs, les souvenirs de vacances à vos côtés sont des souvenirs précieux que je n'oublierai jamais. Et à l'ensemble du reste de ma famille et ma marraine, je vous remercie pour tous ces moments partagés autour d'un bon repas qui ont été des moments de pause dans ces études il faut l'avouer un peu longue quand même.

À mes amies de (très) longues date, **Alice, Coralie, Mélanie, Charlotte**, je me suis éloignée géographiquement de vous ces dernières années mais je me réjouis de nos retrouvailles qui même si elles sont moins fréquentes ne changent en rien l'amitié qui nous lie.

À **Marine**, je garde en tête de très beaux souvenirs de voyage avec leur lot de péripéties aussi et un grand nombre de soirées sushis dont je ne me lasserai pas.

À **Léa, Jeanne et Amélie** rencontrées pendant nos études de pharma à Amiens ; ces années ont été plus joyeuses avec vous. Mimi et Léa, ces deux années de préparation du concours ont été intenses et notre choix de ville respectif n'a pas facilité nos retrouvailles mais je garde un souvenir incroyable de notre voyage post-concours aux Cyclades.

Au Moulagang, **Élise, Pauline, Romane et Mathilde**, co-interne ou non je retiens beaucoup de bons moments partagés autour d'un verre ou d'un café selon l'heure, vous êtes ma famille tourangelle. Mathilde, je ne sais pas par où commencer mais je sais que notre amitié ne s'arrêta pas à la fin de notre internat ; Pauline, je garde en mémoire entre autres notre courte coloc chez moi ; Romane, garde ton rire communicatif suivi d'une petite tape dans tes mains si vraiment c'était drôle ; Élise, je te souhaite encore pleins de voyages et merci de m'avoir emmené à la fourrière aussi.

À mes anciens co-interne et amis rencontrés pendant l'internat : **Inès**, tu es tellement plus que la meilleure co-VP ever ; **Nicolas**, merci pour ta générosité sans limite, tu as été un AHU formidable ; **Thomas** Perdue-Legendre, merci pour les petits tacles en stage ; **Laura**, merci pour les parties de gabo et ta gentillesse infinie ; **Thomas** Morel, merci pour nos échanges de musiques (parfois de merde) qui restent en tête toute l'après-midi ; **Thomas** Macé, merci pour la découverte de l'escalade ; **Pauline B., Hadjer, Nadège, Olivier, Guillaume, Pierre, Justine B., Justine C., Carla, Aline** merci pour les moments partagés à l'hôpital et en dehors. À **Marie-Noé** et **Soisic** qui ont rendu ce semestre à Orléans nettement plus agréable.

À l'équipe du T2i (future Ischemia je l'espère), merci à tous pour votre accueil et merci pour les parties de babyfoot aussi ! Un merci spécial à **Valéria** pour ton encadrement, ta patience et ta bienveillance ; à **Séverine, Johanna, Sandra** et **Simon**, pour votre aide et vos conseils ; Sandra, tu es une très belle rencontre et ne plus être dans le même bureau va me manquer.

Enfin je remercie l'ensemble du personnel des laboratoires dans lesquels j'ai effectué un semestre ou plus (la bactério Trousseau, la biochimie Orléans, l'immuno, l'hémato Bretonneau) et en particulier l'équipe du labo d'hémato à Trousseau : merci aux technicien(ne)s, secrétaires et aides-labo pour leur accompagnement, merci à **Caro, Ève-Anne et Nico** pour votre bonne humeur et vos réponses à mes questions et merci à **Laurent, JB et au Pr. Gruel** pour nos échanges et vos enseignements.

Table des matières

I.	INTRODUCTION	3
1.	ISCHEMIE-REPERFUSION CARDIAQUE.....	3
2.	REMODELAGE CARDIAQUE.....	5
3.	ASPECT THERAPEUTIQUE.....	7
4.	LES PLAQUETTES ET LE FACTEUR PLAQUETTAIRE 4.....	11
5.	OBJECTIFS	13
II.	MATERIEL ET METHODES.....	14
1.	CULTURE CELLULAIRE	14
a.	<i>Culture des fibroblastes cardiaques.....</i>	<i>14</i>
b.	<i>Culture des cardiomyocytes</i>	<i>15</i>
2.	TEST DE VIABILITE CELLULAIRE	15
3.	TRANSCRIPTION INVERSE ET PCR EN TEMPS REEL (RT-QPCR).....	16
a.	<i>Extraction des ARN</i>	<i>16</i>
b.	<i>Transcription inverse et PCR en temps réel.....</i>	<i>16</i>
4.	ANALYSE PROTEIQUE	18
a.	<i>Lyse cellulaire et dosage protéique</i>	<i>18</i>
b.	<i>Western-blot.....</i>	<i>18</i>
5.	ANTICORPS (AC) ANTI-FP4	19
a.	<i>Déglycosylation des anticorps.....</i>	<i>19</i>
b.	<i>Test immuno-enzymatique.....</i>	<i>19</i>
c.	<i>Test de libération de sérotonine radiomarquée.....</i>	<i>20</i>
6.	ANALYSE STATISTIQUE.....	21
III.	RESULTATS	22
1.	EFFET DU PF4 SUR LES FIBROBLASTES CARDIAQUES	22
a.	<i>Condition de normoxie.....</i>	<i>22</i>
b.	<i>Condition d'ischémie-reperfusion simulée</i>	<i>24</i>
2.	INFLUENCE DU FP4 SUR LA VIABILITE DES HCF-AV ET DES CARDIOMYOCYTES	26
a.	<i>Fibroblastes cardiaques (HCF-av)</i>	<i>26</i>
b.	<i>Cardiomyocytes (lignée AC16).....</i>	<i>27</i>
3.	EFFET DES AC ANTI-FP4	28
IV.	DISCUSSION ET CONCLUSION	29
V.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	34

Liste des figures et tableaux

Figures

Figure 1 : altérations métaboliques et mécanismes moléculaires impliqués dans les lésions d'ischémie-reperfusion. Modifié d'après Bevington (1) et Perico (2).

Figure 2 : diversité fonctionnelle des fibroblastes dans le myocarde en post-infarctus.

Figure 3 : traitements actuels et futurs de l'infarctus du myocarde et du remodelage post-infarctus d'après Frantz et al.

Figure 4 : résumé des médiateurs dérivés des plaquettes et de leur influence sur les lésions d'ischémie-reperfusion du myocarde.

Figure 5 : effet du FP4 sur l'expression des gènes *ACTA2* et *COL1A1* par les fibroblastes cardiaques après 24h en normoxie.

Figure 6 : effet des différentes conditions atmosphériques de culture et du FP4 sur l'expression des gènes *ACTA2* et *COL1A1* par les fibroblastes cardiaques.

Figure 7 : effet du FP4 recombinant (FP4r) ou purifié (FP4p) à 5 µg/mL sur la viabilité des fibroblastes cardiaques (HCF).

Figure 8 : effet du FP4 recombinant (FP4r) ou purifié (FP4p) à 5 µg/mL sur la viabilité des cardiomyocytes (AC16)

Figure 9 : effet du FP4 et des Ac anti-FP4 déglycosylés sur l'expression des gènes *ACTA2* et *COL1A1* par les fibroblastes cardiaques après 24h en normoxie en présence de FP4 purifié à 5 µg/mL +/- Ac (d1E12, d1C12 ou d5B9) à 50 µg/mL.

Figure 10 : catégories de fibroblastes cardiaques résidents. Modifié d'après Tallquist MD, Molkentin JD (3).

Tableaux

Tableau I : programme de qPCR.

Tableau II : séquences des couples d'amorces de qPCR.

Liste des abréviations

α SMA : *α smooth muscle actin*

Ac : anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

Ag : antigène

ARN : acide ribonucléique

CD : *cluster de différenciation*

DAMPs : *damage-associated molecular patterns*

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DPBS : *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*

EDTA : *éthylène diamine tetra-acetic acid*

Fc : fragment constant des immunoglobulines

Fc γ R : récepteur cellulaire de type gamma au fragment Fc

FT : facteur tissulaire

FVW : facteur Von Willebrand

GM-CSF : *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HCF-av : *human cardiac fibroblast adult ventricular*

Ig : immunoglobuline

MMP : métalloprotéinase matricielle

PBS : *phosphate-buffered saline*

PF4 : facteur 4 plaquettaire

qPCR : *quantitative polymerase chain reaction*

ROS : *reactive oxygen species*

RT : *reverse transcription*

SVF : sérum de veau fœtal

TGF β : *tissu growth factor β*

TNF α : *tumor necrosis factor alpha*

I. INTRODUCTION

1. Ischémie-reperfusion cardiaque

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde avec 8,9 millions de décès en 2019 et la deuxième cause en France (4). Parmi les maladies cardiovasculaires, l'infarctus du myocarde (IDM) touche environ 120 000 personnes chaque année dans notre pays. Dix pourcents des patients décèdent à la phase aiguë et la mortalité à 12 mois est d'environ 15% (données HAS).

L'IDM résulte de la formation d'un thrombus secondaire à la rupture ou à l'érosion d'une plaque d'athérosclérose provoquant une occlusion aiguë d'une artère coronaire. Ce thrombus est donc responsable d'une ischémie myocardique pouvant évoluer jusqu'à la nécrose en l'absence d'une prise en charge rapide. En effet il obstrue la lumière artérielle entraînant une réduction voire une interruption du débit sanguin dans le tissu myocardique correspondant à une situation d'ischémie. En résulte une diminution des apports en oxygène et nutriments au niveau cellulaire associée à une incapacité à éliminer certains métabolites ce qui aboutit à la mort cellulaire : ce sont les **lésions d'ischémie**.

Le traitement de l'ischémie consiste à rétablir dans les meilleurs délais la revascularisation du tissu cardiaque pour limiter les lésions myocardiques d'ischémie. Cette phase de reperfusion permet de nouveau un apport en oxygène et en nutriments au tissu lésé. Elle est paradoxalement responsable d'une augmentation des dommages tissulaires et de mort cellulaire avec pour conséquence une extension des lésions : ce sont les **lésions de reperfusion** (5).

Ces lésions tissulaires induites par l'ischémie et la reperfusion sont responsables de la morbi-mortalité de nombreuses pathologies. Ces pathologies peuvent faire suite à la formation d'un thrombus comme l'IDM ou l'accident vasculaire cérébral ou sont liées à un défaut de perfusion tissulaire dans le choc septique par exemple ou encore secondaire au clampage artériel lors d'une transplantation d'organe.

Les mécanismes impliqués dans ces lésions d'ischémie-reperfusion (Figure 1) incluent un stress oxydatif, une surcharge calcique intracellulaire ou des variations de pH. Des

dysfonctions mitochondriales sont également citées entraînant un défaut de synthèse d'ATP, une augmentation de la perméabilité mitochondriale, elle-même à l'origine de la production de ROS ou de l'activation de voies pro-apoptotiques (6).

En effet, l'ischémie et la reperfusion induisent la mort cellulaire par nécrose et les cellules nécrotiques sont fortement immunostimulantes conduisant à une inflammation aiguë stérile au niveau du site d'ischémie. Cette réponse immunitaire stérile inclue le recrutement et l'activation des cellules du système de l'immunité innée et adaptative, la libération de cytokines ainsi que l'activation du système du complément.

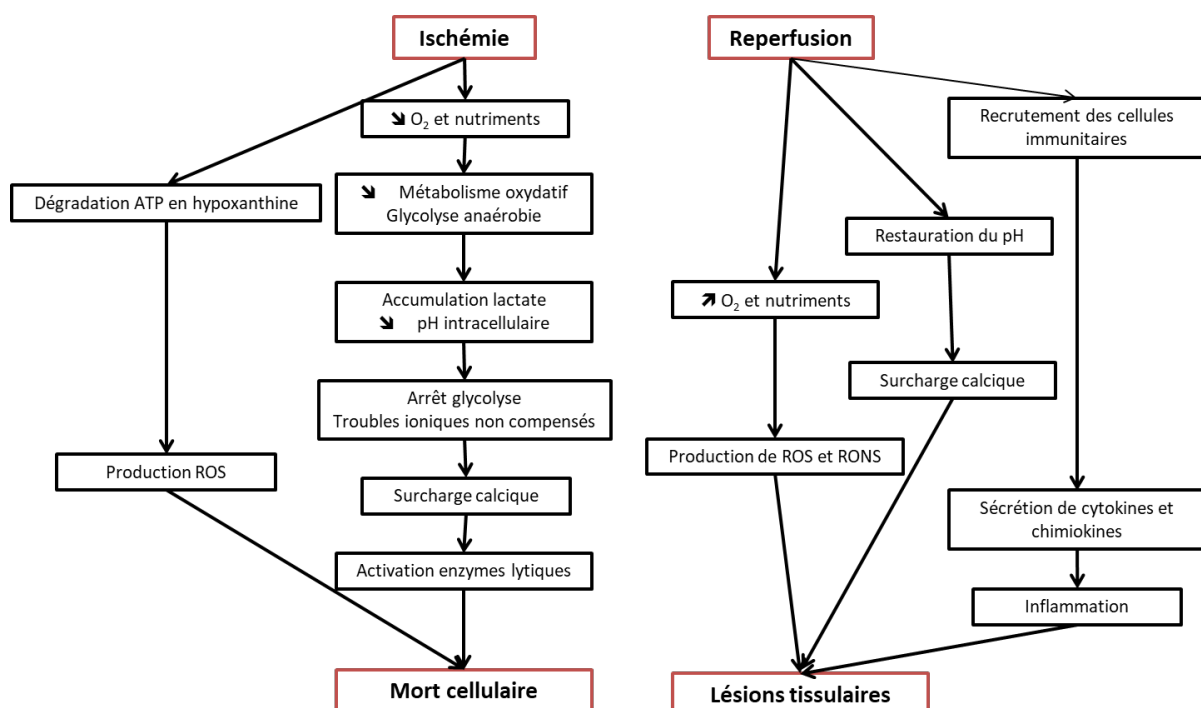


Figure 1. Altérations métaboliques et mécanismes moléculaires impliqués dans les lésions d'ischémie-reperfusion. Modifié d'après Bevington (1) et Perico (2).

Les conséquences de ces lésions d'ischémie-reperfusion sont un remodelage cardiaque post-infarctus avec une perte ou une hypertrophie de cardiomyocytes et l'apparition d'une fibrose cardiaque. Cela entraînera une dysfonction ventriculaire, un changement dans l'architecture cardiaque et une insuffisance cardiaque *in fine*.

2. Remodelage cardiaque

Le remodelage désigne de façon générale un ensemble de modifications cellulaires, moléculaires et génétiques d'un organe ou d'un tissu en réponse à un (des) signal(aux) de leur environnement. Ces adaptations sont possibles grâce à la plasticité des tissus permettant aux cellules de modifier l'expression de leur gène en réponse à un stimuli.

Le remodelage cardiaque post-infarctus commence dès les premières minutes suivant l'infarctus et se poursuit pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois. Il est composé de 3 phases distinctes mais qui se chevauchent dans le temps (Figure 2). Si le remodelage cardiaque est dans un premier temps bénéfique permettant le maintien du débit cardiaque en augmentant le volume cardiaque, il sera finalement responsable chez certains patients d'une fibrose myocardique et l'insuffisance cardiaque en sera la conséquence.

Le point de départ du remodelage cardiaque est la mort cellulaire par apoptose et nécrose (7). La nécrose entraîne une réponse inflammatoire qui est la première phase du remodelage incluant le recrutement de polynucléaires neutrophiles ou de macrophages essentiellement pour phagocyter les débris cellulaires des cardiomyocytes. Il est observé une perte massive des cardiomyocytes par nécrose au niveau de la zone non-perfusée faisant suite à l'infarctus. Il en résulte une perte de fonction contractile du myocarde suivie d'une hypertrophie des cardiomyocytes, dont le volume s'agrandit par une augmentation de leur longueur ou de leur épaisseur selon le type de surcharge mécanique subit, participant au maintien du débit cardiaque. Le ventricule gauche se dilate également à la suite de la mort des cardiomyocytes pour maintenir son volume d'éjection et cela de façon proportionnelle avec la taille de la zone infarctée (8).

Lors de la seconde phase, dite proliférative, la présence de nouveaux fibroblastes cardiaques, qui vont se différencier en myofibroblastes, va permettre la réparation fibrotique de la zone nécrosée par la synthèse de la matrice extracellulaire (MEC) et ainsi préserver l'intégrité structurale. La matrice extracellulaire confère en effet un cadre structurel au myocarde permettant des interactions entre les différentes cellules grâce aux molécules d'adhésion (intégrines, cadhérines entre autres). Son remodelage est orchestré par les métalloprotéinases de la matrice (MMP) qui vont dès les premiers instants après l'infarctus dégrader la matrice extracellulaire afin de permettre l'infiltration des cellules inflammatoires

et des macrophages et la détersion des cardiomyocytes. Trois zones dans l'infarctus se distinguent avec au centre une zone nécrosée entourée d'une zone de macrophages et myofibroblastes puis en périphérie les myofibroblastes prédominent (8).

Enfin pendant la troisième phase, dite de maturation, la dilatation de la zone non-infarctée se poursuit ainsi que l'hypertrophie des cardiomyocytes et le changement phénotypique des fibroblastes cardiaques.

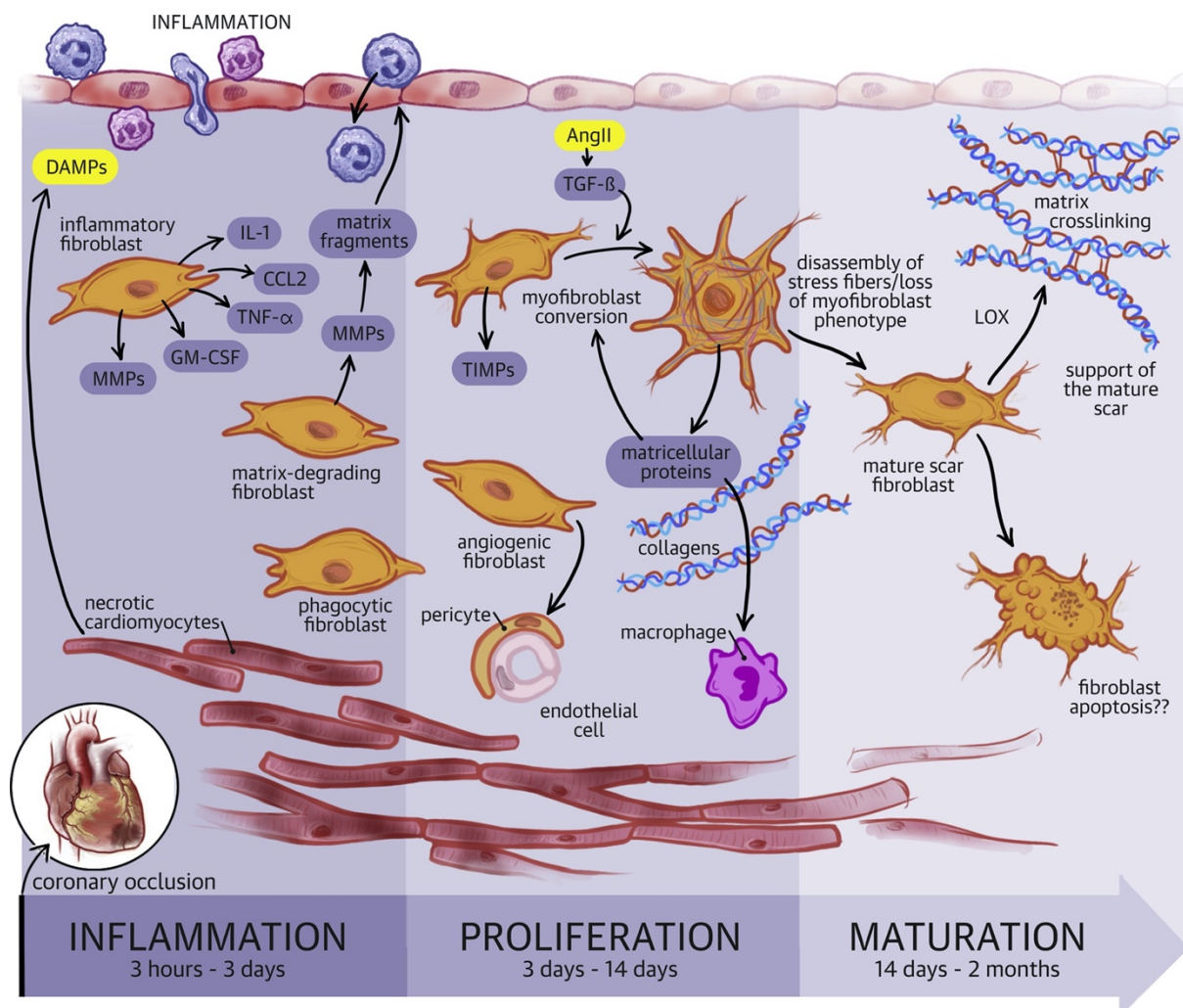


Figure 2. Diversité fonctionnelle des fibroblastes dans le myocarde en post-infarctus d'après Humeres and Frangogiannis (9)

Les fibroblastes cardiaques sont des cellules ne présentant pas de marqueurs spécifiques communs identifiables et dont la proportion au sein du tissu myocardique est donc

difficilement évaluable même s'il semblerait qu'ils ne soient pas le type cellulaire majoritaire en condition physiologique (3). Néanmoins ils participent pleinement au processus de remodelage cardiaque à chaque étape de celui-ci (Figure 2). Pendant la phase inflammatoire, les fibroblastes cardiaques sécrètent des cytokines (par exemple IL-1, TNF- α) et des chimiokines sous l'influence de signaux de danger appelés *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) relargués par les cardiomyocytes nécrosés. Ils pourraient participer au recrutement et à l'activation des leucocytes par la libération de facteur de croissance des granulocytes et des macrophages (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) également (10). Ils sont impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire par la libération de métalloprotéinases matricielles. Une fois les débris cellulaires phagocytés, des signaux anti-inflammatoires sont libérés et la phase proliférative s'installe avec le recrutement de nouveaux fibroblastes puis finalement leur différenciation en myofibroblastes avec la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire. Après la sécrétion des protéines de la matrice extracellulaire et lors de la phase de maturation, la cicatrice se consolide par l'action d'enzymes de réticulation de la matrice et le nombre de myofibroblastes diminue pour retrouver un phénotype plus quiescent (9).

Dans ce contexte d'infarctus du myocarde, il est donc primordial pour le patient de réduire la mort cellulaire des cardiomyocytes, afin de conserver leurs fonctions électriques et contractiles, bien corrélée à la survenue d'événements ultérieurs tels que des arythmies ventriculaires, une insuffisance cardiaque. Il est également important de limiter la formation de fibrose myocardique, médiée par les myofibroblastes cardiaques, dérivés des fibroblastes cardiaques afin de limiter la survenue d'événements indésirables cardiaques.

3. Aspect thérapeutique

L'infarctus du myocarde et le remodelage post-infarctus sont la première cause d'insuffisance cardiaque (11) elle-même étant une cause majeure de morbi-mortalité.

Le traitement à la phase aiguë de syndrome coronarien aigu avec sus-décalage du segment ST (SCA ST+) est la reperfusion le plus rapidement possible soit par angioplastie soit par fibrinolyse (12). L'angioplastie est recommandée en première intention lorsque le diagnostic

est posé dans les 12h suivant l'apparition des symptômes, sauf si elle n'est pas réalisable dans les 2h suivant le diagnostic, situation dans laquelle une fibrinolyse immédiate sera indiquée. Si les symptômes sont présents depuis plus de 12h et jusqu'à 48h, l'angioplastie reste la stratégie de reperfusion de choix peu importe son délai de réalisation même si les preuves sont moins évidentes que lorsque les symptômes sont présents depuis moins de 12h.

Toujours selon les recommandations de 2023 de l'European Society of Cardiology (ESC) (12), la reperfusion s'accompagne d'un traitement médicamenteux composé :

- D'anticoagulant (héparine non fractionnée en première intention, bivalirudine ou enoxaparine), dès la prise en charge initiale et de préférence par voie parentérale, qu'il n'est dans la plupart des cas pas nécessaire de continuer après l'angioplastie ;
- D'une double anti-agrégation plaquettaire, par défaut l'aspirine associé à un anti-P2Y12 (administration d'une dose de charge puis dose d'entretien), qui elle sera poursuivie pendant 1 an voire 6 mois en cas de risque hémorragique élevé (12) ;
- D'un bêtabloquant, de préférence cardiosélectif, poursuivi au long cours en cas d'insuffisance cardiaque ou de fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) $\leq 40\%$;
- D'une statine instaurée dès que possible et continuée au long cours avec pour objectif de diminuer le taux de *low-density lipoprotein* (LDL)-cholestérol ;
- D'un inhibiteur du système rénine-angiotensine-aldostérone (inhibiteur de l'enzyme de conversion ou si mal toléré antagoniste des récepteurs de l'angiotensine II) instauré dans les 24 premières heures suivant l'infarctus chez les patients souffrant d'une insuffisance cardiaque, d'une dysfonction systolique ventriculaire gauche, de diabète ou ceux ayant un antécédent d'infarctus
- D'un antagoniste du récepteur au minéralocorticoïde chez les patients ayant une insuffisance cardiaque ou un diabète et une FEVG $\leq 40\%$ recevant déjà un inhibiteur de l'enzyme de conversion et un bêtabloquant à condition qu'ils ne présentent pas d'insuffisance rénale ou d'hyperkaliémie.

Ces traitements pharmacologiques s'accompagnent de mesures hygiéno-diététiques comme l'adoption d'un régime alimentaire plus sain, l'arrêt du tabac ou la pratique d'une activité physique régulière adaptée (figure 3).

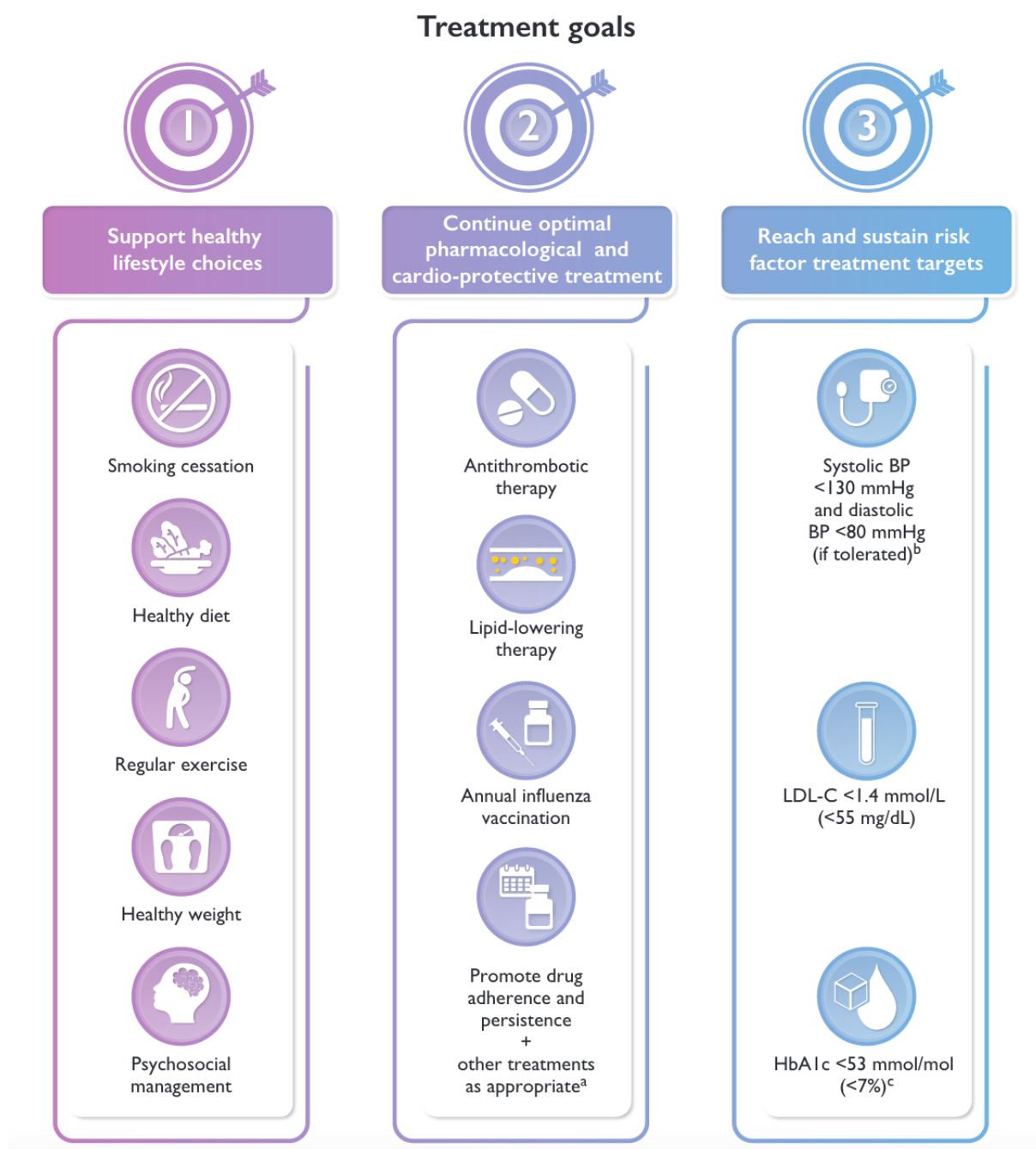


Figure 3. Prise en charge à long terme après un syndrome coronarien aigu (12). *Systolic BP*, pression artérielle systolique ; HbA1c, hémoglobine glyquée ; LDL-C, cholestérol à lipoprotéines de faible densité. ^aVoir le tableau 16 des recommandations de l'ESC (12) pour les autres traitements pharmacologiques après un SCA. ^bPour les patients âgés de ≥ 70 ans, la cible systolique devrait être < 140 mmHg et jusqu'à 130 mmHg si elle est tolérée. ^cPour les patients souffrant de diabète de type II.

L'utilisation d'un bêtabloquant, d'un inhibiteur du système rénine-angiotensine-aldostérone et d'un antagoniste du récepteur au minéralocorticoïde a notamment pour objectif de limiter la progression de la fibrose cardiaque post-infarctus (13).

Le système nerveux sympathique joue un rôle dans le remodelage cardiaque par la présence des récepteurs adrénergiques β_1 , β_2 , β_3 et α_1 . L'activation du système sympathique favorise la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, la libération des progéniteurs hématopoïétiques puis attire les polynucléaires neutrophiles au site de lésion. Elle a aussi une action pro-apoptotique sur les cardiomyocytes ce qui pourra entraîner une augmentation la taille de la zone infarctée (14). Il a été montré dans un modèle murin qu'une absence d'expression du récepteur β_2 , majoritairement exprimé par les cellules non-cardiomyocytes (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules immunitaires), diminue l'hypertrophie, la mortalité des cardiomyocytes et la fibrose cardiaque (15). Les bêtabloquants sont par conséquent indiqués en post-infarctus.

Le système rénine-angiotensine-aldostérone joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'équilibre hydrosodé, la régulation de la pression artérielle et l'homéostasie cardiovasculaire. Par ailleurs, son implication dans le développement et la progression des lésions d'ischémie-reperfusion post-infarctus est étudiée depuis plusieurs décennies (16). La rénine, point de départ du système, est synthétisée par les cellules juxtaglomérulaires rénales en cas de diminution de la concentration en chlorure de sodium, de diminution de la pression de perfusion rénale ou d'activation des récepteurs β -adrénergiques des cellules juxtaglomérulaires par les catécholamines. L'angiotensine II, effecteur principal du système rénine-angiotensine-aldostérone, entraîne un dépôt de collagène, une hypertrophie et une hyperplasie des cardiomyocytes et une augmentation de la masse du ventricule gauche (17). L'angiotensine II stimule la sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénaliennes et l'aldostérone elle-même induit la synthèse de collagène et la prolifération des fibroblastes (18).

4. Les plaquettes et le facteur plaquettaire 4

La situation d'ischémie/reperfusion (I/R) associée à un infarctus du myocarde reperfusé induit une activation plaquettaire massive et la libération, dans la circulation sanguine, du contenu de leurs granules intracytoplasmiques. Au-delà de leur rôle principal dans l'hémostase, les plaquettes sont également impliquées de manière importante dans la réponse inflammatoire associée aux lésions d'I/R et participent notamment au développement d'une fibrose tissulaire. En effet, les granules intracytoplasmiques contiennent de nombreuses protéines comme le facteur de croissance transformant β (TGF β), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), qui sont connues pour participer à la fibrose tissulaire. A cet égard, le TGF β est considéré comme le principal moteur de la fibrose tissulaire. Des stratégies expérimentales ciblant le TGF β 1 ont cependant montré des effets secondaires significatifs.

Parmi les chimiokines libérées par les plaquettes activées le FP4, également appelé CXCL4 (chemokine ligand 4), est l'une des plus abondantes. Cette chimiokine, constituée de 70 acides aminés, circulant sous forme tétramérique, est synthétisée par les mégacaryocytes et est en majorité retrouvée dans les granules alpha des plaquettes où elle représente 25% du contenu protéique. Les hélices alpha et les résidus lysine exprimés à l'extérieur du tétramère de FP4 forment un anneau de charges positives comprenant les résidus lysines et arginine. Cette conformation explique que le FP4 peut se lier avec de nombreuses molécules chargées négativement, ou polyanions, comme les glycosaminoglycanes (GAGs), sulfates naturels comprennent notamment les chondroïtines sulfate (CS), les héparanes sulfate (HS), et les héparines utilisées en thérapeutique. Outre les GAGs, il a été montré que le FP4 interagit aussi avec l'ADN et l'ARN. En se liant avec une grande affinité aux molécules de type héparine, le FP4 inhibe l'activité de l'antithrombine III, favorisant ainsi la coagulation. Le PF4 possède également une activité anti-angiogénique en inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales. D'autre part, il est impliqué dans l'hématopoïèse par le maintien de la quiescence des cellules souches hématopoïétiques et l'inhibition de la mégacaryopoïèse.

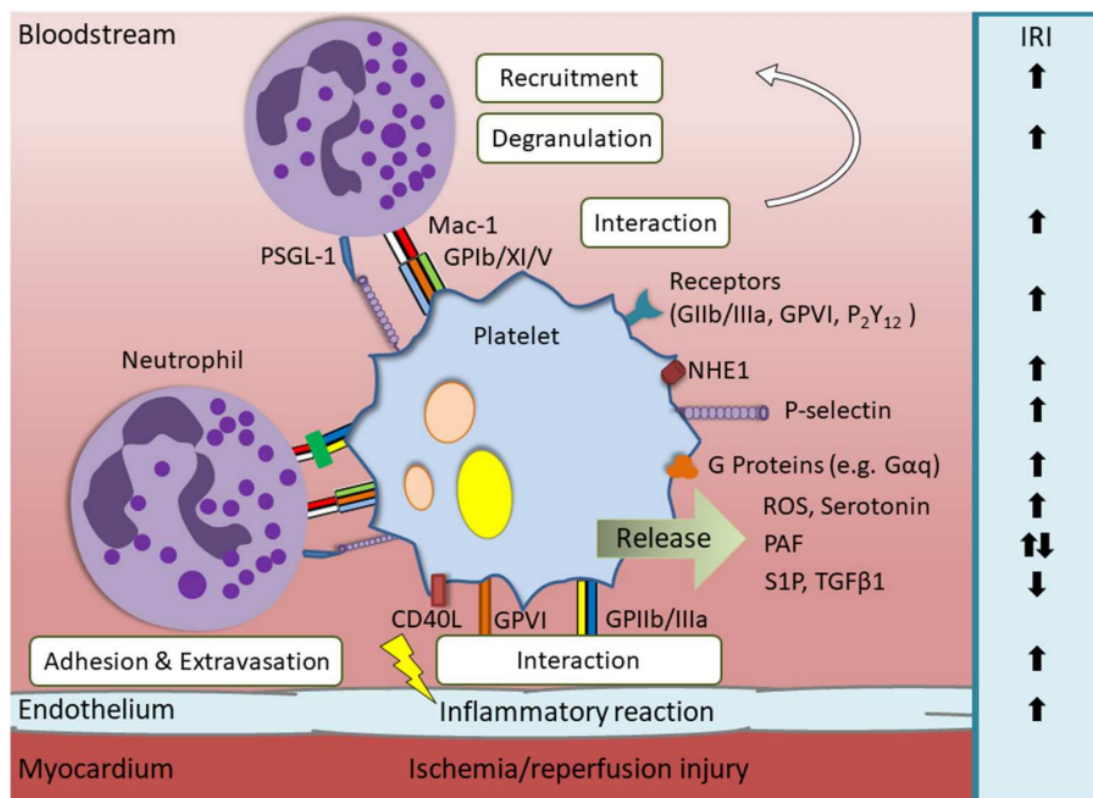


Figure 4. Résumé des médiateurs dérivés des plaquettes et de leur influence sur les lésions d'ischémie-reperfusion du myocarde (19).

Plusieurs études suggèrent que le FP4 pourrait favoriser la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes avec un phénotype pro-fibrotique dans des modèles pulmonaire et cutané (20). Le FP4, par la formation d'hétérodimères avec une chimiokine CCL5 (RANTES), favorise le recrutement des monocytes au niveau de l'endothélium et modifie leur différenciation en induisant un phénotype pro-inflammatoire et profibrotique. En effet, son rôle dans la fibrose a été mis en évidence dans la sclérodémie systémique où la concentration en FP4 était fortement corrélée au degré de fibrose pulmonaire et cutanée. De plus, une étude récente a montré que les souris déficientes en CXCL4 sont moins à risque de développer une fibrose cutanée et pulmonaire (20). Le papier de l'équipe de Kramann (21) va également dans ce sens et constate que les plaquettes favorisent la différenciation des macrophages SPP1+ (*secreted phosphoprotein 1*) profibrotique de manière FP4-dépendante. Ces différentes études ont ainsi confirmé l'impact du FP4 dans la différenciation des fibroblastes vers un phénotype pro-fibrotique et cette chimiokine pourrait ainsi constituer une nouvelle cible thérapeutique

comme cela a été récemment proposé dans la fibrose pulmonaire (20). Cependant, très peu d'études se sont intéressées au rôle du FP4 dans le remodelage du myocarde en condition d'I/R, et aux mécanismes moléculaires sous-jacents. Il a néanmoins été montré que la perfusion de FP4 exogène perturbe la réparation du cœur infarcté en inhibant la phagocytose des macrophages et en augmentant les niveaux de métalloprotéinases matricielles (MMP).

Dans ce contexte, le FP4 pourrait être une cible thérapeutique intéressante pour réduire la fibrose cardiaque. A cet égard, notre équipe a développé 4 anticorps chimériques anti-FP4 humain présentant des spécificités différentes, trois (1E12, 1C12 et 2E1) peuvent se lier au FP4 natif tandis que l'anticorps 5B9 reconnaît uniquement un complexe formé de FP4 et de glycosaminoglycanes (22,23).

5. Objectifs

Dans ce contexte le projet de ce travail de thèse a pour but :

- D'évaluer l'effet du FP4, dans des conditions de normoxie et d'ischémie-reperfusion simulée, sur la différenciation des fibroblastes cardiaques vers un phénotype myofibroblastique pro-fibrotique.
- D'étudier l'impact du FP4 sur la viabilité des fibroblastes cardiaques et des cardiomyocytes dans les conditions d'ischémie-reperfusion
- D'étudier si les anticorps monoclonaux chimérique anti-FP4 que nous avons développés au laboratoire peuvent moduler les effets du FP4 sur les fibroblastes cardiaques.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Culture cellulaire

a. Culture des fibroblastes cardiaques

Des fibroblastes cardiaques humains issus de ventricules adultes (HCF-av, #6310-SC, ScienCell Research Laboratories, San Diego, USA) sont utilisés entre le passage 3 et 5. Les fibroblastes sont cultivées sur de la poly-lysine (Poly-L-lysine 0.1 % (w/v) dans H₂O – Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et dans un milieu de culture constitué d'une base FM-2 (Fibroblast Medium-2, ScienCell™) contenant 5 % de sérum de veau fœtal (Fetal Bovine Serum, ScienCell™), 1 % d'antibiotiques : pénicilline G et streptomycine (Penicillin/Streptomycin Solution, ScienCell™) et 1 % de facteurs de croissance fibroblastique (Fibroblast Growth Supplement-2, ScienCell™). Les fibroblastes sont détachés des flasques d'entretien en utilisant de la trypsine (0.25 % Trypsin-EDTA, Gibco™, ThermoFisher Scientific). Le milieu de culture est retiré de la flasque avant d'ajouter la trypsine et de placer celle-ci à incuber pendant 5 minutes à 37°C. Une fois les cellules détachées, l'action de la trypsine est stoppée par l'ajout de milieu de culture contenant du sérum de veau fœtal. Les fibroblastes peuvent alors êtreensemencés dans de nouvelles flasques d'entretien ou à 2 x 10⁵ cellules/puits dans des plaques P12 préalablement coatées avec de la poly-lysine (Poly-L-lysine 0.1 % (w/v) dans H₂O). Les fibroblastes ensemencés dans les plaques sont incubés 12h à 37°C dans l'incubateur en normoxie avant de subir un cycle d'ischémie/reperfusion simulé.

Pour la phase d'ischémie qui varie entre 1h et 5h, le milieu de culture est remplacé par du DPBS avec chlorure de calcium et chlorure de magnésium (Gibco™ Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Danemark) de façon à priver les cellules de nutriments et les plaques sont placées dans une chambre à hypoxie (INVIVO2 200, Ruskinn Technology) à 37°C avec 1 % d'O₂, 94 % de N₂ et 5 % de CO₂. A la fin de la phase d'ischémie, les cellules sont incubées dans un milieu constitué de DMEM high glucose (4,5 g/L de glucose, Gibco™ ThermoFisher Scientific) auquel nous ajoutons 10% d'antibiotiques (Penicillin/Streptomycin Solution, ScienCell™) avec ou sans TGFβ1 (utilisé contrôle positif, Sigma-Aldrich) ou FP4 humain purifié (Hyphen BioMed, Neuville-Sur-Oise, France) ou recombinant (Stago, Asnières-sur-Seine, France) puis transférées dans une étuve à atmosphère humidifiée avec 5 % CO₂ à 37°C pendant 24h pour mimer la reperfusion. Après 24h, une extraction d'ARN et/ou de protéine a été réalisée.

b. Culture des cardiomyocytes

La lignée de cardiomyocyte AC16 (ATCC) est cultivée dans un milieu constitué de DMEM F12 (dominique Dutscher, Bernolsheim, France) additionné de 1,5 % de HEPES 1M (PAN-Biotech, Aidenbach, Allemagne), 1 % de D-Glucose (Sigma-Aldrich), 1,25 % de glutamine (dominique Dutscher) et 10 % SVF (Sigma-Aldrich). Les cardiomyocytes sont détachés selon le même protocole que les fibroblastes avec de la trypsine et sont ensemencés dans de nouvelles flasques d'entretien ou à 2×10^5 cellules/puits dans des plaques P12. Les cardiomyocytes ensemencés dans les plaques sont incubés 12h à 37°C dans l'étuve à atmosphère humidifiée avec 5 % de CO₂ avant de subir un cycle d'ischémie/reperfusion simulé.

Pendant les 5h d'ischémie dans la chambre à hypoxie, le milieu de culture est remplacé par du DPBS avec Ca²⁺ et Mg²⁺. Pour la phase de reperfusion les cellules sont incubées dans le même milieu de culture sans SVF et placées dans l'étuve à atmosphère humidifiée avec 5 % de CO₂ à 37°C pendant 24h. Le TGFβ1 ou le FP4 sont ajoutés au moment de la phase de reperfusion. Après 24h d'incubation, la viabilité des cardiomyocytes est évaluée.

2. Test de viabilité cellulaire

L'effet du PF4 sur la viabilité cellulaire a été évalué à l'aide du kit annexine V-FITC (isothiocyanate de fluorescéine) PI (iodure de propidium) (BD Biosciences, Erembodegem, Belgique). L'annexine V conjuguée au FITC marque la phosphatidylsérine, phospholipide présent sur le feuillet interne de la membrane cellulaire, qui est externalisé lors du processus d'apoptose. Le PI est un agent intercalant qui se lie à l'ADN des cellules mortes uniquement, les cellules vivantes étant imperméables à ce marqueur. Selon les instructions du fournisseur nous avons suspendu le culot de 2×10^5 cellules (fibroblastes ou cardiomyocytes) dans le tampon fourni ramené à 1X et incubé 15 minutes à l'obscurité à température ambiante avec l'annexine V-FITC et le PI. Les tubes sont ensuite prêts à être analysés par le cytomètre ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission FITC}} = 519 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission PI}} = 617 \text{ nm}$; automate : BD FACSCanto™ Flow Cytometer, BD Biosciences) dans l'heure suivante.

3. Transcription inverse et PCR en temps réel (RT-qPCR)

a. Extraction des ARN

Après 24h de reperfusion, le milieu de culture est retiré et les puits sont lavés avec du DPBS sans calcium ni magnésium (dominique Dutscher) puis, 500 µL de TRIzol (TRIzol™ Reagent, Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, Etats-Unis) sont ajoutés dans chaque puits de façon à lyser les membranes cellulaires. Après 5 minutes, 100 µL de chloroforme sont ajoutés pour chaque condition, puis les échantillons sont centrifugés pendant 15 minutes à 12000g à +4°C. La phase aqueuse contenant l'ARN est récupérée et 200 µL d'isopropanol et 1 µL de glycogène (Sigma-Aldrich) sont ajoutés avant centrifugation à 12000g pendant 15 min à +4°C. Cette étape permet de précipiter l'ARN, qui est ensuite re-suspendu dans 500µL d'éthanol 75%. L'échantillon est vortexé puis centrifugé à 7500g pendant 5 minutes à +4°C. Après un second lavage, l'ARN est re-suspendu dans 15 µL d'eau RNase free (Fisher BioReagents, ThermoFisher Scientific) puis les échantillons sont dosés par spectrophotométrie à l'aide d'un NanoDrop (ThermoScientific™). Un rapport $A_{260/280} > 1,8$ et un rapport $A_{260/230} > 1,6$ sont considérés comme acceptable pour réaliser la RT-qPCR. Les échantillons sont congelés à -80°C avant la RT-qPCR.

b. Transcription inverse et PCR en temps réel

Lors de l'étape de la reverse transcription le kit PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time, Takara) a été utilisé. Sur de la glace, et selon les recommandations du fournisseur 6 µL de PrimeScript Buffer, 1,5 µL d'Oligo dT Primer (50 µM) + 1,5 µL de Random 6 meres (100 µM) et 1,5 µL d'enzyme (PrimeScript RT Enzyme Mix I, Takara) sont ajouté à chaque échantillon. Puis les échantillons d'ARN sont ajoutés ajustés à la concentration de 50 ng/mL pour un volume final de 30 µL.

Les microtubes sont placés dans le thermocycleur (Astercycler® nexus – Eppendorf). Le programme suivant est utilisé :

- 37°C 15min* (Reverse transcription)
- 85°C 5 sec (Inactivation de la reverse transcriptase par la chaleur)
- 4°C

Les échantillons d'ADN complémentaires (ADNc) sont utilisés soit immédiatement soit ils sont stockés à -80°C.

Pour la PCR, les amorces des gènes d'intérêt et du gène de référence Hprt1 (Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1) sont utilisées à la concentration de 10 µM (Tableau 2). Nous préparons un mix de PCR par gène avec l'amorce sens (0,5 µL) et celle anti-sens (0,5 µL) du gène, l'eau sans DNase ni RNase (Fisher BioReagents, ThermoFisher Scientific) et le SYBR Green (TB Green Premix Ex Taq, Takara) ajouté au dernier moment (1X). Sur de la glace, le mix puis les échantillons d'ADNc (1 µL) sont déposés sur la plaque de PCR selon le plan de plaque établi pour un volume final de 10 µL. La plaque est ensuite centrifugée à 2000g pendant 2 min à +4°C.

La qPCR est réalisée sur l'appareil CFX ConnectReal Time System (Bio-Rad) et le programme utilisé est décrit dans le tableau 1.

Tableau I : programme de qPCR.

Etape 1 : Activation	95°C 30sec
Etape 2 : PCR	GOTO : 39 (40 cycles)
- Dénaturation des brins	95°C 5sec
- Hybridation des amorces / Elongation	Tm de l'amorce (60°C) 30sec
Etape 3 : Courbe de fusion	65 à 95°C (augmentation de 0,5°C/5sec)

Les résultats sont exprimés selon la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ où le Ct correspond au Cycle Threshold, et $\Delta\Delta Ct = [(Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{gène de référence}}) \text{ échantillon traité}] - [(Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{gène de référence}}) \text{ échantillon contrôle}]$.

Tableau II : séquences des couples d'amorces de qPCR.

Gène	Protéine	Séquence Forward 5'-3'	Séquence Reverse 5'-3'
HPRT1	Hprt1	TTGCTGACCTGCTGGATTAC	TATGTCCCCTGTTGACTGGT
ACTA2	αSMA	ACCCGATAGAACATGGCATC	CATACATGGCTGGGACATTG
COL1A1	Collagène I	GATTCCCTGGACCTAAAGGTGC	AGCCTCTCCATCTTTGCCAGCA

4. Analyse protéique

a. Lyse cellulaire et dosage protéique

A la fin des 24h de reperfusion, l'extraction des protéines est réalisée sur glace en utilisant du tampon RIPA (contenant NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, Désoxycholate de sodium 0,5%, SDS 0,1%, Tris-HCl pH 7,4 50 mM) dilué dans du DPBS (1X) avec 1% d'inhibiteurs de protéases (PIC : protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich). Trente microlitres de ce tampon sont déposés dans chaque puits et les cellules sont décollées à l'aide d'un grattoir pour être récupérées avant d'être mises sous agitation 1h à +4°C.

Les échantillons sont ensuite dosés par technique colorimétrique en utilisant le kit Pierce BCA (acide bicinchoninique - ThermoFisher Scientific). L'absorbance est lue à 562 nm par le Varioskan LUX (ThermoFisher Scientific).

b. Western-blot

La quantité de protéine déposée est ajustée à 20 µg par puits. Une SDS-PAGE, électrophorèse sur gel de polyacrilamide (8%) avec sodium dodecyl sulfate, est réalisée pour faire migrer les protéines selon leur taille. Les échantillons sont mélangés avec du tampon de dépôt Laemmli au 1/6^{ème} (contenant du bleu de bromophénol et β-mercaptophénol) puis chauffés à 95°C pendant 5 minutes avant d'être déposés. La migration est réalisée à 90V pendant 30 minutes (passage du gel de concentration) puis à 130V jusqu'à ce que le front de migration soit sorti du gel. Le tampon de migration est composé de Tris (25 mM), de glycine (190 mM) et de SDS (0,1%), pH 8,3.

Les protéines alors séparées sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose (Amersham™ Protan premium 0,2 µm NC) par *Trans-Blot Turbo semi-dry transfer* (Biorad) en présence de Tris (25 mM), de glycine (190 mM) et 20% d'éthanol. La membrane est placée dans une solution de saturation (10% TBS, 0,1% Tween, 5% lait) pendant au moins 1h à température ambiante sous agitation. L'anticorps anti-αSMA (espèce immunisée : lapin, ref 19245S – Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, Etats-Unis) est utilisé dilué au 1/400^{ème} et l'anticorps anti-Hcs70 utilisée comme protéine de référence (espèce

immunisée : souris, ref sc-7298 – Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, Etats-Unis) à 1/5000^{ème}. Les anticorps primaires sont incubés une nuit à +4°C sous agitation. Après lavage, l'anticorps secondaire Ac goat anti-rabbit (réf 1706515, Biorad) conjugué à la peroxydase de raifort (HRP : Horseradish peroxidase) est dilué au 1/10000^{ème} et l'anticorps secondaire Ac goat anti-mouse (réf 1706516, Biorad) dilué au 1/5000^{ème}. Les anticorps secondaires sont incubés pendant 1h à température ambiante sous agitation.

Après lavages au TTBS (10% TBS, 0,1% Tween), la révélation a été réalisée par chimiluminescence (kit ThermoFisher Scientific Pierce ECL) à l'aide de l'imageur PXi (SynGene, Cambridge, GB). Les résultats sont ensuite exprimés en ratio α SMA/HSC70 puis normalisés à la condition contrôle.

5. Anticorps (Ac) anti-FP4

Les anticorps monoclonaux, dirigés contre le FP4, utilisés sont 5B9, 1E12 et 1C12 (22–24). Ce sont des anticorps de type IgG1 possédant une chaîne légère murine, une chaîne lourde chimérique dont la partie variable est murine et la partie constante humaine. L'Ac monoclonal 5B9 interagit spécifiquement avec les complexes FP4/héparine alors que 1E12 et 1C12 réagissent aussi bien avec le FP4 seul que complexé à l'héparine.

a. Déglycosylation des anticorps

Afin de limiter la capacité des Ac à interagir avec les Fc γ R exprimés à la surface des cellules d'intérêts, les Ac (5B9, 1C12 et 1E12) sont déglycosylés. Chaque Ac est incubé avec la peptide-N-glycosidase (1 U / 50 mg d'Ac, Sigma-Aldrich) pendant 48h dans un bain-marie à 37°C. Il a ensuite été purifié à l'aide d'une colonne Vivaspin® 500 (Sartorius, Goettingen, Allemagne).

b. Test immuno-enzymatique

Afin de vérifier que les Ac déglycosylés reconnaissent leur cible, un test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est réalisé.

Pour vérifier la liaison du d5B9 (5B9 déglycosylé) à sa cible, le coffret commercial PF4 IgG (Immucor, Norcross, Etats-Unis) est utilisé. Les Ac déglycosylés sont incubés dans les micro-puits recouverts de complexes FP4/PVS (polyvinylsulfonate) pendant 30 minutes dans un bain-marie à 37°C. Après 3 lavages, des Ac secondaires de chèvre anti-IgG humaines conjugués à la phosphatase alcaline ont été incubés 30 minutes dans un bain-marie à 37°C. Après un nouveau cycle de lavages, le substrat PNPP (p-nitrophényl phosphate) a été incubé 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, puis la réaction a été stoppée en présence d'hydroxyde de sodium NaOH 3M. Les absorbances ont ensuite été mesurées à une longueur d'onde de 405 nm sur un spectrophotomètre (Tecan, Infinte F200 PRO, LifeSciences, Männedorf, Suisse).

Afin de s'assurer de la liaison du d1C12 (1C12 déglycosylé) et du d1E12 (1E12 déglycosylé) au FP4, les puits d'une plaque 96 puits à fond plat sont coatés avec du FP4 purifié (Hyphen BioMed) une nuit à température ambiante. Après 5 lavages, une solution de BSA (bovin serum albumin) à 5% est incubée 2h à température ambiante afin de saturer la plaque puis le test ELISA est réalisé avec les réactifs du kit Asserachrom® HPIA-IgG (Stago). Après lavages, les Ac sont incubés pendant 1h à température ambiante. Après un nouveau cycle de lavage, l'Ac secondaire conjugué à la peroxydase est incubé 1h à température ambiante. Enfin après lavages, le tétraméthylbenzidine (TMB) est mis à incuber 5 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique H₂SO₄ 1M. Les absorbances sont mesurées à une longueur d'onde de 450 nm sur le même spectrophotomètre que précédemment.

c. Test de libération de sérotonine radiomarquée

Un test de libération de sérotonine radiomarquée est réalisé avec des plaquettes humaines qui exprime le récepteur FcγRIIA, dans le but de vérifier que les Ac déglycosylés n'induisent pas l'activation des cellules via les FcγR exprimés à la surface des cellules d'intérêts.

Le sang total d'un sujet sain est prélevé dans des tubes contenant 1,8 mL d'anticoagulant ACD (acide citrique 38 mM, citrate trisodique 62 mM, glucose 133 mM) additionné de prostaglandine E1 (PGE1) 0,02 mM (Sigma-Aldrich) (10 µL pour 10 mL de sang total). Après centrifugation du sang total pendant 10 minutes à 200 g, le plasma riche en plaquettes (PRP)

ainsi obtenu est incubé 45 minutes à 37°C avec la sérotonine radiomarquée au carbone 14 (C14-5HT) (Perkin Elmer, Waltham, Etats-Unis) à une concentration de 0.4 µCi par mL de PRP. Après lavage, les plaquettes sont ajustées à une concentration de 300 G/L puis sont incubées 1 h à température ambiante en présence de d1C12 (10 µg/mL) ou d1E12 (10 µg/mL) ou de de d5B9 (50 µg/mL) et d'héparine (0,1 UI/mL) (Héparine Choay, Sanofi-Aventis). L'activation plaquettaire est stoppée par ajout de 250 µL de tampon PBS/EDTA (Phosphate Buffered Saline/EthylèneDiamineTétraAcétique) 0,1 M. Après centrifugation à 2000g pendant 4 minutes, le surnageant (250 µL) est transféré dans des tubes contenant 2 mL de liquide de scintillation (UltimaGoldLLT®, Perkin Elmer). La radioactivité (rayonnement β-) de chaque tube est ensuite mesurée sur un compteur β de scintillation liquide (Tri-Carb 3180TR/SL, Perkin Elmer).

Le « bruit de fond » est évalué en incubant les plaquettes avec le sérum d'un sujet sain de groupe sanguin AB. La radioactivité maximale est obtenue après incubation du PRP en présence de triton à 0,5 % qui lyse les plaquettes et libère la totalité de la sérotonine radiomarquée incorporée dans les granules denses. Les résultats bruts sont exprimés en coups par minute. Le pourcentage de libération de sérotonine radiomarquée est calculé comme suit :

$$\% \text{ de libération} = \frac{\text{radioactivité de l'échantillon} - \text{"bruit de fond"}}{\text{radioactivité maximale} - \text{"bruit de fond"}} \times 100$$

6. Analyse statistique

Les données quantitatives sont exprimées par la moyenne. Les tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.0.1 en utilisant le test paramétrique non appariés t-test. La significativité est déterminée par une p-value < 0,05.

III. RESULTATS

1. Effet du PF4 sur les fibroblastes cardiaques

a. Condition de normoxie

Afin d'évaluer l'effet du FP4 sur les fibroblastes cardiaques humains, ces derniers ont été incubés pendant 24h avec du FP4 purifié humain (5 µg/mL). Le niveau d'expression des ARNm (ARN messenger) spécifiques des gènes *ACTA2* et *COL1A1* codant respectivement pour l'αSMA et le collagène de type I a été évalué par RT-qPCR. Aucun effet du FP4 n'a pu être observé sur les 2 premières expériences réalisées (Figure 3A). En revanche, lorsque le TGFβ1 (5 ng/mL) utilisé comme contrôle positif est incubé avec les fibroblastes une augmentation de l'expression des ARNm codant pour l'αSMA et pour le collagène I comparativement aux fibroblastes cardiaques cultivés seuls a été mesurée (*fold change* = 4,2 et 2,9 fois, respectivement).

Une étude récente a montré que des fibroblastes cutanés cultivés en normoxie en présence de FP4 (2 et 5 µg/mL) induisait une augmentation de l'expression d'αSMA et de collagène I (20). Cependant, cet effet a été obtenu avec du FP4 recombinant alors que nous avons utilisé du FP4 purifié de plaquettes humaines. Pour la suite des expériences nous avons donc utilisés 2 sources de FP4 différentes, purifié (FP4p) ou recombinant (FP4r), à 2 concentrations différentes : 1 et 5 µg/mL.

Les résultats obtenus avec les 2 types de FP4 sont présentés figure 3B et regroupent les résultats de 7 expériences. Une faible augmentation de l'expression de *ACTA2* est obtenue lorsque les fibroblastes cardiaques sont incubés 24h avec 1 µg/mL de FP4 purifié (FP4p) ou recombinant (FP4r) par rapport à la condition basale (1,2 et 1,4, respectivement). Cependant cette différence n'est pas significative. En revanche, les fibroblastes cardiaques expriment significativement plus d'ARNm du gène *ACTA2* en présence de 5 µg/mL de FP4 purifié comparativement à la condition sans FP4 (moyenne *fold change* = 1,8 fois ; $p = 0,05$). Concernant l'expression du collagène de type I, une augmentation significative de son niveau d'expression est mesurée après incubation avec le FP4p (1 µg/mL) par rapport à la condition contrôle (moyenne *fold change* = 1,6 ; $p < 0,05$). En revanche, aucun effet significatif sur l'expression du gène *COL1A1* n'a été observé avec les autres conditions testées (figure 3B).

Les résultats obtenus en RT-qPCR ont été confirmés en étudiant l'expression protéique de l' α SMA par Western-blot. Ainsi, en présence de TGF β 1 à 5 ng/mL, une augmentation de l'expression protéique d' α SMA est observée (moyenne *fold change* = 1,8). Le FP4p utilisé à 5 μ g/mL entraîne une augmentation de l'expression d' α SMA de 1,4 fois comparativement à la condition basale (figure 3C).

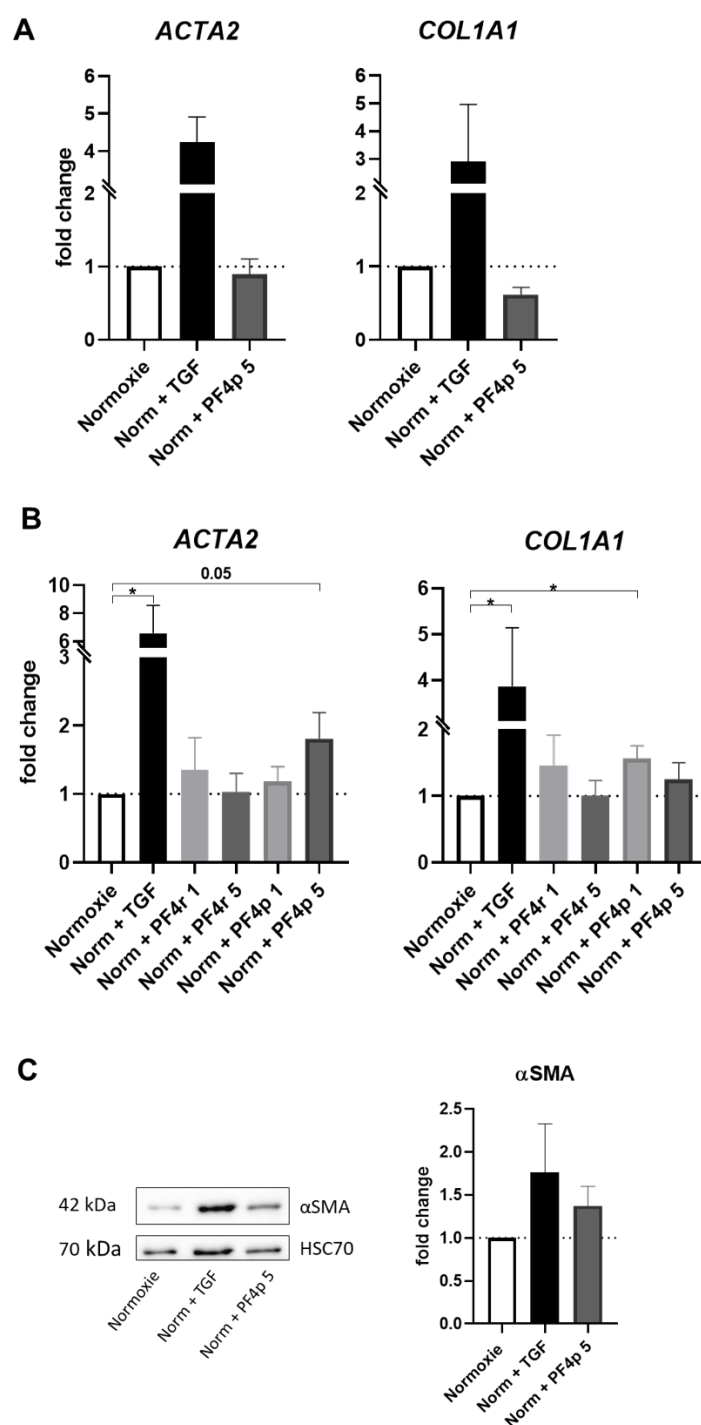


Figure 5. Effet du FP4 sur l'expression des gènes *ACTA2* et *COL1A1* par les fibroblastes cardiaques après 24h en normoxie. (A) En présence de FP4 purifié à 5 µg/mL, n = 2. (B) En présence de FP4 recombinant (FP4r) ou purifié (FP4p) à 1 ou à 5 µg/mL, n = 7. (C) Effet du FP4 sur l'expression protéique d'αSMA et de la protéine de référence Hcs-70 par les fibroblastes cardiaques après 24h en normoxie en présence de FP4 purifié (FP4p) à 5 µg/mL, n =3. * : p < 0,05.

b. Condition d'ischémie-reperfusion simulée

Nous avons ensuite évalué l'effet du FP4 sur les fibroblastes cardiaques humains en condition d'ischémie-reperfusion.

La durée d'ischémie choisie initialement était de 5 heures correspondant au temps moyen d'ischémie observé au sein de la cohorte Hibiscus-STEMI (le temps d'ischémie étant défini ici comme la durée entre le début de la douleur thoracique ressentie par le(la) patient(e) et la revascularisation en salle de coronarographie). Dans ces conditions (5h en ischémie puis 24h en normoxie) et en absence de FP4, les fibroblastes cardiaques expriment significativement plus d'ARNm des gènes *ACTA2* et *COL1A1* (moyenne *fold change* = 1,8 et 2, respectivement) comparativement aux fibroblastes cardiaques cultivés uniquement en normoxie. En revanche, pour un temps d'ischémie de 1h (puis 24h de reperfusion), aucune surexpression significative du gène codant pour le collagène de type I n'est observée et l'expression d'αSMA est diminuée (moyenne *fold change* = 1,6 et 0,7, respectivement) (figure 4A).

L'effet du FP4 et du TGFβ1 a ensuite été évalué pour ces 2 conditions d'I/R. Comme attendu, en conditions d'I/R, le TGFβ1 (5 ng/mL) induit une augmentation de l'expression d'*ACTA2* par les fibroblastes cardiaques comparativement à la condition I/R contrôle (moyenne *fold change* = 2 et 18,9, pour respectivement 5h et 1h d'ischémie). Le FP4 (purifié ou recombinant) induit une augmentation de l'expression de *ACTA2* des fibroblastes en condition I/R (1h d'ischémie et 24h de reperfusion) par rapport à la condition I/R sans FP4 (moyenne *fold change* compris entre = 3,2 et 2,4). Cependant, cette différence n'est pas significative compte tenu que seules deux expériences ont été réalisées dans ces conditions. En revanche, pour un temps d'ischémie de 5h puis 24h de reperfusion, seul le FP4 recombinant (1 µg/mL) induit une augmentation de l'expression de *ACTA2* (moyenne *fold change* = 3,4). De même, l'expression

du gène *COL1A1* est aussi significativement augmenté dans ces conditions comparativement à la condition sans FP4 (moyenne *fold change* = 2,4, $p < 0,05$). Cependant, pour toutes les autres conditions évaluées son expression est stable ou même diminuée par rapport au contrôle.

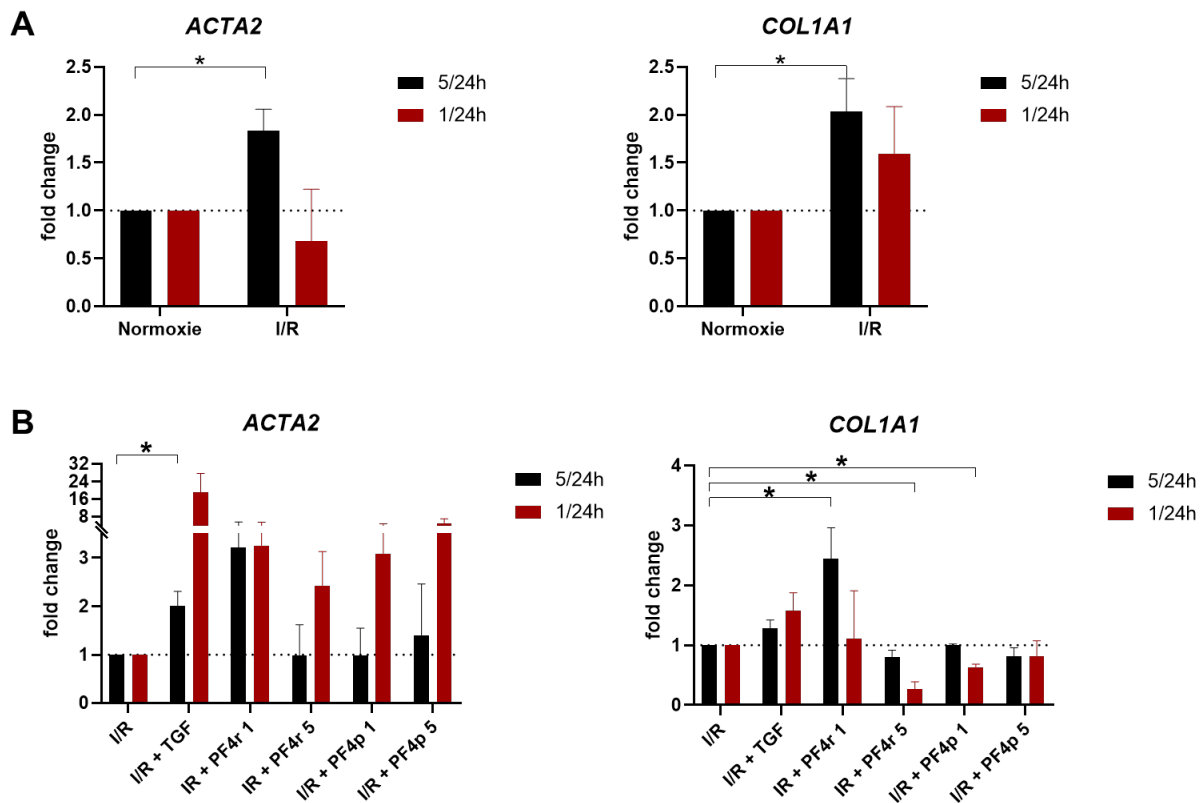


Figure 6. Effet des différentes conditions atmosphériques de culture et du FP4 sur l'expression des gènes *ACTA2* et *COL1A1* par les fibroblastes cardiaques. (A) En l'absence de FP4, les conditions de culture modifient l'expression des gènes *ACTA2* et *COL1A1* ($n = 3$ pour 5/24h, $n = 2$ pour 1/24h, * : $p < 0,05$). (B) Effet du FP4 recombinant (FP4r) ou purifié (FP4p) à 1 ou à 5 $\mu\text{g/mL}$ sur l'expression des gènes *ACTA2* et *COL1A1* par les fibroblastes cardiaques en condition d'ischémie-reperfusion. Le temps d'ischémie était de 5 heures (5/24h, $n = 3$) ou 1 heure (1/24h, $n = 2$) suivi de 24 heures de reperfusion, * : $p < 0,05$.

2. Influence du FP4 sur la viabilité des HCF-av et des cardiomyocytes

a. Fibroblastes cardiaques (HCF-av)

Le test Annexine V – PI a été utilisé pour évaluer l'effet du FP4 sur la viabilité des fibroblastes cardiaques. Les résultats obtenus en normoxie (figure 5A) et en ischémie-reperfusion (figure 5B) sont présentés sur la figure 5. Ainsi, le pourcentage de cellules vivantes, c'est-à-dire doubles négatives, ne varie pas en fonction de la présence ou non de FP4 recombinant ou purifié (pourcentage de cellules vivantes > à 90% avec l'ensemble des conditions). De même, l'ischémie n'entraîne pas de changement sur le pourcentage de cellules vivantes par rapport à la culture des fibroblastes cardiaques en normoxie uniquement.

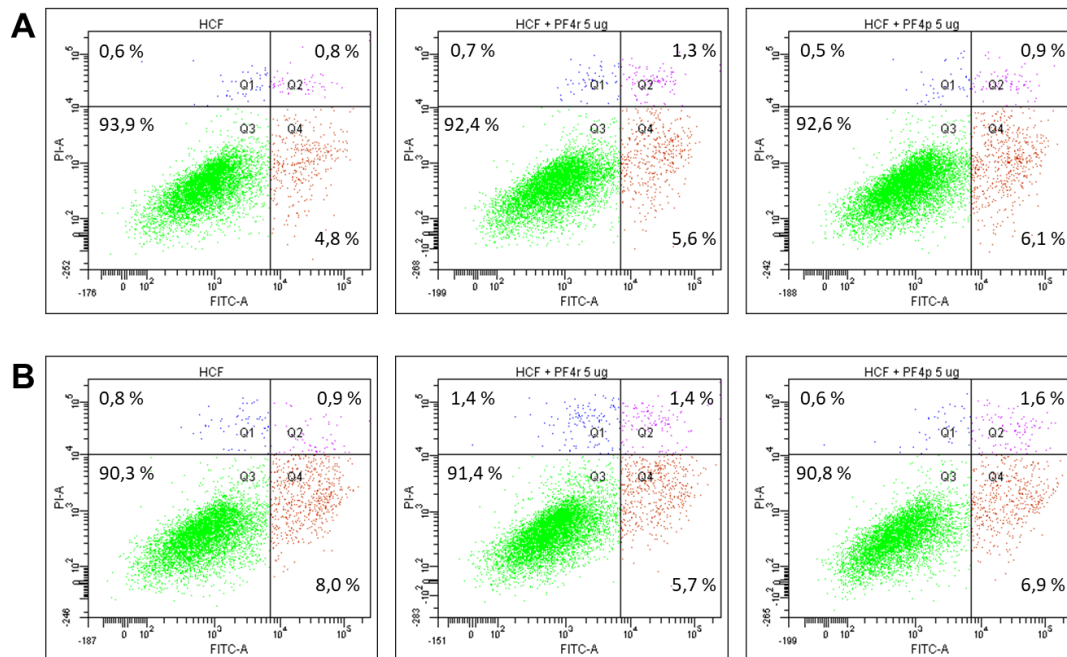


Figure 7. Effet du FP4 recombinant (FP4r) ou purifié (FP4p) à 5 $\mu\text{g/mL}$ sur la viabilité des fibroblastes cardiaques (HCF). En abscisse le marquage Annexine V-FITC et en ordonnée le marquage PI. La population Q1 correspond aux cellules qui marquent le PI uniquement (FITC – PI +), la population Q2 aux cellules qui marquent le PI et l'annexine V (FITC + PI +), la population Q3 aux cellules négatives pour les 2 marqueurs (FITC – PI –) et la population Q4 correspond aux cellules ne marquant que l'annexine V (FITC + PI –). (A) Viabilité des fibroblastes après culture en normoxie (24h). (B) Viabilité des fibroblastes en condition d'ischémie (5h) puis reperfusion (24h de normoxie +/- FP4 5 $\mu\text{g/mL}$).

b. Cardiomyocytes (lignée AC16)

L'effet du FP4 sur la viabilité de la lignée de cardiomyocytes AC16 a aussi été évaluée en normoxie et en condition d'ischémie-reperfusion. Cependant, suite à un problème technique avec le marquage PI, seul le marquage avec l'annexine V-FITC était interprétable. En condition de normoxie (figure 6A), le pourcentage de cellule AC16 en apoptose est environ deux fois plus important lorsque ces cellules sont incubées 24h en présence de FP4 recombinant ou purifié par rapport à la condition contrôle (32,6 % et 34,3 % vs 15,4 % ; respectivement). Des résultats similaires sont obtenus dans les conditions ischémie-reperfusion avec une augmentation du nombre de cellules en apoptose après incubation avec du FP4 recombinant ou purifié (49,2 % et 44,5 % vs 22,9 % ; respectivement). Cependant, ces résultats ont été obtenus sur une seule expérience et doivent être confirmés sur un plus grand nombre de manipulations.

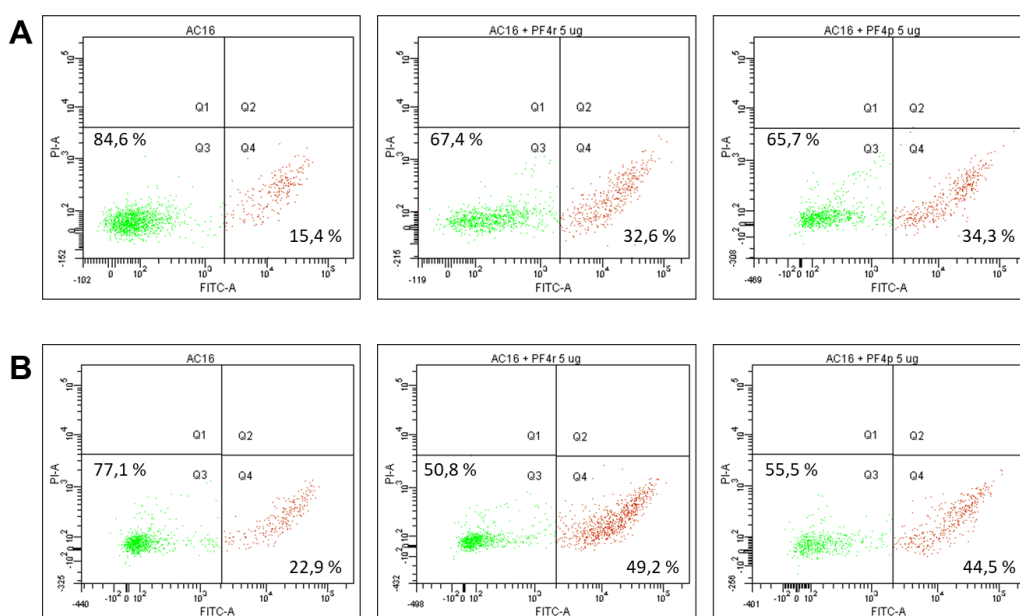


Figure 8. Effet du FP4 recombinant (FP4r) ou purifié (FP4p) à 5 $\mu\text{g/mL}$ sur la viabilité des cardiomyocytes (AC16). En abscisse le marquage Annexine V-FITC. La population Q3 correspond aux cellules négatives pour l'annexine V-FITC et le PI (FITC – PI –) et la population Q4 correspond aux cellules ne marquant que l'annexine V (FITC + PI –). (A) Viabilité des

cardiomyocytes après culture en normoxie (24h). (B) Viabilité des cardiomyocytes en condition d'ischémie (5h) puis reperfusion (24h de normoxie +/- FP4 5 µg/mL).

3. Effet des Ac anti-FP4

Afin de limiter la capacité des Ac chimérique anti-FP4 à interagir avec les FcγR qui sont potentiellement exprimés à la surface des fibroblastes cardiaques, les Ac (5B9, 1C12 et 1E12) ont été déglycosylés dans un premier temps. Après purification des Ac déglycosylés, 1E12 et 1C12 se lient au FP4 seul avec des valeurs de DO équivalentes à celles obtenues avec les formes natives de ces Ac (DO = 1,2 vs 1,4 pour 1E12 vs d1E12, DO 1,6 vs 1,5 pour 1C12 vs d1C12) (Figure 7A). De même, avec l'Ac 5B9 qui reconnaît le complexe FP4/héparine, la liaison à ce complexe est similaire que l'Ac soit déglycosylé ou non (respectivement DO = 3 vs 3,2).

Cependant, afin de vérifier que le Fc des formes déglycosylés des Ac sont incapables d'induire une activation cellulaire via les récepteurs FcγR, ces anticorps ont été incubés avec des plaquettes humaines qui expriment le récepteur FcγRIIA. Aucune activation des plaquettes n'a été objectivée avec les formes déglycosylés (libération de sérotonine radiomarquée < 20% pour les 3 Ac) alors que les formes natives des Ac induisent une forte activation plaquettaire (> 80 % libération de sérotonine radiomarquée) (figure 7B).

L'effet des Ac anti-FP4 déglycosylés (50 µg/mL) a ensuite été évalué avec les fibroblastes cardiaques incubés en présence de FP4p (5 µg/mL) durant 24h en normoxie. Ainsi, l'effet du FP4 sur l'expression d'αSMA est diminué en présence des 3 Ac déglycosylés et notamment avec d1C12. En effet les *fold change* varient de 1,6 en présence de FP4p à 1,2 lorsque d1E12 est ajouté, et à 0,95 en présence d1C12. Avec d5B9 le *fold change* est de 1,3. En revanche l'expression du gène *COL1A1* en présence de FP4p n'est pas augmentée lors de cette expérience, l'effet des Ac n'est donc pas interprétable pour ce gène (figure 7C).

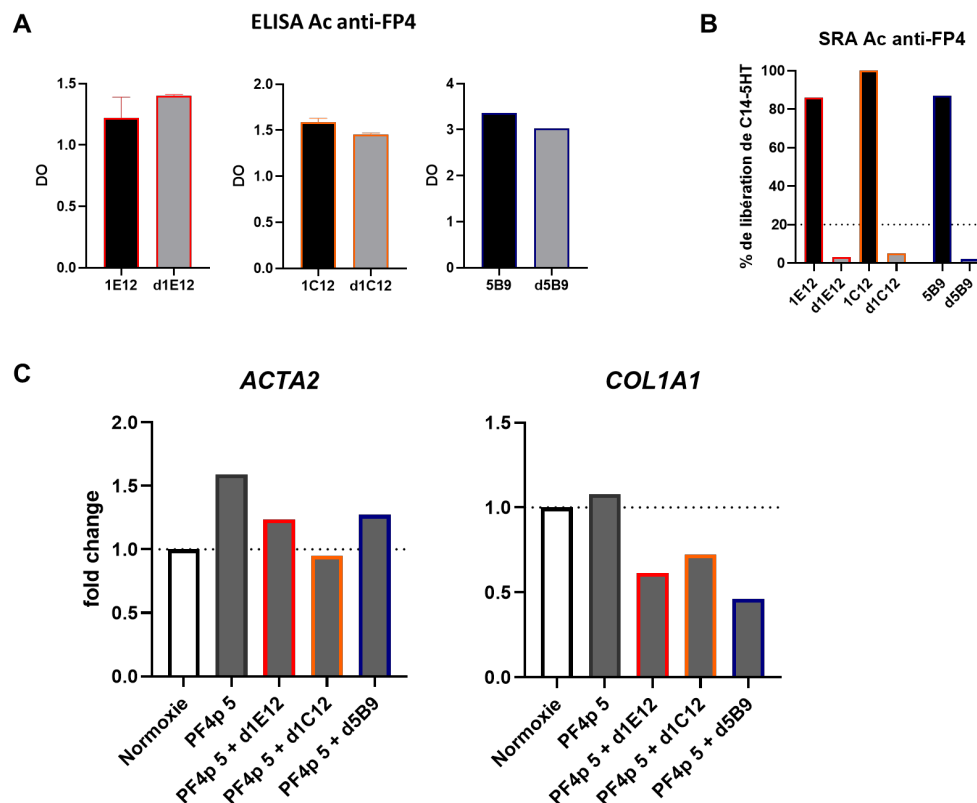


Figure 9. Effet du FP4 et des Ac anti-FP4 déglycosylés sur l'expression des gènes *ACTA2* et *COL1A1* par les fibroblastes cardiaques après 24h en normoxie en présence de FP4 purifié à 5 µg/mL +/- Ac (d1E12, d1C12 ou d5B9) à 50 µg/mL.

IV. DISCUSSION ET CONCLUSION

L'objectif de notre étude était d'évaluer l'effet du FP4 sur les fibroblastes cardiaques humain. Au cours de ce travail nous avons montré qu'en condition de normoxie le FP4 induit une augmentation de l'expression des ARNm des gènes *ACTA2* et *COL1A1* codant respectivement pour l' α SMA et le collagène de type I. Des résultats similaires avaient récemment été obtenus avec les fibroblastes cutanés cultivés 24h en normoxie en présence de FP4 recombinant (2 et 5 µg/mL) (moyenne *fold change* = 1,7 et 2 respectivement pour le gène *ACTA2*) (20). Ces résultats suggèrent que le FP4 induit une différenciation des fibroblastes vers un phénotype myofibroblastique en condition de normoxie. Cependant, dans notre étude nous avons utilisé 2 types de FP4 différents soit purifié à partir de plaquettes humaines soit recombinant, produit par la bactérie *E. coli*. Ainsi, des effets doses différents

sont observés en fonction du type de FP4 qui est incubé avec les fibroblastes cardiaques. En effet, le FP4 recombinant semble avoir un effet plus important lorsqu'il est utilisé à une concentration de 1 µg/mL vs 5 µg/mL alors que le FP4 purifié semble induire une différenciation des fibroblastes plus importante à une concentration de 5 µg/mL. Ces différences observées pourraient s'expliquer par la composition du FP4 utilisé. En effet, le FP4 est une chimiokine formée de quatre monomères identiques de 7,8 kDa, en circulation, les monomères de FP4 s'associent spontanément afin de former des dimères. Les dimères s'assemblent ensuite dos à dos par des liaisons non-covalentes au niveau des zones hydrophobes des feuillets bêta pour former des tétramères d'environ 32 kDa (25). En solution, le pH et la force ionique influencent significativement les réactions d'association des monomères en dimères et des dimères en tétramères. Par exemple, un pH inférieur à 4 favorise l'état monomérique alors qu'un pH physiologique conduit à la formation de dimères et de tétramères et une augmentation de la force ionique permet de stabiliser la formation des tétramères de FP4 (26). La proportion de chacune de ces entités (monomère, dimère et tétramère) dans les solutions utilisées pourrait ainsi modifier les effets du FP4.

Par ailleurs, le mécanisme d'action de l'effet profibrotique du FP4 n'est à ce jour pas connu et reste à déterminer. Deux récepteurs au FP4 ont été identifiés CXCR3B ou CCR1, et il est intéressant de noter que CCR1 est impliqué et favorise la fibrose hépatique chez la souris et que son inhibition par un inhibiteur pharmacologique (BX471) réduit son effet profibrotique (27,28). Outre ces 2 récepteurs, le FP4 se lie par l'intermédiaire des résidus lysine et arginine exposés à sa surface à des molécules chargées négativement. Parmi celles-ci se trouvent les glycosaminoglycanes (GAG), les sulfates naturels (sulfate de chondroïtine, sulfate d'héparane) exprimés à la surface cellulaire. Les GAG sont notamment impliqués dans les mécanismes d'adhésion cellulaire et de migration, et de plus en plus d'études suggèrent que les protéoglycanes, très probablement en association avec une chaîne de signalisation protéique, peuvent servir de récepteur fonctionnel à certaines cytokines dont le FP4 pourrait faire partie (29).

Nous avons aussi étudié au cours de ce stage l'effet du FP4 sur les fibroblastes cardiaques en condition d'ischémie-reperfusion. Nous avons ainsi montré une expression du gène *ACTA2* augmentée lorsque les fibroblastes étaient placés 1h en ischémie puis 24h en normoxie en présence de FP4. En revanche seul le FP4 recombinant (1 µg/mL) semble avoir un effet sur

l'expression d'ACTA2 et de COL1A1 après 5h d'ischémie. Cependant, ces résultats sont à nuancer par le faible nombre d'expériences réalisées (n= 2 ou 3) et la variabilité de notre modèle. Le modèle choisi est en effet une culture primaire de fibroblastes cardiaques, les cellules sont donc directement issues de ventricules cardiaques adultes humains. C'est un modèle qui présente une variabilité notable malgré l'utilisation restreinte des fibroblastes entre le passage 4 et 5 lors des expériences. En effet, différentes populations de fibroblastes cardiaques sont ainsi décrites avec des profils d'expression génique différents (figure 8). Les fibroblastes résidents ont un faible niveau de prolifération et n'expriment pas l' α SMA ni la périostine. En cas de lésion, une partie des fibroblastes s'active et prolifère exprimant plus de collagène ou de périostine. Finalement parmi ces fibroblastes activés, certains se différencient en myofibroblastes et exprimeront l' α SMA. Afin de préciser l'état de différenciation des fibroblastes il serait intéressant par la suite d'utiliser d'autres marqueurs comme la périostine pour distinguer les fibroblastes activés des myofibroblastes.

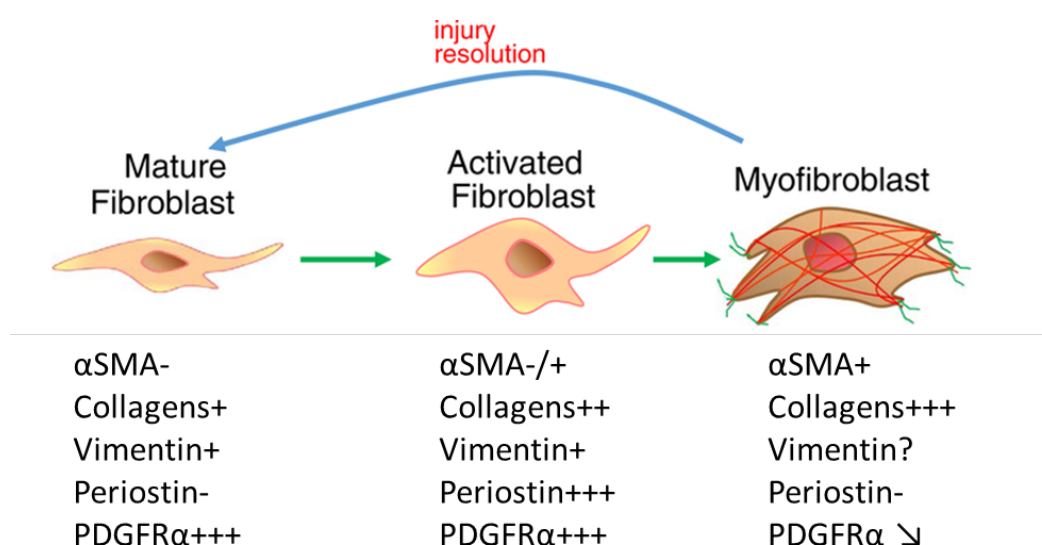


Figure 10. Catégories de fibroblastes cardiaques résidents. Modifié d'après Tallquist MD, Molkentin JD (3)

Dans un second temps, nous avons évalué l'effet du FP4 sur la viabilité des fibroblastes cardiaques et des cardiomyocytes. La viabilité des fibroblastes cardiaques n'est pas modifiée par la présence de FP4 recombinant ou purifié, que les cellules soient placées en normoxie ou en condition d'ischémie-reperfusion. En revanche, nous avons montré une mortalité par

apoptose environ deux fois plus importante de la lignée de cardiomyocyte AC16 en présence de FP4 recombinant ou purifié (5 µg/mL). Un effet inhibiteur du FP4 a précédemment été décrit concernant la prolifération et la migration des cellules endothéliales mais le mécanisme sous-jacent n'a pas été identifié (30,31). Cet effet pro-apoptotique du FP4 sur la lignée cellulaire AC16 doit cependant être confirmé sur un plus grand nombre d'expériences mais doit aussi être évalué sur un autre modèle cellulaire. En effet, les cellules AC16 ont été immortalisées par transformation avec la séquence T du SV40 et bien que ces cellules aient conservé des marqueurs de cardiomyocytes, elles ont perdu notamment leurs propriétés contractiles. Il serait donc intéressant d'utiliser des cardiomyocytes isolés ou un modèle de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) différenciées en cardiomyocytes (32). Ce dernier est en cours de développement au laboratoire. Ainsi, l'effet du FP4 sur la viabilité et les propriétés contractiles des iPSC différenciées en cardiomyocytes pourront être étudiés.

A terme, le rôle du FP4 dans la fibrose cardiaque et sur la fonction cardiaque pourrait être étudié *in vivo* à l'aide d'un modèle de souris génétiquement modifiées, telles que des souris déficientes en FP4 murin (mPF4^{-/-}) et des souris exprimant le FP4 humain (hPF4/mPF4^{-/-}) obtenues auprès de notre collaborateur le Pr. S. McKenzie (Philadelphie, Etats-Unis). L'I/R cardiaque sera induite par la ligature transitoire de l'artère coronaire gauche établie au laboratoire par le Pr T. Bourguignon. La fonction cardiaque des souris pourra alors être analysée par échographie cardiaque et une étude histologique permettrait de quantifier ensuite la taille de l'infarctus, la fibrose et le recrutement de cellules inflammatoires à différent temps post-ischémie.

Si les effets délétères du FP4 sur la différenciation des fibroblastes cardiaque et les cardiomyocytes sont confirmés, cette chimiokine serait une nouvelle cible thérapeutique intéressante pour réduire les lésions d'ischémie-reperfusion. Nous avons ainsi testé *in vitro* l'effet inhibiteur de 3 Ac monoclonaux anti-FP4 différents précédemment développés au laboratoire. L'Ac d1C12 inhibe totalement l'augmentation d'expression d'αSMA induite par le FP4 purifié alors que les 2 autres (d1E12 et d5B9) ne l'inhibent que partiellement. Il est intéressant de noter que les Ac 1E12 et 1C12 se lient au FP4 au niveau des mêmes acides aminés que les glycosaminoglycanes (GAG) ou l'héparine alors que pour 5B9, la liaison au FP4 est possible uniquement s'il est complexé aux GAG ou à l'héparine (22,23). Ainsi, l'effet inhibiteur de ces anticorps vis-à-vis du FP4 pourrait être expliqué par la différence de

spécificité mais nos résultats obtenus doivent être confirmés sur d'autres expériences. De plus, il sera aussi indispensable dans le futur d'évaluer l'effet de ces Ac *in vivo* dans le modèle de souris hPF4/mPF4^{-/-} pour étudier leur efficacité thérapeutique sur les lésions d'I/R et notamment la fonction cardiaque et la fibrose cardiaque.

V. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bevington A, Walls J. Protein catabolism in metabolic acidosis: inhibition of glycolysis by low pH suggests a role for glucose. *Biochem Soc Trans.* 1 août 1995;23(3):464S-464S.
2. Perico, N C D, Remuzzi G, Sayegh MH. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet.* 2004;364.
3. Tallquist MD, Molkentin JD. Redefining the identity of cardiac fibroblasts. *Nat Rev Cardiol.* août 2017;14(8):484-91.
4. OMS [Internet]. 2020. Les 10 principales causes de mortalité. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death#:~:text=Les%20principales%20causes%20de%20mortalité,bronchopneumopathie%20chronique%20obstructive%2C%20infections%20des>
5. Belle L, Cayla G, Cottin Y, Coste P, Khalife K, Labèque JN, et al. French Registry on Acute ST-elevation and non-ST-elevation Myocardial Infarction 2015 (FAST-MI 2015). Design and baseline data. *Arch Cardiovasc Dis.* juin 2017;110(6-7):366-78.
6. Hausenloy DJ, Yellon DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest.* 2 janv 2013;123(1):92-100.
7. Cokkinos DV. Le remodelage cardiaque après un infarctus : nouvelles données sur la prévention et le traitement. *Bull Académie Natl Médecine.* nov 2015;199(8-9):1383-94.
8. Mercadier JJ, Gaertner R, Logeart D, Michel JB. Remodelage précoce du ventricule gauche après un accident coronarien aigu. *médecine/sciences.* juin 2004;20(6-7):643-50.
9. Humeres C, Frangogiannis NG. Fibroblasts in the Infarcted, Remodeling, and Failing Heart. *JACC Basic Transl Sci.* juin 2019;4(3):449-67.
10. Anzai A, Choi JL, He S, Fenn AM, Nairz M, Rattik S, et al. The infarcted myocardium solicits GM-CSF for the detrimental oversupply of inflammatory leukocytes. *J Exp Med.* 6 nov 2017;214(11):3293-310.
11. Groenewegen A, Rutten FH, Mosterd A, Hoes AW. Epidemiology of heart failure. *Eur J Heart Fail.* août 2020;22(8):1342-56.
12. Byrne RA, Rossello X, Coughlan JJ, Barbato E, Berry C, Chieffo A, et al. 2023 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes. *Eur Heart J.* 25 août 2023;ehad191.
13. Ishii H, Amano T, Matsubara T, Murohara T. Pharmacological Intervention for Prevention of Left Ventricular Remodeling and Improving Prognosis in Myocardial Infarction. *Circulation.* 16 déc 2008;118(25):2710-8.
14. Amin P, Singh M, Singh K. β -Adrenergic Receptor-Stimulated Cardiac Myocyte Apoptosis: Role of β 1 Integrins. *J Signal Transduct.* 24 mai 2011;2011:1-9.
15. Imaeda A, Tanaka S, Tonegawa K, Fuchigami S, Obana M, Maeda M, et al. Myofibroblast β 2 adrenergic signaling amplifies cardiac hypertrophy in mice. *Biochem*

Biophys Res Commun. févr 2019;510(1):149-55.

16. Dargie HJ, Byrne J. Pathophysiological Aspects of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Acute Myocardial Infarction. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 1 oct 1995;2(5):389-95.
17. Williams B. Angiotensin II and the pathophysiology of cardiovascular remodeling. *Am J Cardiol.* avr 2001;87(8):10-7.
18. Hayashi M, Tsutamoto T, Wada A, Tsutsui T, Ishii C, Ohno K, et al. Immediate Administration of Mineralocorticoid Receptor Antagonist Spironolactone Prevents Post-Infarct Left Ventricular Remodeling Associated With Suppression of a Marker of Myocardial Collagen Synthesis in Patients With First Anterior Acute Myocardial Infarction. *Circulation.* 27 mai 2003;107(20):2559-65.
19. Schanze N, Bode C, Duerschmied D. Platelet Contributions to Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Front Immunol.* 6 juin 2019;10:1260.
20. Affandi AJ, Carneiro T, Ottria A, de Haan JJ, Brans MAD, Brandt MM, et al. CXCL4 drives fibrosis by promoting several key cellular and molecular processes. *Cell Rep.* janv 2022;38(1):110189.
21. Hoeft K, Schaefer GJL, Kim H, Schumacher D, Bleckwehl T, Long Q, et al. Platelet-instructed SPP1+ macrophages drive myofibroblast activation in fibrosis in a CXCL4-dependent manner. *Cell Rep.* févr 2023;42(2):112131.
22. Kizlik-Masson C, Vayne C, McKenzie SE, Poupon A, Zhou Y, Champier G, et al. 5B9, a monoclonal antiplatelet factor 4/heparin IgG with a human Fc fragment that mimics heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *J Thromb Haemost.* oct 2017;15(10):2065-75.
23. Vayne C, Nguyen TH, Rollin J, Charuel N, Poupon A, Pouplard C, et al. Characterization of New Monoclonal PF4-Specific Antibodies as Useful Tools for Studies on Typical and Autoimmune Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Thromb Haemost.* mars 2021;121(03):322-31.
24. Vayne C, Palankar R, Billy S, Handtke S, Thiele T, Cordonnier C, et al. The deglycosylated form of 1E12 inhibits platelet activation and prothrombotic effects induced by VITT antibodies. *Haematologica.* 7 avr 2022;107(10):2445-53.
25. Cai Z, Yarovoi SV, Zhu Z, Rauova L, Hayes V, Lebedeva T, et al. Atomic description of the immune complex involved in heparin-induced thrombocytopenia. *Nat Commun.* 22 sept 2015;6(1):8277.
26. Mayo KH, Chen MJ. Human Platelet Factor 4 Monomer-Dimer-Tetramer Equilibria Investigated by ¹H NMR Spectroscopy+.
27. Weber SN, Nowak I, Grünhage F, Lammert F. Effects of blocking chemokine receptor CCR1 with BX471 in two models of fibrosis prevention and rescue in mice. *Biochem Biophys Rep.* sept 2021;27:101077.
28. Seki E, De Minicis S, Gwak GY, Kluwe J, Inokuchi S, Bursill CA, et al. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *J Clin Invest.* 15 juin 2009;JCI37444.

29. Gray AL, Karlsson R, Roberts ARE, Ridley AJL, Pun N, Khan B, et al. Chemokine CXCL4 interactions with extracellular matrix proteoglycans mediate widespread immune cell recruitment independent of chemokine receptors. *Cell Rep.* janv 2023;42(1):111930.
30. Gupta SK, Singh JP. Inhibition of endothelial cell proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression. *J Cell Biol.* 15 nov 1994;127(4):1121-7.
31. Bikfalvi A. Platelet Factor 4: An Inhibitor of Angiogenesis. *Semin Thromb Hemost.* 29 juill 2004;30(03):379-85.
32. Moreau A, Mercier A, Thériault O, Boutjdir M, Burger B, Keller DI, et al. Biophysical, Molecular, and Pharmacological Characterization of Voltage-Dependent Sodium Channels From Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Can J Cardiol.* févr 2017;33(2):269-78.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) . Estelle ARCHER.....

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : 21911108

N° Thèse : ...79.....

Nom et Prénom : ARCHER Estelle

Sujet : Étude du rôle du facteur plaquettaire 4 sur les fibroblastes cardiaques et les cardiomyocytes en conditions d'ischémie-reperfusion.

Tours, le : 23.10.2023.

Le(s) Directeur(s) de Thèse :


Claire Pauriol


Jérôme Rollin

**Vu et Transmis :
Le Doyen**

Le directeur de la Faculté
des Sciences Pharmaceutiques

Pr Denys BRAND



NOM, PRÉNOM de l'étudiant ARCHER, Estelle

N° 79

TITRE DE LA THÈSE

Étude du rôle du facteur plaquettaire 4 sur les fibroblastes cardiaques et les cardiomyocytes en conditions d'ischémie-reperfusion

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Les lésions d'ischémie-reperfusion associées à l'infarctus du myocarde induisent chez certains patients un remodelage cardiaque post-infarctus qui conduit notamment à l'apparition d'une fibrose cardiaque. La formation du thrombus au cours de l'infarctus du myocarde, induit une activation plaquettaire et la libération massive de chimiokines telles que le facteur plaquettaire 4 (FP4) qui pourrait participer aux lésions d'ischémie-reperfusion. L'objectif de ce travail a été d'étudier in vitro l'effet du FP4 sur les fibroblastes cardiaques et les cardiomyocytes en condition d'ischémie-reperfusion et de tester si les anticorps monoclonaux anti-FP4 peuvent moduler les effets du FP4. Pour cela, les fibroblastes cardiaques ont été incubés avec du FP4 recombinant ou purifié durant 24h en normoxie ou 1 à 5h en ischémie puis 24h en normoxie. Le FP4 purifié induit une augmentation d'expression d' α SMA et de collagène par les fibroblastes cardiaques en normoxie. En revanche, en condition d'ischémie-reperfusion, une augmentation d'expression d' α SMA est uniquement observée lorsque les fibroblastes sont incubés 1h en ischémie puis 24h en normoxie en présence de FP4. La viabilité des fibroblastes cardiaques n'est pas modifiée en présence de FP4 contrairement à la lignée cellulaire de cardiomyocytes AC16 pour laquelle la mortalité par apoptose est doublée. Les 3 anticorps anti-FP4 utilisés réduisent l'augmentation de l'expression de α SMA induite par le FP4 sur les fibroblastes cardiaques avec un effet plus important pour l'anticorps 1C12. Ces résultats montrent que le FP4 pourrait favoriser la différenciation des fibroblastes cardiaques et induire l'apoptose des cardiomyocytes mais ils doivent cependant être confirmés sur un plus grand nombre d'expériences. De plus, les anticorps anti-FP4 développés au laboratoire pourraient à terme constituer une nouvelle approche thérapeutique pour limiter les lésions d'ischémie-reperfusion.

MOTS-CLÉS SIGNIFICATIFS DE SON CONTENU, ATTRIBUÉS PAR LE CANDIDAT EN LIAISON AVEC LA BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE ET LES MEMBRES DU JURY

Plaquettes, Facteur plaquettaire 4 (FP4), lésions d'ischémie-reperfusion, remodelage post-infarctus

JURY

PRÉSIDENTE : Pr Véronique MAUPOIL-DAVID (pharmacien) - Professeure des Universités - Faculté de pharmacie de Tours

MEMBRES :

Pr Fabrice IVANES (médecin) - Professeur des Universités - Praticien hospitalier - Service de Cardiologie - CHRU Tours

Directrice : Pr Claire POUPLARD (pharmacien) - Professeure des Universités - Praticien hospitalier - Service d'Hématologie Hémostase - CHRU Tours

Co-directeur : Dr Jérôme ROLLIN (scientifique) - Chercheur - Service d'Hématologie Hémostase - CHRU Tours

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : 17 octobre 2023 - Faculté de pharmacie de Tours