

Université de Montréal

Rôle de la GTPase ARF6 dans l'invasion des cellules du muscle lisse
vasculaire

Par
Julie Artigalas

Pharmacologie et physiologie Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Pharmacologie

Juillet 2019

© Julie Artigalas, 2019

Université de Montréal
Pharmacologie et physiologie, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

**Rôle de la GTPase ARF6 dans l'invasion des cellules du muscle lisse
vasculaire**

Présenté par

Julie Artigalas

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Jean-François Gauchat
Président-rapporteur

Audrey Claing
Directeur de recherche

Simon-Pierre Gravel
Membre du jury

Résumé

Dans le contexte pathologique de l'athérosclérose, les cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) sont caractérisées par une prolifération et une migration accrue. La stimulation à l'Angiotensine II (Ang II) ou au facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) a tendance à promouvoir cette migration anormale. Cependant, ce phénomène seul n'est pas suffisant pour que les CMLV puissent migrer à travers le tissu environnant et envahir l'intima des vaisseaux sanguins. Les CMLV doivent alors dégrader la matrice extracellulaire et développer des structures nécessaires à l'invasion. Ce mouvement cellulaire est à l'origine d'une augmentation de la plaque athéromateuse responsable de nombreuses complications. Des données préliminaires ont montré que des facteurs de croissance ou hormones pouvaient induire l'invasion des CMLV.

Dans notre laboratoire, il a été montré que les facteurs d'ADP-ribosylation (ARF) permettent la régulation du remodelage phénotypique des CMLV, et jouent un rôle dans la prolifération et la migration cellulaire. Au cours de cette étude, nous allons donc examiner le rôle de ARF6 dans la formation de structures importantes pour l'invasion et l'activation de métalloprotéinases de la matrice dans les CMLV humaines.

En premier lieu, nous avons défini que la stimulation avec du PDGF ou de l'Ang II permet l'activation de la GTPase ARF6. En second lieu, nous avons mis en avant l'impact de la déplétion de ARF6 sur l'invasion cellulaire induite à la suite d'une stimulation avec le PDGF ou l'Ang II. Pour y parvenir, nous avons utilisé deux méthodes d'analyse de l'invasion, tout d'abord de la microscopie sur support gélatineux qui permet d'observer la dégradation de la matrice, ensuite des essais d'invasion sur du Matrigel dans des chambres de Boyden. Pour finir, nous avons voulu définir le mécanisme impliqué dans ce phénomène d'invasion cellulaire chez les CMLV humaines.

En somme nous avons montré, l'importance d'ARF6 dans l'invasion induite par des facteurs de croissance ou hormone. Et nous avons soumis l'hypothèse que ce mécanisme passe par l'activation de la voie des MAPK ou PI3K. L'élucidation de ces mécanismes cellulaires pourrait avoir un intérêt quant à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de l'athérosclérose.

Mots-clés : Muscle lisse vasculaire, ARF6, Athérosclérose, PDGF, dégradation, invasion

Abstract

In the pathological setting of atherosclerosis, vascular smooth muscle cells are characterized by an increased proliferation and migration. Stimulation of these cells with Angiotensin II (Ang II) or platelet-derived growth factor (PDGF) usually promotes this abnormal migration. However, this phenotype alone is not sufficient for VSMCs to migrate through surrounding tissues and infiltrate the blood vessels' intima. VSMCs must also be able to degrade extracellular matrix components and acquire the cellular structures necessary for invasion. The migration of VSMCs to the intima is responsible for the growth of the atherosclerotic plaque which leads to numerous complications. Preliminary data has shown that growth factors and hormones can cause the invasive phenotype of VSMCs.

Our group has demonstrated that the ADP-ribosylation factor (ARF) could regulate the phenotypic remodeling of VSMCs and, by extension, their proliferative and migrative capacities. During this study, we will examine the importance of ARF6 in the formation of important invasive cellular structures as well as matrix metalloproteinases activation in human VSMCs.

First, we have discovered and defined the connection between agonist stimulation and the activation of the small GTPase ARF6. We have also studied the impact of ARF6 depletion on cellular invasion following PDGF or Ang II stimulation. We have accomplished this using two methods commonly employed to analyze cellular invasion: Gelatine-based matrix degradation assays analyzed by microscopy and invasion assays on Matrigel in Boyden chambers. Lastly, we have tried to uncover the mechanistic behind this invasive phenotype observed in human VSMCs.

To summarize, we have demonstrated the importance of ARF6 in growth factors and hormone-induced cellular invasion and we have hypothesized that this activity is mediated by the activation of the MAPK or PI3K signaling pathways. The further characterization of these cellular mechanisms could lead to the discovery of novel therapeutic strategies in atherosclerosis.

Mots-clés : Smooth muscle cell, ARF6, Atherosclerosis, PDGF, degradation, invasion

Table des matières

Résumé.....	4
Abstract.....	5
Table des matières.....	6
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures.....	9
Liste des abréviations.....	10
Remerciements.....	14
Chapitre I : Introduction.....	15
I.1 Maladies cardiovasculaires.....	15
I.1.1 Athérosclérose et facteurs de risque.....	15
I.1.2 Pathogénèse de l'athérosclérose.....	16
I.1.3 Les traitements disponibles.....	18
I.2 Les cellules du muscle lisse vasculaire.....	20
I.2.1 Les différents phénotypes du muscle lisse vasculaire.....	20
I.2.2 Régulation du changement phénotypique des CMLV.....	21
I.2.3 L'implication des CMLV dans l'athérosclérose.....	23
I.2.4 Les différents modèles de CMLV.....	26
I.3 L'invasion cellulaire.....	27
I.3.1 La matrice extracellulaire.....	28
I.3.2 Les structures d'invasion.....	29
I.3.3 Les régulateurs clés de l'invasion.....	31
I.4 Le PDGF et les récepteurs tyrosine kinase.....	35
I.4.1 Les Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK).....	35
I.4.2 Les différentes voies de signalisation activées par le PDGF.....	37
I.4.3 L'impact du PDGF sur les CMLV.....	40
I.5 L'Angiotensine II et les récepteurs couplés aux protéines G.....	41
I.5.1 Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG).....	42
I.5.2 Les voies de signalisation activées par l'Ang II.....	43
I.5.3 Impact de l'angiotensine II sur les CMLV.....	44

I.6 Les facteurs d'ADP-ribosylation (ARFs)	46
I.6.1 Classification des ARFs.....	46
I.6.2 Mécanisme d'activation des ARFs	46
I.6.3 Inhibiteurs des ARFs	49
I.6.4 Rôle des ARFs	50
I.7 Objectifs et hypothèse de travail.....	52
Chapitre II : Role of ADP-ribosylation factor 6 in VSMC invasion	53
II.1 ABSTRACT	54
II.2 INTRODUCTION.....	55
II.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES	57
II.4 RESULTS.....	60
II.5 DISCUSSION	63
II.6 LEGENDS.....	65
II.7 REFERENCES.....	72
Chapitre III : Discussion	75
III.1 Caractérisation du modèle cellulaire.....	75
III.2 Activation de la petite GTPase ARF6.....	76
III.3 Le rôle d'ARF6 dans l'invasion cellulaire	76
III.4 Les voies de signalisation impliquées dans l'invasion cellulaire.....	78
III.5 Perspectives.....	80
III.6 Conclusion	80
Références.....	82
Annexe	95

Liste des tableaux

1. Les MMPs humaines et leurs substrats 33

Liste des figures

1. Infiltration des monocytes au sein de l'intima	17
2. Formation de la plaque athéromateuse	18
3. Régulation du phénotype des CMLV	23
4. L'impact des CMLV dans la progression de la pathologie	26
5. Schématisation d'un podosome	31
6. Signalisation du PDGFR à la suite d'une stimulation au PDGF-BB	39
7. Les voies de signalisation qui permettent l'activation des MAPK via AT1R	44
8. Schématisation des domaines des ARFs en fonction de leur liaison au GTP/GDP	47
9. Cycle d'activation des AR6	49

Figures de l'article :

1. Figure 1	67
2. Figure 2	68
3. Figure 3	69
4. Figure 4	70
5. Figure 5	71

Modèle présenté au cours du projet :

10. Schématisation du modèle présenté dans l'étude	81
--	----

Liste des abréviations

ADAM: désintégrines et métalloprotéinases

Ang II: angiotensine II

ARF: facteur d'ADP-ribosylation

ASAP1: *ArfGAP With SH3 Domain, Ankyrin Repeat And PH Domain 1*

AT1R: récepteur de type 1 de l'angiotensine

AVC : accident vasculaire cérébrale

BFA: brefeldine A

CMLV : cellule du muscle lisse vasculaire

COP: *coat protein*

EGF : facteur de croissance épidermique

EGFR: récepteur du facteur de croissance épidermique

ERK 1/2 : *extracellular signal-regulated kinase 1 ou 2*

FAK: kinase des adhésions focales

GAP: protéine régulatrice de l'activité GTPasique

GEF: facteur d'échange de guanine

GDP: guanosine diphosphate

GIT: *G protein-coupled receptor kinase-interacting thing*

Grb2: *growth factor receptor-bound protein 2*

GTP: guanosine triphosphate

HDL : lipoprotéine de haute densité

HMG-CoA : hydroxyméthylglutaryl-CoA

IGF-1: facteur de croissance apparenté à l'insuline

IL-1: interleukine 1

INSPQ : Institut national de santé publique du Québec

IP3: inositol-1,4,5-triphosphate

IRS-1: substrat du récepteur de l'insuline

LDL : lipoprotéine de faible densité

LDLR : récepteur de lipoprotéine de faible densité

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

MEC: matrice extracellulaire

MMP : métalloprotéase matricielle

MT1-MMP: métalloprotéase matricielle de type membranaire 1

NO: monoxide d'azote

NPC1L1: *Niemann-Pick C1-like protein 1*

PCSK9 : proprotéin convertase subtilisin/kexin type 9

PDGF: facteur de croissance dérivé des plaquettes

PDGFR: récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes

PDK1: kinase 1 dépendante des phosphoinositides

PI3K: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase

PIP2: phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIP5K: *phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase*

PKA: protéine kinase A

PKC: protéine kinase C

PLD: phospholipase D

PPAR : récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RCPG: récepteur couplé aux protéines G

RTK: récepteur tyrosine kinase

SH2: *Src Homology 2*

shRNA: petit ARN en épingle à cheveux

SMA : actine du muscle lisse

SOS: *son of sevenless*

SRF: *serum factor transcription*

TGF- β 1 : facteur de croissance transformant bêta 1

TNF: facteur de nécrose tumorale

WASP: protéine du syndrome de Wiskott-Aldrich

A mes parents,

Remerciements

Tout d'abord je voudrais remercier, Audrey qui m'a ouvert les portes de son laboratoire et permis d'en apprendre beaucoup sur la recherche, mais aussi sur moi-même. Merci pour ces deux belles années de partage, je repars grandie.

Un gros merci à mes parents de m'avoir offert cette possibilité et de m'avoir soutenu tout au long de mes études. Maman, merci pour nos millions d'appels et tous tes mots rassurants. Papa, merci de toujours poser un regard rempli de fierté sur moi, tu m'as donné toute la confiance dont j'avais besoin.

Un merci tout particulier à mon Nico. Tu as supporté mes doutes et mes émotions pendant ces deux années de maîtrise, mais tu m'as aussi apporté tout l'amour et le soutien qu'il me fallait pour réussir. Tu es le pilier de cette épopée.

Merci à mes amis les plus proches, qui ont subi mes péripéties de laboratoire tous les week-ends autour d'une bière. Max, Zach, Cedric et Cam, sans vous cette maîtrise n'aurait pas été la même.

Merci à toute l'équipe du laboratoire Claing qui m'a (beaucoup) écouté parler pendant deux ans. Shirley, Ricardo, Mohamed, Rodrigo et Frank, merci de m'avoir guidée. Pierre-Luc merci beaucoup pour ton aide sur ce mémoire et ta belle contribution artistique.

Merci aux copines de labo, pour les midis discussion interminables. Vero et Jess occupez-vous bien d'Émilie pour moi !

Merci à Lionel et Sarah d'avoir vécu une folle aventure avec moi, et d'être toujours présents pour me guider et me conseiller dans mes projets d'avenir.

Et je voudrais tout particulièrement remercier, Émilie. Merci pour tout ton travail acharné, pour toute l'aide que tu m'as apportée. Mais ce qui est le plus important c'est merci d'avoir partagé ces deux années avec moi au quotidien, ma musique, mes moments de folies puis surtout toutes nos belles discussions. Le V-416 restera un si beau souvenir grâce à toi.

Chapitre I : Introduction

I.1 Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont des pathologies qui touchent les vaisseaux sanguins et le cœur, se distinguant comme étant l'une des principales causes de décès au Canada. L'INSPQ a documenté l'ampleur de ces maladies, montrant qu'au courant de l'année 2015-2016, 730 000 Québécois âgés de 20 ans ou plus ont reçu un diagnostic de maladies cardiovasculaires et que 36 000 en sont décédées (Blais et Rochette, 2018). Ces maladies peuvent être causées par de nombreux facteurs de risques dont l'hypertension artérielle et l'athérosclérose. L'hypertension artérielle est reconnue lorsqu'un individu présente des pressions sanguines systolique et diastolique respectivement supérieures à 140 mmHg et à 90 mmHg. Ce qui est le cas de 7,5 millions de personnes au Canada (Agence de la santé publique du Canada, 2016). L'hypertension artérielle est considérée comme un des facteurs de risque au développement d'athérosclérose, c'est-à-dire la formation d'une plaque athéromateuse dans les vaisseaux sanguins (Institut de recherche en santé du Canada, 2016). Ces deux composantes sont des signes avant-coureurs de nombreuses complications comme l'accident vasculaire cérébrale (AVC) et l'infarctus du myocarde. Les maladies cardiovasculaires représentent un lourd bilan de décès, mais aussi un fardeau économique.

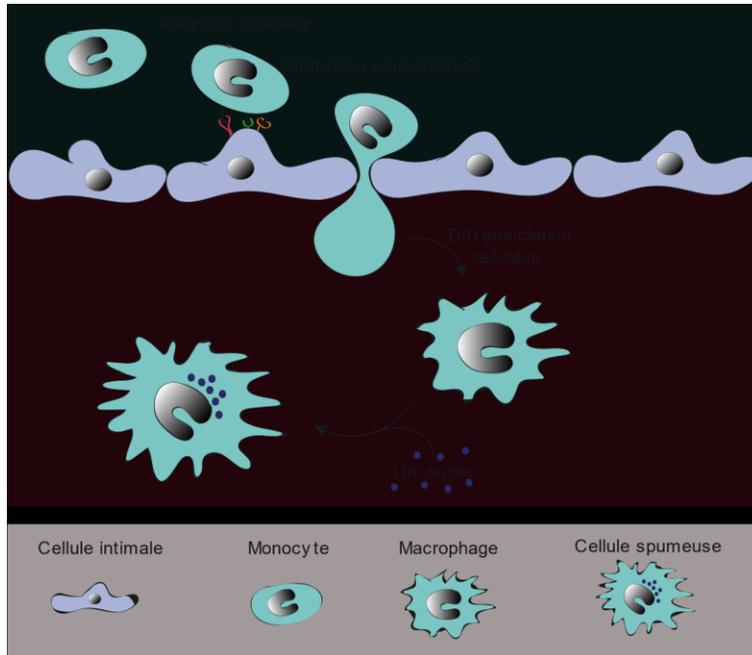
I.1.1 Athérosclérose et facteurs de risque

L'athérosclérose est caractérisée par une accumulation de lipides dans les artères entraînant la formation d'une plaque athéromateuse, ce qui implique une perte de la contractilité de celles-ci ainsi qu'une diminution de la lumière. Ce rétrécissement de la lumière des vaisseaux sanguins entrave la circulation sanguine, diminuant ainsi l'apport en oxygène vers certains organes. L'autre risque engendré par cette maladie est la rupture de la plaque, car elle peut entraîner la formation d'un caillot de sang qui peut aller se loger dans les vaisseaux sanguins ces complications sont à l'origine de l'infarctus du myocarde ou encore de l'AVC. L'athérosclérose

est une pathologie qui implique de nombreux facteurs de risque comme l'âge, le tabagisme, un faible niveau de HDL, le diabète, l'hypertension et un niveau de triglycérides élevé. (Rafieian-Kopaei, Setorki, Douidi, Baradaran et Nasri, 2014; Rahman et Woollard, 2017).

I.1.2 Pathogénèse de l'athérosclérose

Les lésions athérosclérotiques sont caractérisées par un épaississement de la couche interne de l'artère, l'intima. Ces lésions regroupent des composantes du tissu conjonctif, des lipides et des débris. La pathogénèse de l'athérosclérose est maintenant bien définie et comprend deux phases, une lipidique et une inflammatoire (Geovanini et Libby, 2018). Dans un premier temps, les cellules endothéliales sont sujettes à une activation inflammatoire et expriment des molécules d'adhésion à leur surface, ce qui permet aux monocytes et leucocytes d'être recrutés et de migrer vers l'intima (Figure 1). Le recrutement des cellules inflammatoires au niveau de l'intima se réalise grâce à différentes chimiokines et chémoattractants. Les monocytes une fois entrés dans l'intima se différencient en macrophages. De plus, les LDL (lipoprotéine de basse densité) vont s'accumuler au sein de l'intima et subir une oxydation. Cet événement est connu pour porter atteinte aux fonctions physiologiques mais aussi pour être responsable de l'activation des cellules endothéliales en induisant l'expression de molécules d'adhérences et de récepteurs de chimiokines à leur surface (Caligiuri, 2004; Hansson, 2001). Les LDL contribuent aussi au développement de l'athérosclérose via l'accumulation de macrophages, la régulation de leur activité, mais aussi la formation des cellules spumeuses. Les LDL sont aussi connus pour activer des certains gènes reliés à l'athérosclérose (Ahotupa, 2017). L'oxydation des LDL peut être d'origine enzymatique ou alors faire suite au relâchement de radicaux libres par les cellules à proximité : épithéliales, cellules du muscle lisse vasculaire (CMLV) et macrophages (Yoshida et Kisugi, 2010). Les macrophages vont alors grâce à des récepteurs éboueurs capter les LDL oxydés et générer des cellules spumeuses (Chistiakov, Bobryshev et Orekhov, 2016; Chistiakov, Melnichenko, Orekhov et Bobryshev, 2017). Celles-ci sont caractéristiques d'un athérome naissant. Les cellules spumeuses formées sécrètent des composés impliqués dans l'inflammation comme des cytokines et les *reactive oxygen species* (ROS) (Libby et al., 1996).

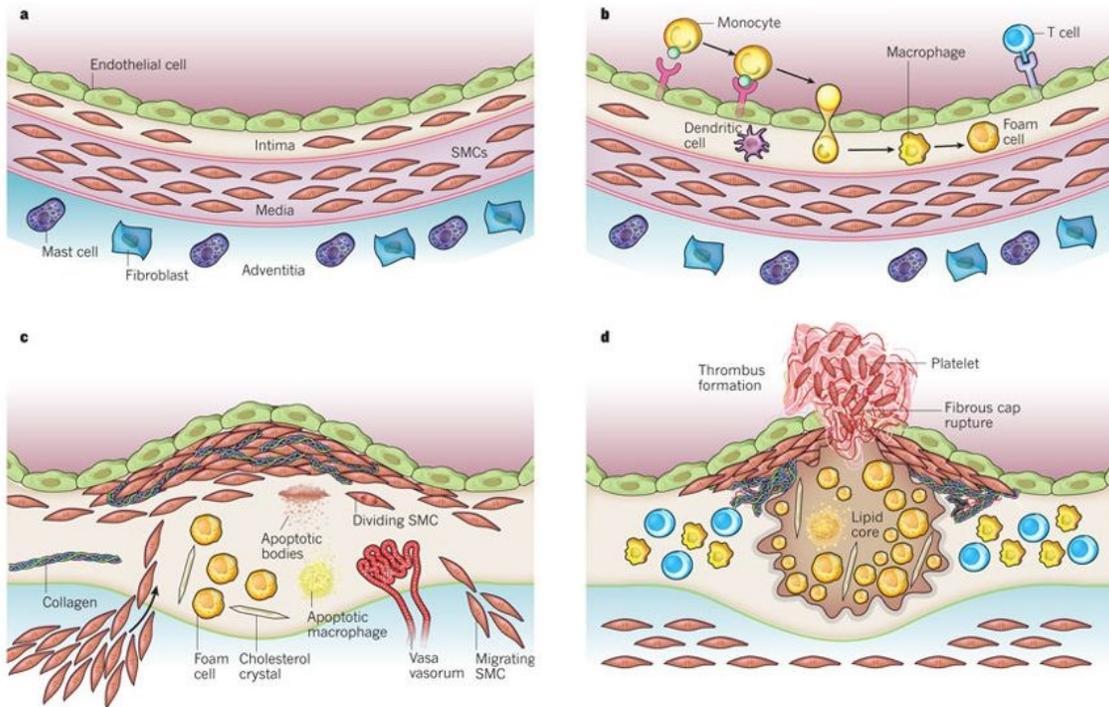


1. Infiltration des monocytes au sein de l'intima

Dans un contexte d'athérosclérose, les cellules endothéliales vont permettre l'adhésion et l'infiltration des monocytes au sein de l'intima. Lorsque ceux-ci entrent en contact avec les lipides oxydés dus à une forte accumulation de cholestérol et l'inflammation, il y a alors formation des cellules spumeuses. Adapté de (Bauters, 2009).

L'inflammation locale est alors amplifiée et le relâchement de facteurs de croissance et de cytokines est à l'origine d'une modulation phénotypique chez les CMLV. Les CMLV sous leur forme synthétique sont plus enclins à proliférer et migrer de façon accrue, mais aussi de générer des métalloprotéinases de la matrice (MMPs) afin de dégrader la matrice extracellulaire pour s'infiltrer au sein de l'intima. Ces cellules une fois dans l'intima vont proliférer et sécréter la majorité des protéines de la matrice trouvée dans la lésion athérosclérotique afin de former le capuchon fibreux de la plaque athéromateuse (Geng et Libby, 2002; Rudijanto, 2007). Toutes ces étapes peuvent mener à la formation d'un athérome au sein du vaisseau sanguin, réduisant en grande partie de la lumière de celui-ci (Figure 2). La stabilité de la plaque est l'élément qui détermine sa possibilité à subir une rupture. Effectivement, les plaques stables peuvent régresser ou alors progresser de façon lente, alors que les plaques instables sont sujettes à subir de l'érosion, des fissures ou encore une rupture (Thanassoulis et Afshar, 2017). La rupture d'une

plaque instable va entraîner un contact entre le sang et les matières thrombogéniques de celle-ci. La formation d'un thrombus peut entraîner des complications, comme l'infarctus du myocarde ou l'AVC (Geovanini et Libby, 2018). L'importance d'avoir des thérapies appropriées pour le traitement des maladies cardiovasculaires apparaît alors comme une évidence.



2. Formation de la plaque athéromateuse

À la suite de l'accumulation de cellules spumeuses au sein de l'intima, les CMLV synthétiques vont migrer et proliférer de façon incontrôlée. Le diamètre de la lumière du vaisseau est alors diminué. Enfin, l'instabilité de la plaque athéromateuse et de son capuchon fibreux peut amener à sa rupture et au relâchement d'éléments thrombogéniques. Tiré de (Libby, Ridker et Hansson, 2011).

I.1.3 Les traitements disponibles

L'athérosclérose est une pathologie qui présente différents grades cliniques. Dans un premier temps, celle-ci est principalement asymptomatique. L'accumulation de lipides dans l'intima, la formation de cellules spumeuses isolées ainsi que la présence de CMLV sont des éléments initiaux du développement de l'athérosclérose mais ils ne permettent pas de la déceler. De plus,

à ce stade, la plupart de ces caractéristiques sont réversibles grâce à un changement du mode de vie. La diminution de la lumière du vaisseau est l'évènement déclencheur des symptômes de la pathologie. En effet, la formation de plaques stables mène à la diminution du flux sanguin et de ce fait à l'augmentation d'accidents ischémiques transitoires. Pour finir, la rupture d'une plaque instable est responsable de l'apparition des symptômes les plus évidents qui sont l'AVC ou l'infarctus du myocarde. L'athérosclérose est donc une pathologie qui reste difficile à détecter avant qu'elle ait un impact important sur la santé du patient. (Stary Herbert, 2000; Stary Herbert et al., 1995; Thanassoulis et Afshar, 2017)

Le principal traitement de l'athérosclérose reste alors la prévention. En effet, la plupart des facteurs de risque peuvent être régulés par l'individu en tant que tel. Cependant, il existe différents traitements médicaux qui visent à diminuer les taux de LDL sanguin, (Geovanini et Libby, 2018; Lu et Daugherty, 2015). La plus utilisée des thérapies existantes sur le marché sont les statines, des inhibiteurs de l'enzyme HMG-CoA réductase, dans un but de réduire l'hypercholestérolémie. Les statines permettent de diminuer le cholestérol cellulaire, limiter la biosynthèse du cholestérol et diminuer les concentrations hépatiques en cholestérol, tout en augmentant l'expression des récepteurs du LDL (LDLR). Ceux-ci sont essentiels pour faciliter la clairance du LDL sanguin (Sirtori, 2014). Cependant, les inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase sont des traitements qui favorisent les interactions médicamenteuses, et qui ont aussi de nombreux effets secondaires, dont les plus connus sont la myopathie et la rhabdomyolyse (Simic et Reiner, 2015). Il existe d'autres traitements, qui sont souvent utilisés de concert avec les statines. Les fibrates, par exemple, réduisent les taux de triglycérides et augmentent les niveaux de HDL-C en ciblant l'activation du récepteur nucléaire PPAR α exprimé dans le foie, les muscles et les reins altérant ainsi l'expression de certains gènes régulateurs du métabolisme des lipides. Cependant, les fibrates sont des agents toxiques pour le foie et, de la même façon que les statines, ils peuvent entraîner des dommages musculaires (rhabdomyolyse) et de nombreuses complications (Okopien, Buldak et Boldys, 2018). C'est pour cette raison que l'industrie et la recherche académique se mobilisent pour trouver de nouvelles alternatives de traitements avec moins d'effets secondaires. L'Ezetimibe est une de ces thérapies, le médicament va empêcher l'absorption du cholestérol au niveau de l'intestin. La cible de cette molécule est le Niemann–Pick C1-like 1 protein (NPC1L1) connu comme étant un transporteur

intestinal de stérol. L'Ezetimibe a été montré efficace pour diminuer le cholestérol et induire une modification du profil lipidique de façon positive (Phan, Dayspring et Toth, 2012). Une des nouvelles classes de médicaments les plus récentes sur le marché sont les inhibiteurs de la Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9). Cette protéase hépatique se lie aux LDLR et les internalise dans les lysosomes afin de les détruire. La diminution de l'activité de cette peptidase permet alors de restaurer la quantité de récepteurs de LDL présents à la surface et donc de réduire les niveaux de LDL sanguin. Les inhibiteurs de PCSK9 sont des anticorps monoclonaux et ceux-ci sont utilisés malgré leur coût financier important (Chaudhary, Garg, Shah et Sumner, 2017). Malgré l'utilisation des différentes thérapies présentées ci-dessus, la médecine est toujours confrontée à une quantité énorme d'événements cardiovasculaires récurrents d'où l'importance de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Le domaine de la pharmacologie cardiovasculaire reste en pleine effervescence et cherche à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans ce travail, l'intérêt de cibler les CMLV est alors mis en avant.

I.2 Les cellules du muscle lisse vasculaire

Les gros vaisseaux sanguins, particulièrement les artères, sont formées de trois couches : l'adventice, la media et l'intima. L'adventice correspond à la couche externe du vaisseau et elle est principalement composée de tissus conjonctifs. L'intima quant à elle est la couche de cellules endothéliales en contact avec la lumière des vaisseaux. La media est l'élément essentiel à la vasoconstriction, en effet celle-ci est riche en collagène et élastine, mais aussi en CMLV qui sont responsables de la contractilité (Rudijanto, 2007).

I.2.1 Les différents phénotypes du muscle lisse vasculaire

Les CMLV présentent une plasticité phénotypique, mais aussi fonctionnelle afin de répondre à une lésion vasculaire. Par exemple en cas de dommages, celles-ci sont capables de changer de phénotypes, en passant du phénotype différencié ou « contractile » à un phénotype dédifférencié soit « synthétique ». Les CMLV, en condition basale, sont caractérisées par le phénotype

différencié associé à une expression stable de protéines contractiles du muscle lisse (α SMA, SM22 α), une prolifération lente et une migration quasi inexistante, ce qui leur permet de jouer leur rôle physiologique normal (Chistiakov, Orekhov et Bobryshev, 2015). De plus, les CMLV différenciées présentent un cytosquelette d'actine organisé (Zhang et al., 2016). Le phénotype synthétique quant à lui est la réponse à un stress ou une blessure vasculaire. Il est caractérisé par une diminution de l'expression des protéines contractiles, mais aussi par l'augmentation de la sécrétion de matrice extracellulaire, de la prolifération et la migration cellulaire. Ces modifications sont nécessaires lors de l'angiogenèse, le remodelage vasculaire et la réparation des vaisseaux (Chistiakov et al., 2015).

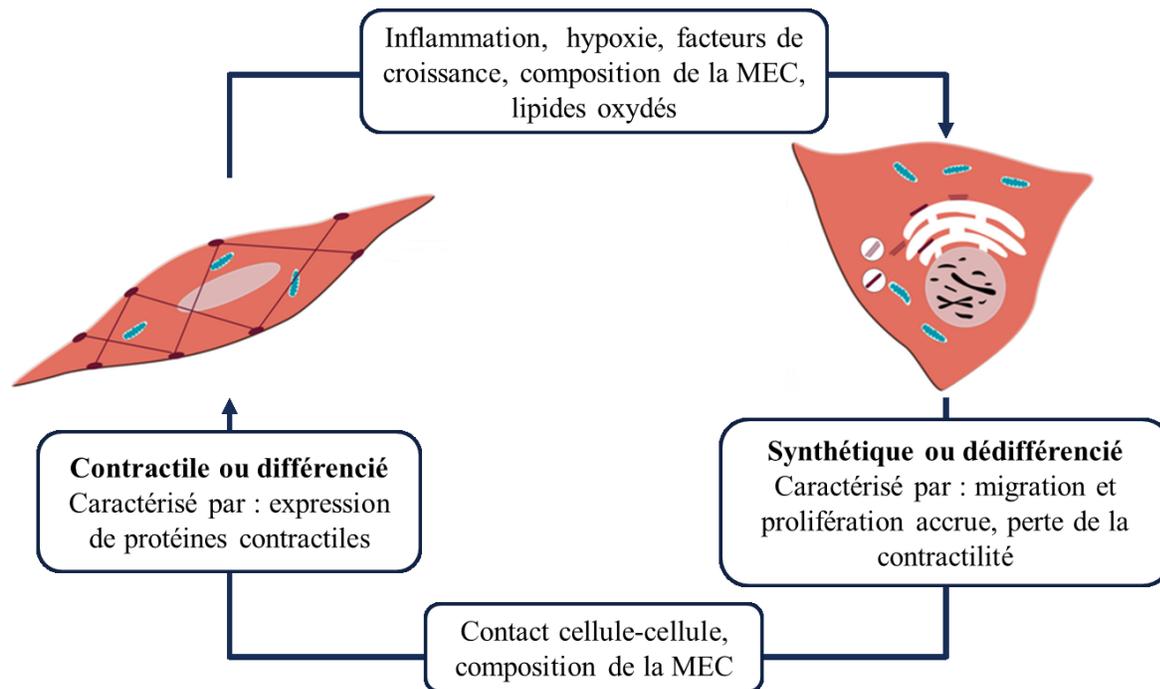
1.2.2 Régulation du changement phénotypique des CMLV

Les CMLV sont soumises à de nombreux facteurs externes qui sont responsables du changement phénotypique : des facteurs de croissances, des cytokines ou encore des contacts avec d'autres cellules ou le milieu extracellulaire. Le changement de phénotype est un phénomène réversible, il y a donc des facteurs qui vont induire un profil contractile et d'autres qui vont tendre à promouvoir un profil synthétique. Dans un premier temps, le contact entre les CMLV et les cellules endothéliales permet la différenciation des CMLV, soit en présentant des molécules spécifiques à leur surface, soit en sécrétant des micro-ARN ou encore du NO (Li, Qian, Kyler et Xu, 2018). Chez les CMLV, TGF- β 1 et IGF-1 (Hayashi et al., 1998) sont des molécules qui contribuent au maintien du phénotype contractile par l'augmentation de l'expression des protéines contractiles (Figure 3). De plus, certaines composantes de la matrice extracellulaire, comme le collagène IV et la laminine vont promouvoir la différenciation des CMLV et donc favoriser un phénotype physiologique (Barnes et Farndale, 1999). Récemment, de nombreuses études ont aussi montré que les micro-ARN sont impliqués dans le remodelage phénotypique. En effet certains contrôlent la différenciation comme d'autres vont influencer le phénotype synthétique des CMLV (Albinsson et Sessa, 2011).

Le phénotype dédifférencié quant à lui peut être aussi induit par de nombreux facteurs particulièrement dans un contexte de stress oxydatif, d'hypoxie et d'inflammation, mais aussi en présence de lipides oxydés (Figure 3). À la suite d'une blessure, différents types cellulaires comme les cellules endothéliales, les plaquettes et les cellules inflammatoires vont relâcher des

facteurs de croissance et des cytokines (Kaiura et al., 2000). Le PDGF-BB, par exemple, est considéré comme l'inhibiteur le plus efficace de la différenciation des CMLV. Il va donc favoriser le phénotype synthétique de ces cellules en réprimant l'activité du SRF, un facteur de transcription requis pour l'expression des gènes SM (*smooth muscle*) et la différenciation (Miano, Long et Fujiwara, 2007). La stimulation des CMLV au PDGF-BB est à l'origine de la répression de l'expression des protéines contractiles et l'activation de la prolifération cellulaire (Yoshida, Gan, Shang et Owens, 2007). De la même façon, une surexposition à l'Ang II, un peptide hypertenseur, va entraîner une dédifférenciation des CMLV. Le phénotype synthétique est aussi souvent promu par des facteurs pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1. La composition de la matrice extracellulaire joue aussi son rôle dans la dédifférenciation des CMLV en particulier la fibronectine et le collagène I (Stegemann, Hong et Nerem, 2005; Zhang et al., 2016).

L'ensemble de ces facteurs jouent des rôles biologiques importants, mais dans des conditions de stress physiologiques ou lorsque leur expression est dérégulée, ils peuvent avoir un impact sur la dédifférenciation des CMLV et sur le développement de l'athérosclérose.



3. Régulation du phénotype des CMLV.

Le changement phénotypique des CMLV est un élément essentiel du développement de l'athérosclérose qui est régulé par plusieurs facteurs. Certains vont favoriser le phénotype contractile et d'autres vont induire un phénotype synthétique qui a plus tendance à être présent en conditions pathologiques. En effet, les CMLV vont être caractérisées par une prolifération et une migration accrue induites par différents stimuli. Adapté de (Saleh, Iratni et Eid, 2015).

I.2.3 L'implication des CMLV dans l'athérosclérose

Il est maintenant reconnu que les CMLV jouent un rôle dans l'athérosclérose, dans son maintien et sa progression. Dans des conditions de vaisseaux adultes en santé, les CMLV assurent la contraction et la relaxation correcte des vaisseaux sanguins, assurant un tonus et une réactivité vasculaire normale. Ce sont dans ces conditions que les cellules sont sous leurs phénotypes contractiles. Cependant, dans des conditions où le flux sanguin est perturbé, le stress mécanique infligé aux parois des artères peut être à l'origine de la production de nombreuses molécules pro-inflammatoires. Ce stress mécanique peut-être induit par des conditions d'hypertension par

exemple (Chistiakov et al., 2015). La présence de ROS dans le sang ainsi que des niveaux de glucose et cholestérol élevés sont responsables de la perméabilité de l'endothélium et lui confèrent ses caractéristiques immunogéniques. (Bacakova et al., 2018).

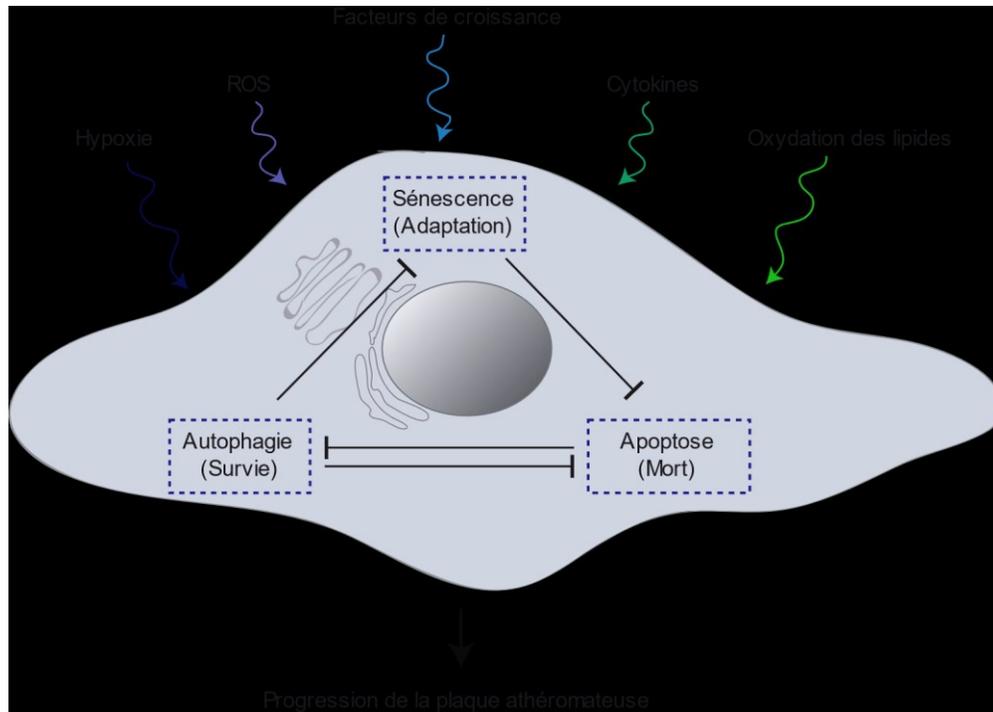
Donc, lors d'une blessure mécanique ou biochimique au niveau de l'intima, les cellules endothéliales, les plaquettes et les cellules inflammatoires vont relâcher de nombreux médiateurs du changement phénotypique des CMLV. C'est ce phénomène et le passage des cellules dans un état dédifférencié qui jouerait un rôle dans le développement de l'athérosclérose, mais aussi au niveau de la stabilité de la plaque (Bennett, Sinha et Owens, 2016a). Le phénotype synthétique est caractérisé comme étant pro-athérogénique et les CMLV dédifférenciées semblent induire le développement de la plaque. En effet, dans leur état synthétique, les CMLV synthétisent de grande quantité de collagènes et sont responsables à leur tour de la production de facteurs de croissance et de cytokines qui entraînent un recrutement des cellules inflammatoires (Patel, Cardneau, Colles et Graham, 2006). Ce phénotype est aussi souvent associé aux macrophages, car les CMLV présentent différents récepteurs liés à l'absorption du cholestérol à leur surface, ce qui favoriserait alors la formation de cellules spumeuses et donc l'initiation de la plaque athéromateuse. Différents facteurs de croissance, les lipides oxydés ou encore les cytokines pro-inflammatoires vont aussi promouvoir la prolifération cellulaire et la migration des CMLV jusqu'à l'intima. C'est ici qu'elles vont jouer leur rôle dans la formation de la plaque. En effet, en condition inflammatoire, les cellules restent confinées dans le phénotype synthétique, ce qui entraîne une prolifération et une migration accrue. Cependant la migration cellulaire est un phénomène difficile à recenser chez les humains, car il s'agit de la seule espèce à posséder des CMLV similaires dans la media, mais aussi dans l'intima en condition normale (Bacakova et al., 2018).

Toutefois, le remodelage phénotypique n'est pas le seul événement par lequel les CMLV sont impliquées dans la pathologie (Grootaert et al., 2018). En effet, à un certain stade de la formation de la plaque, les CMLV par leur capacité à former de la matrice extracellulaire, sont principalement nécessaires à la formation d'un capuchon fibreux. Celui-ci a pour effet premier de stabiliser l'athérome. Malgré l'aspect bénéfique que semble être une stabilisation de la plaque, la présence de CMLV peut aussi s'avérer contre-productive. L'apoptose des CMLV

peut être induite par différents facteurs comme les cytokines pro-inflammatoires, les lipides oxydés, une blessure mécanique ou encore des niveaux élevés de NO (Lee et Chau, 2001). Cet événement va participer à la vulnérabilité de la plaque, et donc à la formation d'un thrombus sanguin. Dans ce cas, les cellules apoptotiques vont exposer de la phosphatidylserine à leur surface et vont alors contribuer à l'activation de la cascade de coagulation (Flynn, Byrne, Baglin, Weissberg et Bennett, 1997). Celles-ci sont aussi à l'origine de la calcification des plaques ou encore de la nécrose cellulaire. Tous ces mécanismes pointent vers le fait que l'apoptose des CMLV est impliquée dans l'instabilité de la plaque (Grootaert et al., 2018).

La sénescence cellulaire est un phénomène par lequel les cellules normales cessent de se diviser. Il s'agit d'un processus physiologique qui entraîne un ralentissement des fonctions cellulaires et tissulaires. En diminuant la prolifération des CMLV, le capuchon fibreux retrouve une certaine instabilité et va avoir plus de difficulté à se reformer à la suite d'une rupture, de plus cela peut entraîner la formation de nécrose (Wang et al., 2015). En effet, les CMLV en sénescence vont sécréter des protéases qui dégradent la matrice, et produire beaucoup moins de collagène, donc leurs propriétés stabilisatrices sont diminuées. Il est connu que les cellules sénescents vont relâcher des composantes du SASP (*senescence-associated secretory phenotype*) qui incluent des médiateurs de l'inflammation, pouvant aussi promouvoir le relâchement de cytokines, mais aussi le recrutement de cellules inflammatoires (Uryga et Bennett, 2016). La sénescence dans un contexte d'athérosclérose participe activement à l'instabilité de la plaque via une diminution du capuchon fibreux et une augmentation de l'activité inflammatoire. L'autophagie, quant à elle, est une balance à conserver dans des conditions athérosclérotiques. En effet, lorsque celle-ci est défectueuse, elle contribue à une augmentation de la mort cellulaire et de la sénescence. Alors qu'une autophagie effective va permettre d'inhiber la mort cellulaire (Grootaert et al., 2015).

Le rôle des CMLV dans le développement de l'athérosclérose est encore mal défini. En effet, malgré leur capacité à stabiliser le capuchon fibreux, celles-ci sont aussi responsables d'une augmentation de l'inflammation au niveau de la plaque (Figure 4). Il est donc important de comprendre leur implication au niveau pathologique (Bennett, Sinha et Owens, 2016b).



4. L'impact des CMLV dans la progression de la pathologie

Dans un contexte pathologique, les CMLV reçoivent de nombreux signaux extracellulaires régulant leur phénotype mais aussi leur sénescence, mort cellulaire et autophagie. Ces trois facteurs semblent jouer un rôle dans la stabilité de la plaque athéromateuse, de façon bénéfique ou négative. Adapté de (Grootaert et al., 2018)

I.2.4 Les différents modèles de CMLV

Les principaux modèles cellulaires permettant d'étudier la croissance des CMLV sont des cellules issues du rat. Dans le laboratoire du Dre Claing, les CMLV de rats ont été principalement utilisées dans les études précédentes. Les CMLV étaient issues de rats de Sprague-Dawley ou de Wistar-Kyoto (WKY) et ont été isolées par la technique d'explant, puis conservées dans des conditions de haut niveau de glucose dans du milieu supplémenté en sérum. Les CMLV aortiques ont été isolées de rats de Wistar-Kyoto par la technique d'explant, puis conservées dans des conditions de haut niveau de glucose dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de FBS. Ces isolations ont été réalisées dans les laboratoires des Drs Servant et

Méloche (Douillette et al., 2006; Giasson et Meloche, 1995). La lignée Sprague-Dawley a été par la suite immortalisée avec un clone SV40LT-SMC. Cette lignée possède les caractéristiques des cellules du muscle lisse vasculaire, cependant elle semble présenter une plus grande densité cellulaire, il a donc été déduit que ces cellules n'ont pas besoin d'autant de sérum que des cellules primaires pour proliférer (Reilly, 1990). Les CMLV aortiques isolées des rats de WKY ont, quant à elles, une polyploïdisation plus élevée que celles isolées d'autres souches de rats. Ces deux souches de rats sont normotendus. Il existe d'autres souches de rats qui sont spontanément hypertendus (SHR) et qui donnent des lignées qui présentent un profil de polyploïdisation plus lent. La souche de rats peut donc avoir un impact sur la migration et la prolifération des CMLV, il est donc important d'avoir le modèle le plus représentatif. De plus, malgré leur forte homologie, les modèles de rats et humains présentent des différences. En effet, l'arginase I est exprimée chez le rat alors que les cellules CMLV humaines expriment l'arginase II. Cette enzyme est essentielle à la prolifération des cellules, mais aussi la sécrétion de collagène (Bacakova et al., 2018). Cette différence pourrait jouer un rôle important dans l'élucidation des mécanismes impliqués dans le développement de l'athérosclérose. C'est pour cela qu'il est primordial de travailler avec un modèle qui s'approche le plus possible de la physiologie humaine. Les études poursuivies maintenant au sein du laboratoire utilisent alors des lignées primaires de CMLV issues d'aorte humaine.

I.3 L'invasion cellulaire

L'invasion cellulaire correspond à l'aptitude des cellules à se déplacer à travers des tissus, mais aussi la matrice extracellulaire. Ce phénomène, à l'origine physiologique, peut s'avérer pathologique. En effet, il est bien connu chez les cellules cancéreuses lors du développement de métastases. Mais aussi dans des conditions athérosclérotiques, les CMLV sont elles aussi capables de migrer et s'infiltrer dans une couche environnante. Ce processus est complexe, car il est guidé par des paramètres cellulaires, mais aussi environnementaux. La migration et l'invasion sont deux mouvements qui présentent des similarités. Cependant, ils impliquent un fonctionnement différent. En effet, lors d'un déplacement lié à l'invasion des cellules, il y a dégradation de la matrice extracellulaire (Louis et Zahradka, 2010). Ce mécanisme peut être

observé de différentes façon. Il est possible d'effectuer des essais de migration à travers un substrat qui a pour but de mimer la matrice extracellulaire ou encore des essais de dégradation en microscopie. Brièvement, les cellules sontensemencées sur un substrat couplé à un fluorophore, et lorsqu'il y a dégradation celui-ci est libéré ce qui amène à une augmentation de la fluorescence. Ces deux méthodes permettent de mettre en avant l'invasion cellulaire mais aussi la dégradation de la matrice extracellulaire (Artym, Yamada et Mueller, 2009; Justus, Leffler, Ruiz-Echevarria et Yang, 2014).

I.3.1 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est une structure tridimensionnelle non cellulaire. Ce réseau de macromolécules n'est pas simplement une structure inactive, en effet, il contribue à la régulation de nombreux mécanismes cellulaires comme la différenciation, mais aussi la migration (Bonnans, Chou et Werb, 2014; Theocharis, Skandalis, Gialeli et Karamanos, 2016). Il existe deux formes de MEC, l'interstitielle et la péricellulaire, qui se différencient par leur positionnement par rapport à la cellule. Elles sont caractérisées par de nombreuses macromolécules principalement du collagène, de la fibronectine, des protéoglycans, du hyaluronan, de l'élastine, de la laminine, donc principalement des protéines fibreuses (Frantz, Stewart et Weaver, 2010). Les fibroblastes sont les principaux responsables de la formation de la MEC. Cependant, les CMLV et d'autres types cellulaires peuvent aussi être responsables de sécréter des composantes de la MEC.

La MEC est un élément nécessaire pour maintenir l'homéostasie. En effet, toutes les cellules interagissent avec cette matrice via des récepteurs qui sont présentés à leur surface comme les intégrines ou les récepteurs des protéoglycans. L'environnement de la cellule devient alors important, et permet de réguler la fonction biologique des cellules adjacentes. Comme discuté plus haut (I.2), un changement de la composition de la matrice peut être à l'origine du changement phénotypique des CMLV. Malgré son rôle dans l'homéostasie, la matrice peut alors amener à des modifications pathologiques (Theocharis et al., 2016). Dans le contexte pathologique de l'athérosclérose, la MEC est impliquée à différents stades. Tout d'abord, elle joue un rôle dans la formation de la plaque, en effet il est connu que la composition en collagène est fortement augmentée au niveau de l'athérome (Lodish H, 2000). La dégradation de la matrice et la production de MMPs sont deux phénomènes qui induisent des changements dans sa

conformation mais qui influencent aussi le développement de la plaque athérosclérotique. En permettant, par exemple, la migration et l'invasion des CMLV. Finalement, le capuchon fibreux de la plaque est très riche en MEC alors que le corps lipidique est enclin à une dégradation accentuée, ce qui est à l'origine de la vulnérabilité de la plaque. La MEC est donc impliquée à différents niveaux dans le développement de l'athérosclérose (Katsuda et Kaji, 2003).

I.3.2 Les structures d'invasion

L'invasion cellulaire est le processus qui permet aux cellules de se déplacer à travers la MEC, et pour ceci les cellules ont besoin de structures clés nécessaires qui sont appelées les invadosomes. Ce sont des protrusions riches en actine qui se situent sur la surface ventrale des cellules. Il en existe deux formes : les invadopodes et les podosomes (Linder, 2009).

Les invadopodes, tout d'abord, sont plus connus pour être présents dans les cellules cancéreuses. Ils prennent naissance au niveau du Golgi, à proximité du noyau et peuvent se rendre jusqu'à l'intérieur de la MEC. Ces structures sont observables durant plusieurs heures et sont généralement assez volumineuses. Les podosomes, quant à eux, sont observés dans les CMLV. Ils sont principalement superficiels et plus petits que des invadopodes. Cependant, ils sont souvent présents en plus grand nombre dans la cellule (Murphy et Courtneidge, 2011). Ce sont ces derniers qui nous intéressent, car ils sont produits par les CMLV. Les podosomes présentent un noyau d'actine, principalement sous la forme de la F-actine, des régulateurs de l'actine comme WASP et le complexe Arp2/3. Ce noyau d'actine est délimité par des protéines d'adhésion comme la paxiline, la vinculine et la taline ainsi que des protéines de signalisation, dont plusieurs kinases (Figure 5). Aux alentours des podosomes, on retrouve aussi des intégrines, des protéases, des GTPases et de nombreux autres médiateurs (Linder et Kopp, 2005).

Les podosomes sont des structures multifonctionnelles qui agissent via le contact avec la MEC. Les fonctions pour lesquelles les podosomes sont les plus connus sont l'adhésion et la dégradation de la matrice. Les podosomes participent à l'adhésion grâce à leur composition enrichie en protéines spécialisées dans les interactions avec la matrice comme les intégrines. Ces résultats corroborent avec l'observation des podosomes seulement dans des types cellulaires adhérents,

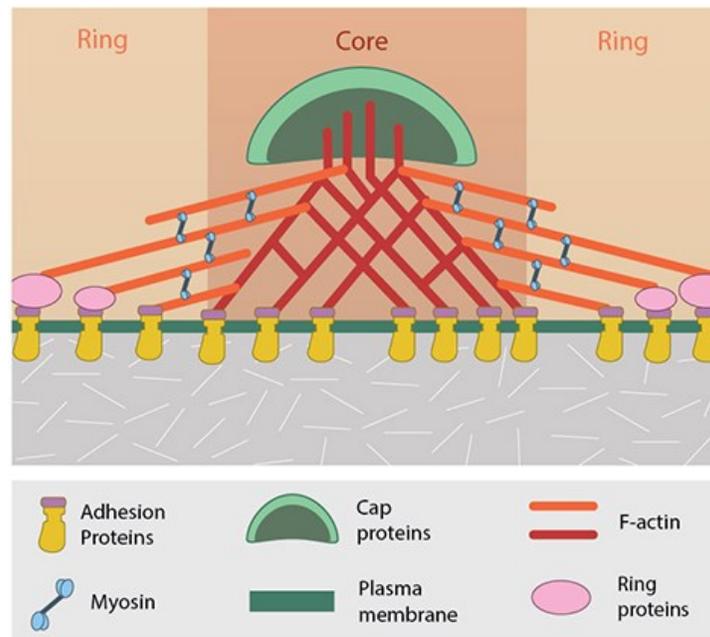
mais aussi seulement du côté de la cellule qui se lie à la matrice. La dégradation de la matrice est un accomplissement des podosomes. La dégradation médiée par les podosomes est caractéristique, car elle est principalement superficielle et prend beaucoup d'espace. C'est pour cela que souvent, c'est l'aire de dégradation qui est mesurée comparativement aux invadopodes qui vont dégrader de façon beaucoup plus profonde à un endroit spécifique. Afin de dégrader la matrice, les podosomes produisent localement des enzymes spécialisées, tels que les MMPs ou encore les protéases de sérine. Les podosomes ne sont pas seulement impliqués dans ces phénomènes. Ils peuvent aussi jouer un rôle dans la migration cellulaire. Même si ce rôle n'est pas clairement défini, il apparaît comme possible. En effet, les podosomes, par leur localisation sur la cellule et leur contact avec la matrice, sont des structures de prédilection pour favoriser la migration directionnelle (Linder et Kopp, 2005; Murphy et Courtneidge, 2011).

La formation de ces structures commence par l'adhésion des cellules à la MEC. Les podosomes sont des structures dynamiques et la régulation de leur formation est caractérisée par l'assemblage, la maturation et, par la suite, le désassemblage. En effet, il est important de contrôler la formation de ces structures, mais aussi l'interruption de celles-ci. Tsk5 est une protéine nécessaire à la formation des podosomes. Celle-ci est colocalisée avec la cortactine, dont elle réalise le recrutement lorsqu'elle est phosphorylée. CDC42 forme un complexe actif avec (N)-WASP et Arp2/3 qui sont à l'origine de la formation de filaments d'actine (Kaverina, Stradal et Gimona, 2003). L'activation de Src/PKC est connue pour être à l'origine de la phosphorylation de la cortactine permettant le recrutement de différents effecteurs comme les intégrines (Tatin, Varon, Genot et Moreau, 2006). Cependant, la formation des podosomes peut aussi être engendrée par des facteurs extérieurs tels que le PDGF, TGF β et EGF (Linder, 2007).

Le recrutement des MMPs, quant à lui, est l'étape essentielle à la maturation des podosomes. Cet événement semble être régulé par Tsk5 et cortactine, qui permettraient de localiser l'action des MMPs aux sites nécessaires. Une étape clé de la maturation des podosomes reste la localisation membranaire de MT1-MMP, son association avec l'intégrine β 1 et son interaction avec le podosome. La régulation du désassemblage de celui-ci est encore très peu connue. Cependant, certaines pistes se concentrent sur les phosphatases. En effet, celles-ci permettraient de déphosphoryler et donc désactiver l'activité des podosomes dont toutes les étapes de

recrutement sont issues d'une phosphorylation initiale (Linder, Wiesner et Himmel, 2011; Murphy et Courtneidge, 2011).

Chez les CMLV, les podosomes ont pu être observés à la suite d'une stimulation au PDGF, de la même façon que la production de MMP2 (Quintavalle, Elia, Condorelli et Courtneidge, 2010; Seo et al., 2013).



5. Schématisation d'un podosome

Le noyau est composé principalement de F-actine et il est encerclé par des anneaux composés de paxilline ou de taline. Toutes ces structures d'actine effectuent des liens via la myosine II et interagissent avec la matrice extracellulaire en adhérant à l'aide d'intégrines. Ces structures d'actine sont principalement ventrales et adoptent une forme conique. Tiré de (Mechanobiology Institute, 2018).

I.3.3 Les régulateurs clés de l'invasion

L'invasion cellulaire est un phénomène qui peut être régulé par différents modulateurs. Les MMPs en font partie. Ces protéases sont classées en six groupes : les gélatinases, collagénases, les stromelysines, matrilusines ou encore les MT-MMPs (le 6^{ème} groupe correspond aux autres MMPs). Dans les podosomes, ce sont les MT1-MMPs, MMP-2 et MMP-9 qui sont connues

pour être les plus impliquées (Theocharis et al., 2016). MT1-MMP est nécessaire à l'activation de l'activité protéolytique des MMP2 et 9 qui sont des gélatinases. Celles-ci ont pour caractéristiques d'être responsable de la dégradation de la MEC. La MT1-MMP est localisée à la membrane, elle est à l'origine d'une interaction avec la cortactine mais aussi avec des intégrines et des Rho-GTPases (Itoh, 2006). Une autre famille de protéases, les ADAMs, est aussi impliquée dans la dégradation de la MEC, mais peut aussi jouer un rôle dans la transactivation de certains récepteurs comme l'EGFR. Les ADAMs interagissent avec l'intégrine $\beta 1$ mais aussi Tsk5 (Abram et al., 2003). Les MMPs humaines sont classifiées dans le Tableau 1.

1. Les MMPs humaines et leurs substrats

Classification	Nom d'origine	Substrat de la matrice extracellulaire
MMP-1	Collagénase-1	Collagène types I, II, III, VII, VIII, X, et gélatine, aggrécane, caséine, nidogène, serpinine, versicane, perlécane, protéoglycane, et ténascine-C
MMP-2	Gélatinase-A	Collagène types I, IV, V, VII, X, XI, XIV, et gélatine, aggrécane, élastine, fibronectine, laminine, nidogène, protéoglycane, et versicane
MMP-3	Stromélysine-1	Collagène types II, IV, IX, X, et gélatine, aggrécane, caséine, décorine, élastine, fibronectine, laminine, nidogène, perlécane, protéoglycane, et versicane
MMP-7	Matrilysine-1	Collagène types I, II, III, V, IV, et X, aggrécane, caséine, élastine, énectine, laminine, et protéoglycane
MMP-8	Collagénase-2, neutrophil collagenase	Collagène types I, II, III, V, VII, VIII, X, et gélatine, aggrécane, laminine, et nidogène
MMP-9	Gélatinase-B	Collagène types IV, V, VII, X, and XIV, fibronectine, laminine, nidogène, protéoglycane, et versicane
MMP-10	Stromélysine-2	Collagène types III, IV, V, et gélatine, fibronectine, laminine, and nidogène
MMP-11	Stromélysine-3	Laminine
MMP-12	Macrophage metalloélastase	Elastine
MMP-13	Collagénase-3	Collagène types I, II, III, IV, V, IX, X, XI, et gélatine, aggrécane, fibronectine, laminine, perlécane, and ténascine
MMP-14	MT1-MMP	Collagène types I, II, III, et gélatine, aggrécane, dermatan-sulfate, protéoglycane, fibrine, fibronectine, laminine, nidogène, perlécane, ténascine, et vitronectine
MMP-15	MT2-MMP	Collagène types I, II, III, et gélatine, aggrécane, fibronectine, laminine, nidogène, perlécane, ténascine, et vitronectine
MMP-16	MT3-MMP	Collagène types I, III, et gélatine, aggrécane, caséine, fibronectine, laminine, perlécane, et vitronectine
MMP-17	MT4-MMP	Gélatine, fibrine, fibronectine

Adapté de (Somerville, Oblander et Apte, 2003)

Les intégrines sont un autre modulateur de la régulation de l'invasion cellulaire. Ce sont des récepteurs qui lient la MEC et transmettent les signaux extracellulaires à la cellule via les voies de signalisations impliquant FAK et Src. Elles sont impliquées dans l'adhésion cellulaire en liant le cytosquelette d'actine. Ce positionnement membranaire fait d'elles les régulateurs idéaux pour les podosomes (Hood et Cheresch, 2002; Louis et Zahradka, 2010). L'intégrine $\beta 1$ est retrouvée dans la structure des podosomes. En effet, il a été montré que son activation permet de promouvoir la dégradation de la matrice (Linder, 2007).

La régulation des podosomes par les Rho-GTPases est un phénomène désormais bien caractérisé, bien que les modes d'action diffèrent en fonction du type cellulaire. Comme discuté plus haut, CDC42, sous sa forme active, est responsable de la formation des podosomes. RhoA et Rac1, quant à elles, tendent à être impliquées dans le désassemblage des podosomes, leur forme active et inactive pouvant interagir avec les structures (Burns, Thrasher, Blundell, Machesky et Jones, 2001). Pour finir, les microARN-143 et -145, sont impliqués dans le phénotype synthétique des CMLV et sont à l'origine de la régulation de la formation des podosomes (Quintavalle et al., 2010). Tout comme le stress oxydatif qui est aussi un des inducteurs majeurs de la formation de ces structures de l'invasion. (Diaz et al., 2009)

L'invasion cellulaire est donc un processus complexe, balançant entre homéostasie et pathologie. Il est donc important de comprendre son implication dans l'athérosclérose ainsi que son fonctionnement.

I.4 Le PDGF et les récepteurs tyrosine kinase.

Les récepteurs sont classés en quatre catégories principales : les récepteurs canaux, les récepteurs nucléaires, les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) et les récepteurs à activité enzymatique. Dans cette étude, l'emphasis a été mise sur les RCPG et les récepteurs à activité enzymatique. En effet, ceux-ci sont connus pour jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose.

I.4.1 Les Récepteurs Tyrosine Kinase (RTK)

Les RTK forment une famille de récepteurs qui présentent une activité tyrosine kinase intrinsèque. Ces récepteurs ont une structure qui est bien définie, qui comporte quatre domaines. Le domaine extracellulaire est celui qui est responsable de la liaison avec le ligand, et sa structure peut varier en fonction de la nature du ligand. Le domaine transmembranaire, quant à lui, permet l'ancrage dans la membrane. À l'intérieur de la cellule, nous retrouvons le domaine catalytique. Tout d'abord la partie kinase, qui est essentielle à l'activité biologique du récepteur, celle-ci peut être sujette à une activation constitutive ou des mutations inactivatrices. Dans les deux cas, il peut y avoir un impact pathologique. Finalement le dernier domaine C-terminal et inter-kinase, qui correspond à l'extrémité intrinsèque du récepteur, est le lieu d'autophosphorylation du récepteur, mais aussi nécessaire à la transduction du signal au niveau intracellulaire (Yarden et Ullrich, 1988). Il existe 58 récepteurs de type RTK classifiés dans différentes sous-classes (Hubbard et Miller, 2007). Le récepteur associé au PDGF (PDGFR) fait partie de la classe III. Cette classe est caractérisée par cinq domaines « *Ig-like* » dans leur section extracellulaire, un domaine transmembranaire unique. Leur domaine intracellulaire consiste en une section juxtamembranaire bien conservée, un domaine tyrosine kinase possédant une longue séquence hydrophile qui ne présente pas d'homologie avec les kinases (Heldin et Lennartsson). Il existe quatre gènes codants pour le PDGF, le A, B, C et D. Sachant que les ligands des RTK de la classe III se présentent sous forme de dimères, il existe une version hétérodimérique qui est le PDGF-AB. Il s'agit pour l'instant du seul hétérodimère qui a été reporté. Le plus représenté dans l'athérosclérose est le PDGF-BB. Le projet met l'emphasis sur ce dimère car il est connu pour jouer un rôle dans la dédifférenciation, migration et l'invasion des CMLV (Blank et Owens,

1990). D'un autre côté, le PDGF-AA ne semble pas avoir un rôle prédominant dans le développement de l'athérosclérose (Seo et al., 2013). Depuis quelques temps, le PDGF-DD apparaît aussi comme un élément essentiel à la modulation phénotypique des CMLV. (Thomas et al., 2009). Les PDGFR possèdent eux aussi différents gènes, le PDGFRA et PDGFRB (Kazlauskas, 2017). Le PDGFRB est un activateur de l'inflammation et des voies mitogéniques dans un contexte athérosclérotique, son activation apparaît alors comme un événement essentiel au développement de l'athérosclérose (He et al., 2015).

L'activation des RTK est très spécifique et bien documentée. La liaison du ligand entraîne d'abord un changement conformationnel de la partie extracellulaire du récepteur. Il y a ensuite oligomérisation du récepteur, ce qui permet une stabilisation des interactions entre chaque domaine cytoplasmique entraînant une augmentation de l'activité tyrosine kinase. Dans notre cas, chaque portion du dimère de PDGF va se lier à une molécule de PDGFR, ce qui amène donc à une dimérisation du récepteur. Il peut s'agir d'une homo ou hétérodimérisation. Cependant, le PDGFR peut aussi hétérodimériser avec d'autres récepteurs tyrosine kinase, comme l'EGFR. La dimérisation est l'étape clé menant à l'autophosphorylation du récepteur au niveau intracellulaire (Chen, Chen et He, 2013; Heldin, Ostman et Ronnstrand, 1998). Cet événement est responsable de l'activation des récepteurs, et l'autophosphorylation des résidus Tyrosine 857 permet l'interaction de ceux-ci avec leurs adaptateurs et/ou leurs effecteurs grâce à des domaines SH2 (Kazlauskas, Durden et Cooper, 1991). Toutes ces étapes engendreront différentes cascades de signalisation (Kazlauskas, 2017).

Le PDGF a été identifié comme étant un promoteur de la prolifération des CMLV, mais aussi des fibroblastes (Ross, Glomset, Kariya et Harker, 1974). Le PDGF est un facteur de croissance essentiel au développement, et le stimulus le plus pertinent lorsqu'il s'agit de migration et de prolifération des CMLV. Sa présence excessive est connue pour être impliquée dans de nombreuses pathologies (Alvarez, Kantarjian et Cortes, 2006; Andrae, Gallini et Betsholtz, 2008). Son récepteur apparaît alors comme une cible potentielle dans le traitement de l'athérosclérose. Il existe des anticorps neutralisants spécifiques au PDGF ou encore des inhibiteurs des tyrosines kinases (imatinib) qui ont montré diminué la migration et la prolifération des CMLV dans un contexte d'athérosclérose (Ricci et Ferri, 2015).

I.4.2 Les différentes voies de signalisation activées par le PDGF

I.4.2.1 La voie PI3K/AKT

L'activation de la voie de signalisation du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K) et AKT est bien documentée. Dans un premier temps, l'activation du récepteur va amener sa liaison au domaine SH2 de la sous-unité régulatrice de la PI3K, soit via les tyrosines phosphorylées, soit via des molécules adaptatrices comme Ras ou IRS (Figure 6). Cet événement permet l'activation de la PI3K qui peut aussi être inhibée par PTEN, qui apparaît alors comme un régulateur du cycle cellulaire dont l'expression peut être diminuée dans des conditions tumorales (Worby et Dixon, 2014). PI3K va aller phosphoryler, au niveau de la membrane plasmique, le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) qui est alors converti en phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate (PIP3). PI3K peut être inhibée par PTEN, qui apparaît alors comme un régulateur du cycle cellulaire dont l'expression peut être diminuée dans des conditions tumorales. PKB/AKT est alors recrutée à la membrane et phosphorylée par la 3-phosphoinositol-dépendent kinase 1 (PDK1) menant à son activation. Lorsqu'AKT est activée, celle-ci est impliquée dans de nombreux événements cellulaires, comme la survie cellulaire, ou l'activation du cycle cellulaire (Hemmings et Restuccia). Cette voie de signalisation est alors une cible bien connue pour les maladies cardiovasculaires. En effet, elle module les mécanismes biologiques essentiels au développement de ce genre de pathologie. (Eisenreich et Rauch, 2011)

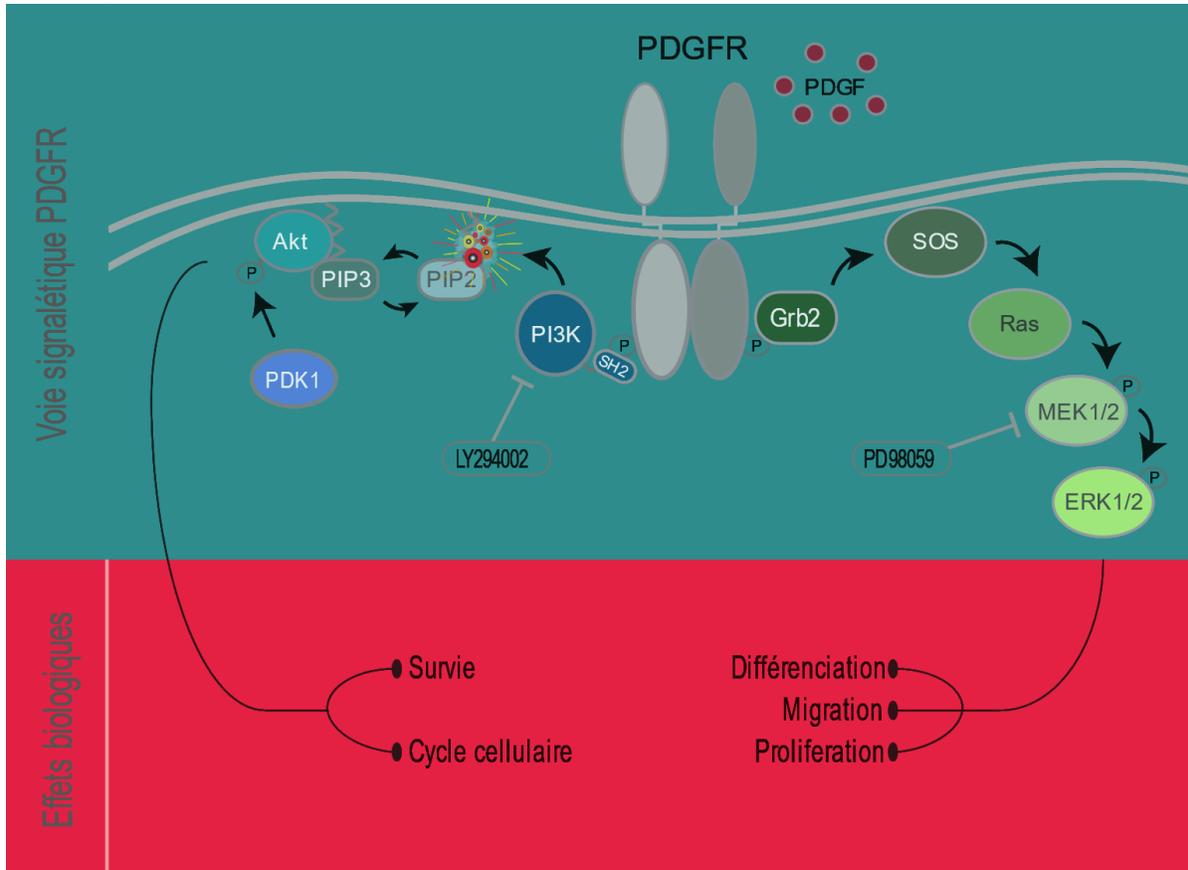
Il existe différents inhibiteurs de PI3K, dont les deux plus connus : la Wortmannin et le LY294002. Le premier est sujet à de nombreuses interactions médicamenteuses et sa spécificité n'est donc pas optimale. Le LY294002, quant à lui, est moins efficace et réversible, mais il est plus stable chimiquement. Ce sera donc celui-ci qui sera utilisé dans les différents essais (McNamara et Degtrev, 2011).

I.4.2.2 La voie Ras/MAPK (ERK1/2)

L'activation de la voie Ras/MAPK, par la voie des RTK, se produit en différentes étapes. Tout d'abord, la phosphorylation du récepteur, à la suite de sa dimérisation, amène au recrutement d'une molécule adaptatrice, Grb2, au niveau de ses sites tyrosines phosphorylées. Cette

molécule adaptatrice est quant à elle l'origine du recrutement du facteur d'échange de guanosine (GEF) SOS (*Son of Sevenless*). Cette GEF va réguler le changement de nucléotide pour la petite protéine G, Ras et donc permettre son activation. L'activation de Ras déclenche une cascade de phosphorylation qui passe par différentes étapes. Tout d'abord, c'est Raf qui est phosphorylée et qui à son tour phosphoryle MEK1/2 qui phosphoryle ERK1/2 (McCain, 2013). Ces dernières, lorsqu'elles sont actives, sont transloquées au noyau et vont permettre la transcription de différents gènes d'intérêt (Figure 6). La voie Ras/MAPK est une voie de signalisation qui est impliquée dans de nombreux processus biologiques comme la prolifération cellulaire, la migration, mais aussi la différenciation (Katz, Amit et Yarden, 2007). De la même façon que la voie PI3K/AKT, la voie des MAPK serait une bonne cible thérapeutique pour l'athérosclérose car elle est impliquée dans tous les mécanismes des CMLV qui promeuvent le développement de l'athérome, et l'activation de cette voie serait exponentielle dans un contexte athérosclérosclérotique (Hu, Dietrich, Metzler, Wick et Xu, 2000). Par exemple, l'utilisation de la Bilirubine, un inhibiteur naturel des MAPK, a montré réduire la prolifération des CMLV (Ollinger et al., 2005).

Le PD098059 est un inhibiteur spécifique de l'activation des MEK1/2, qui permet l'inhibition des voies mitogéniques (Alessi, Cuenda, Cohen, Dudley et Saltiel, 1995).



6. Signalisation du PDGFR à la suite d'une stimulation au PDGF-BB

La stimulation avec du PDGF-BB induit la phosphorylation et la dimérisation du récepteur. Celui-ci, lorsqu'il est phosphorylé, peut aller recruter différents effecteurs grâce à l'exposition de ses tyrosines. Il peut donc établir un lien avec la sous-unité SH2 de la PI3K et activer la voie de signalisation liée à celle-ci. Cette voie peut être inhibée par le LY294002. De la même façon, le recrutement de la molécule adaptatrice Grb2 aux sites de tyrosines phosphorylées permet l'activation de la petite protéine G Ras qui mène à l'activation des MAPK. Le PD98059 est à l'origine de l'inhibition de cette voie de signalisation.

I.4.3 L'impact du PDGF sur les CMLV

À la suite d'une blessure vasculaire qui mène à la reconstruction vasculaire, de nombreux facteurs de croissance vont être libérés localement. Le PDGF est un des facteurs les mieux caractérisés. Il agit en tant que chémoattractant dans la migration cellulaire (Willis, Pierre-Paul, Sumpio et Gahtan, 2004). Le PDGF est en grande partie responsable de la stimulation de la prolifération cellulaire des CMLV (Ross et al., 1974). Cependant ce facteur agit aussi de la même façon qu'un facteur pro-inflammatoire. En effet, il permet le recrutement des monocytes et peut être sécrété au cours du développement de l'athérosclérose par les cellules spumeuses ou encore les macrophages (Huo et Ley, 2004). Le facteur de croissance est connu pour sa capacité à induire le changement phénotypique des CMLV (Kaplan-Albuquerque, Garat, Desseva, Jones et Nemenoff, 2003) qui est impliqué dans le développement de l'athérosclérose. En effet, le PDGF est responsable d'une prolifération accrue des CMLV, et ce par l'activation de la voie Ras/MAPK discutée dans la section précédente. Cependant, cette voie de signalisation est désormais connue pour être aussi impliquée dans la migration cellulaire (Ronnstrand et Heldin, 2001). La stimulation de la migration cellulaire des CMLV par le PDGF au site de blessure est médiée par le PDGFRB. L'expression de ce récepteur semble être présente à la hausse dans les CMLV qui ont la capacité de migrer. De plus, la voie PI3K/AKT joue un rôle dans la migration cellulaire induite par le PDGF (Heuchel et al., 1999). Ces deux voies de signalisation activées par le PDGF sont alors impliquées dans la prolifération, mais aussi la migration des CMLV. Ce facteur de croissance est aussi reconnu pour être impliqué dans la formation de structures permettant l'invasion comme les podosomes (Quintavalle et al., 2010). L'induction d'un stress mécanique chez les CMLV peut entraîner la sécrétion de MMP-2 et l'activation de la voie PI3K/AKT via le PDGFRB (Seo et al., 2013). La stimulation des CMLV au PDGF-BB est alors à l'origine d'une production des MMP impliquées dans la dégradation de la MEC et donc dans l'invasion cellulaire.

De plus, le PDGF médie l'autophagie chez les CMLV, il est, en effet, responsable de l'augmentation de celle-ci. Comme discuté plus haut, ceci peut avoir un impact sur la stabilité de la plaque, mais aussi un impact sur le phénotype des CMLV en tant que tel, car l'autophagie va permettre le changement phénotypique vers un phénotype synthétique. Dans un stade précoce

de l'athérosclérose, cela va permettre l'augmentation de la migration cellulaire au site de la blessure, mais à un stade plus avancé cela va entraîner une déstabilisation de l'athérome (Salabei et al., 2013).

Ce facteur de croissance joue alors un rôle essentiel dans le développement de l'athérosclérose en particulier chez les CMLV. Il est à l'origine de toutes les caractéristiques qui les rendent pathologiques, la prolifération et migration accrue, ainsi qu'une capacité à envahir la media. Cependant, il n'est pas le seul impliqué dans ce genre de phénomène. Dans la prochaine section, nous allons mettre l'emphase sur un autre médiateur des phénomènes de prolifération et migration cellulaire : l'angiotensine II.

I.5 L'Angiotensine II et les récepteurs couplés aux protéines G.

L'angiotensine II (Ang II) est une hormone qui fait partie du système rénine-angiotensine-aldostérone. Cette cascade est initiée au niveau des reins avec la sécrétion de la rénine à la suite d'une baisse de pression sanguine. Celle-ci va permettre la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine I puis finalement ce peptide va être clivé par l'enzyme de conversion de l'angiotensine pour donner la forme active du peptide, l'Ang II (Atlas, 2007; Braun-Menendez, Fasciolo, Leloir et Muñoz, 1940). L'Ang II est un peptide multifonctionnel. En effet, elle a de nombreux rôles différents dans l'organisme. Elle est à l'origine de la production d'aldostérone via les glandes surrénales et joue donc un rôle sur la rétention d'eau et du sodium. Ceci permet d'augmenter le volume sanguin et donc la pression artérielle (Bader, 2010). L'Ang II est aussi responsable de la vasoconstriction, et peut s'avérer pro-inflammatoire (Benigni, Cassis et Remuzzi, 2010). L'Ang II est aussi responsable de la modulation de la migration et la prolifération cellulaire, elle est donc connue pour ses effets mitogéniques sur les CMLV et leurs impacts dans l'athérosclérose (Bourmoum, Charles et Claing, 2016; Charles, Namkung, Cotton, Laporte et Claing, 2016). Tout cela passe par l'activation de leur récepteur AT1R, un récepteur couplé aux protéines G.

I.5.1 Les Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG)

Il y a deux récepteurs qui peuvent être activés par l'Ang II, les récepteurs de type 1 ou 2 (ATR1 et ATR2). Les effets les plus caractérisés de l'Ang II sont médiés par l'AT1R qui est exprimé dans de nombreux organes. Ce récepteur fait partie de la famille des RCPG aussi appelés récepteur à sept passages transmembranaires (Mehta et Griendling, 2007). Les RCPG constituent la plus grande famille de protéines membranaires du génome humain. Structurellement parlant, ils possèdent une extrémité N-terminale extracellulaire, suivie de sept hélices alpha transmembranaires reliées par 3 boucles intracellulaires et 3 boucles extracellulaires, et pour finir un domaine C-terminal intracellulaire. Les domaines N - et C-terminaux sont les régions les moins conservées. Ce sont elles qui sont responsables de la variété de stimuli auxquels ils peuvent répondre. Les RCPG peuvent être activés par de nombreux stimuli différents et vont être responsables de l'activation d'une multitude de voies de signalisation (Pierce, Premont et Lefkowitz, 2002). Les RCPG tiennent leur nom de leur mode d'action qui de façon générale implique la liaison et l'activation d'une protéine G hétérotrimérique à la suite du changement conformationnel induit par la liaison à l'agoniste (Kobilka, 2007). Les protéines G possèdent 3 sous-unités : α , β et γ . La sous-unité α est capable de lier le GDP ou le GTP en fonction de son état d'activation. En effet, le changement de conformation du récepteur permet son action en tant que GEF (facteur d'échange de guanine), qui va échanger le GDP pour du GTP et permettre la liaison de la protéine G à différents effecteurs, et donc l'activation d'une cascade de seconds messagers à l'origine de nombreux processus cellulaires. Cette famille de récepteur est la cible de 30 à 40 % des médicaments disponibles à ce jour.

Il existe différents types de protéines $G\alpha$: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12/13}$ et $G_{\alpha i}$. Chaque type joue un rôle précis dans la cascade de signalisation ainsi que dans l'interaction avec les effecteurs. Par exemple la sous-unité $G_{\alpha s}$ est responsable de l'activation de l'adénylate cyclase, tandis que, $G_{\alpha i}$ est responsable de son inhibition (Gilman, 1984). Dans le cas de l'AT1R, sa stimulation va amener à l'activation de $G_{\alpha q/11}$ et $G_{\alpha 12/13}$ qui sont à l'origine de la cascade de signalisation impliquant la phospholipase C. Celle-ci est responsable du clivage du phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP2) en inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP3), et en diacylglycérol (DAG). L'IP3

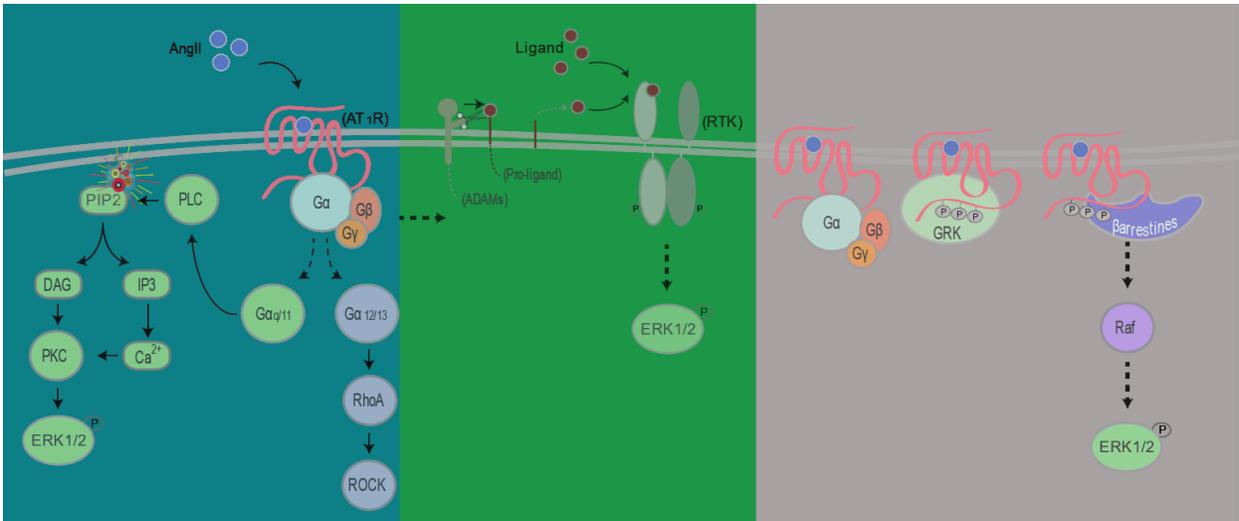
favorise l'augmentation du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire à l'origine de la vasoconstriction (Mehta et Griendling, 2007).

I.5.2 Les voies de signalisation activées par l'Ang II.

Cependant, le récepteur AT1R peut aussi activer plusieurs voies de signalisation qui sont indépendantes du recrutement des protéines G. Lors d'une activation prolongée des récepteurs, ceux-ci vont être soumis à une désensibilisation médiée par la phosphorylation du récepteur par les GRK et par la liaison des β arrestines. Cette dernière étape va donc bloquer la liaison de la protéine G et enclencher les mécanismes d'internalisation du récepteur. Mise à part ce rôle classique, les β -arrestines sont aussi capables d'activer d'autres voies de signalisation (Gurevich et Gurevich, 2006).

I.5.2.1 La voie Ras/MAPK (ERK1/2)

La voie de signalisation Ras/MAPK a été décrite plus haut (I.4.2.1). Cependant, son activation via les RCPG est quelque peu différente. En effet, cette voie mitogénique peut être activée de 3 différentes manières. Tout d'abord par l'activation des protéines G directement, que ce soit G_s ou G_i , qui activent PKA ou alors G_q via l'activation de Src (Blaukat, Barac, Cross, Offermanns et Dikic, 2000; Lefkowitz, Pierce et Luttrell, 2002). La deuxième façon dont les RCPG stimulés avec l'Ang II peuvent activer les voies mitogéniques est via la transactivation des RTK, particulièrement l'EGFR. La stimulation à l'Ang II permet l'activation de la protéine G hétérotrimérique qui va recruter différents effecteurs (Src, PKC, Ca^{2+} ...) à la membrane et donc permettre l'activation des MMPs membranaires les ADAMs. Celles-ci sont responsables du clivage d'un proligand membranaire qui va aller se lier à l'EGFR (Forrester et al., 2016; Okada, 2012). Pour finir, les β -arrestines peuvent aussi être responsables de l'activation de cette voie de signalisation. En effet, elles agissent comme des protéines d'échafaudage et vont recruter les composantes essentielles, et interagir directement avec Raf et MAPK ERK1/2 au niveau des endosomes lors du recyclage des récepteurs (Dhanasekaran, Kashef, Lee, Xu et Reddy, 2007; Luttrell et Lefkowitz, 2002; Sugden et Clerk, 1997).



7. Les voies de signalisation qui permettent l'activation des MAPK via AT1R

La stimulation des RCPG avec l'Ang II peut mener à l'activation de la voie des MAPK de trois différentes façons. 1) Le changement de conformation du récepteur va amener à l'activation de la sous-unité α de la GTPase, qui mène à l'activation de la voie des MAPK. 2) L'activation de la protéine G hétérotrimérique va être à l'origine de la transactivation des RTK via l'activation des métalloprotéines membranaires comme les ADAMs. 3) Les GRK vont permettre le recrutement des β arrestines en phosphorylant le récepteur. Les β arrestines vont agir comme des protéines échafaudages et recruter Raf afin d'activer la voie des MAPK.

I.5.2.2 La voie PI3K/AKT

La voie de signalisation PI3K peut être activée de différentes façons à la suite d'une stimulation de l'AT1R avec de l'Ang II. Tout d'abord cela peut se faire via le même mécanisme de transactivation de l'EGFR. Mais cela peut aussi se faire via le récepteur à l'insuline (IRS-1) (Law, White et Hunzicker-Dunn, 2016). La voie PI3k/AKT peut aussi résulter de l'activation de divers petites GTPases, comme les Rho- ou Ras-GTPases. (Fritsch et al., 2013) Il a aussi été montré que les β -arrestines pouvaient jouer un rôle dans l'activation de AKT dépendante de l'insuline (Povsic, Kohout et Lefkowitz, 2003).

I.5.3 Impact de l'angiotensine II sur les CMLV

AT1R est un RCPG qui peut activer de nombreux mécanismes cellulaires. Ang II présente une multitude d'effets, ce qui est dû à la grande variété de voies de signalisation qui sont activées par ce récepteur. Il est capable de déclencher des signaux passant par les protéines G ou encore

par les β -arrestines. L'Ang II joue un rôle dans le développement de l'athérosclérose, plus particulièrement en ciblant les CMLV. En condition de stimulation chronique à l'Ang II, les CMLV vont subir un changement phénotypique (Louis et Zahradka, 2010). Elles vont alors avoir une prolifération et migration accrue, mais aussi commencer à sécréter des composantes de la matrice extracellulaire. L'Ang II serait également à l'origine de la production de ROS, un facteur déterminant du développement de l'athérosclérose (Touyz, 2004). Les processus de migration et de prolifération des CMLV sont induits par une stimulation à l'Ang II via les voies de signalisation mitogéniques et de survie évoquées dans la section I.5.2. De plus, l'Ang II est susceptible de jouer un rôle lors de la formation des podosomes, en engendrant la phosphorylation de la cortactine. Cette caractéristique suggère qu'une stimulation à l'Ang II pourrait être à l'origine de la formation de structures d'invasion et donc d'invasion (Zahradka, Storie et Wright, 2009). Le peptide est aussi capable d'induire la sécrétion de MMPs actives chez les CMLV (Browatzki et al., 2005). De cette façon, il est fort probable que l'Ang II soit impliquée dans le phénomène d'invasion des CMLV dans un contexte athérosclérotique, incluant la formation des podosomes.

Dans le laboratoire, plusieurs étudiants se sont consacrés à l'étude du mode d'action de l'Ang II dans un contexte d'athérosclérose. Tout d'abord, il a été montré que l'AngII active la GTPase ARF6 qui agit comme un régulateur de la production des ROS mais aussi permet l'activation de la voie des MAPK menant à la prolifération des CMLV. Mais aussi que la modulation d'ARF6 permet le recrutement de la β arrestine. Cet événement est à l'origine de l'activation de ERK menant à la migration des CMLV (Bourmoum et al., 2016; Charles et al., 2016).

I.6 Les facteurs d'ADP-ribosylation (ARFs)

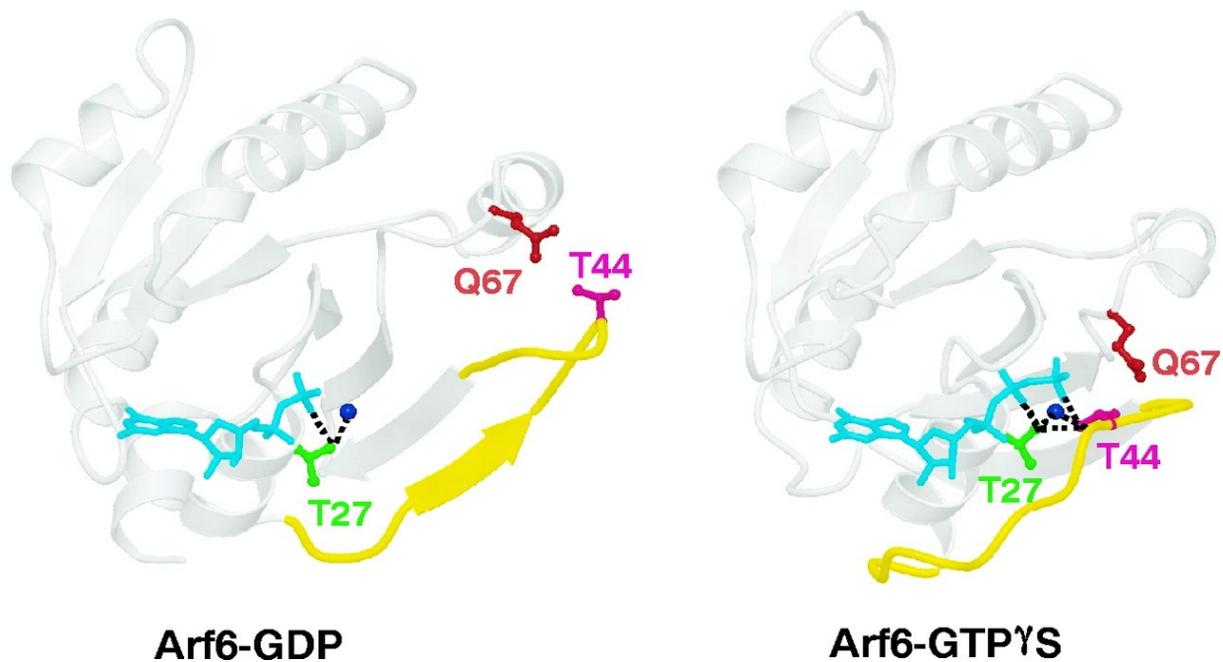
I.6.1 Classification des ARFs

Les facteurs d'ADP ribosylation (ARFs) sont une famille de petites protéines G monomériques de 20 kDa faisant partie de la superfamille des Ras. Cette famille a été découverte grâce à son lien avec la toxine du choléra. En effet, les ARFs agissent comme cofacteurs permettant l'ADP-ribosylation de la sous-unité *G α s* dans le mécanisme d'activation de l'adénylate cyclase. La toxine du choléra est connue pour stimuler cette activation de façon irréversible. Ainsi, les ARFs ont été purifiés pour la première fois dans les années 1980, avec pour seul rôle connu leur implication dans la stimulation de la toxine du choléra (Kahn et Gilman, 1984). Les ARFs sont réparties selon 3 classes en fonction de la similarité de leurs séquences. La classe I se compose de ARF1 à 3, la classe II de ARF4 et 5 et pour finir la classe III ne se compose que d'ARF6 (Kahn et al., 2006). Les membres des deux premières classes sont principalement retrouvés au niveau du Golgi (D'Souza-Schorey et Chavrier, 2006). Cependant ARF6 est l'isoforme qui se différencie le plus des autres membres de la famille que ce soit au niveau structural ou fonctionnel. En effet, ARF6 est le seul isoforme qui n'est pas présent au niveau du Golgi et qui est localisé à la membrane plasmique (Cavenagh et al., 1996).

I.6.2 Mécanisme d'activation des ARFs

ARF6 se différencie des autres isoformes par son positionnement à la membrane plasmique. Celui-ci est dû à la myristoylation de son hélice N-terminale amphipathique qui permet son ancrage à la membrane. La myristoylation est le résultat de l'action d'une enzyme : la *myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase* (NMT) au niveau d'une glycine positionnée en N-terminal (Padovani, Zeghouf, Traverso, Giglione et Cherfils, 2013). Dans le cas des autres isoformes, c'est la liaison du GTP qui permet un changement de conformation de l'hélice N-terminale afin de permettre la liaison à la membrane (Macia et al., 2004). Comme l'ensemble des petites GTPases, ARF6 possèdent un domaine G permettant la liaison de la guanosine triphosphate (GTP) ou de sa forme diphosphate (GDP). Les nucléotides sont stabilisés au sein de la poche hydrophobe par un ion magnésium. La liaison d'un nucléotide ou l'autre entraîne un changement conformationnel au niveau des deux régions switch. L'échange de la molécule de

GDP pour le GTP entraîne un rapprochement des deux régions vers la molécule de GTP, ainsi ce changement de conformation permet d'exposer des régions d'interactions avec différents effecteurs (Figure 8) (Vetter et Wittinghofer, 2001).



8. Schématisation des domaines des ARFs en fonction de leur liaison au GTP/GDP

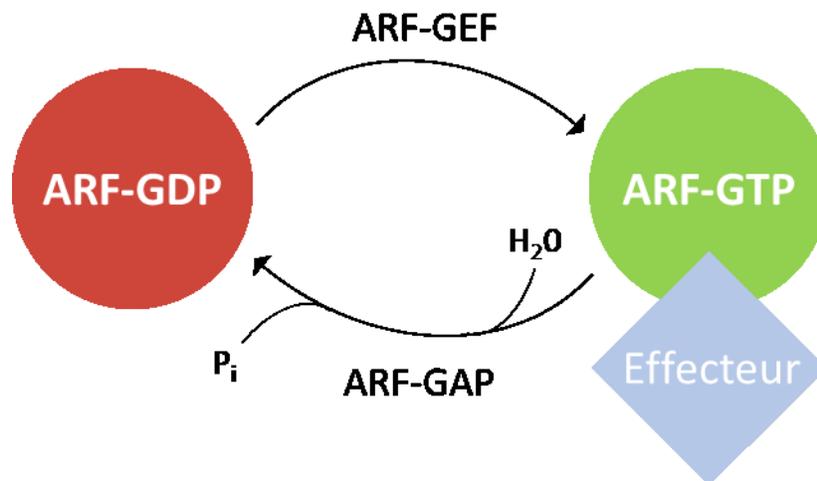
Les résidus clés permettant de stabiliser la liaison de GTP sont représentés ici. La région *switch 1* est représentée en jaune, l'ion magnésium sous la forme d'une sphère bleue et le GDP ou GTP est représentée en bleu. Dans cette représentation, on observe l'importance du résidu Thréonine 27 dans la liaison du GTP et l'importance de Thréonine 44 dans le repliement de la région *switch*. (Macia et al., 2004)

Le passage de sa forme inactive liée au GDP à sa forme active liée au GTP est régulé par les facteurs d'échange de guanine (GEFs) et les protéines régulatrices de l'activité GTPasique (GAPs). Les GEFs permettent l'activation de la GTPase en échangeant le GDP pour le GTP, permettant ainsi la liaison avec ses effecteurs grâce à une région bien spécifique qui permet l'interaction avec ceux-ci. Quant à elles, les GAPs vont permettre l'hydrolyse du GTP en GDP et donc assurer l'inactivation de l'activité de la ARF (Figure 9) (Nie, Hirsch et Randazzo, 2003). Les ARFs interagissent directement avec de nombreux effecteurs, effectivement, ces protéines

ne possèdent pas d'activité enzymatique connue, elles sont donc contraintes à établir un contact. Parmi ces effecteurs, les plus documentés sont les GGA (*Golgi-localized, γ -ear containing, ADP-ribosylation factor binding*) (Takatsu, Yoshino, Toda et Nakayama, 2002) et les petites GTPases de la famille de Rho comme Rac 1 (Boshans, Szanto, van Aelst et D'Souza-Schorey, 2000).

La régulation du cycle d'activation des ARFs passe donc par les GEFs mais aussi les GAPs. Il existe une quinzaine de ARF GEFs qui partagent toutes un domaine hautement conservé, Sec7, le domaine catalytique qui interagit avec les régions switch et permet l'échange de nucléotides (Chardin et al., 1996). Celles-ci peuvent être divisées en deux classes : les ARF GEFs à haut poids moléculaire (>200 kDa) et celles à faible poids moléculaire. Le groupe des larges GEFs se compose de la famille BIG/GBF. Celles-ci sont principalement retrouvées au niveau du Golgi et permettent l'activation des ARFs 1, 3, 4 et 5. Tandis que les petites GEFs sont plus dispersées dans la cellule. Les Cytohésines sont celles qui sont le mieux caractérisées. Elles sont localisées à la membrane et privilégient les interactions avec ARF1 et ARF6 (Donaldson et Jackson, 2011).

Il existe 31 ARF GAPs qui agissent via leur domaine GAP en liant le domaine G de la petite GTPase. L'hydrolyse du GTP a lieu grâce à une arginine présente au sein de ce domaine ceci permet alors de revenir à l'état inactif de la ARF sous sa forme GDP. Il en existe plusieurs sous-familles : ARFGAP1, ARFGAP2/3, ADAP, SMAP, AGFG, GIT, ASAP, ACAP, AGAP et ARAP (Donaldson et Jackson, 2011). Une des caractéristiques fondamentales des GAPs est leur capacité d'interaction avec les lipides membranaires. Cependant le rôle inactivateur de la fonction GTPasique des ARF GAPs n'est pas leur seul rôle. En effet, celles-ci peuvent aussi être impliquées dans la transduction de signal dans la cellule via leur interaction avec de nombreuses molécules de signalisation (Randazzo et Hirsch, 2004). Par exemple, ASAP peut interagir avec Src et FAK au niveau des points d'adhésion focaux et est impliquée dans la formation de podosomes (Bharti et al., 2007). Ou encore, GIT1 peut se lier à PIX qui est une GEF de Rac mais aussi CDC42 qui sont elles aussi impliquées dans la régulation des podosomes (Premont et al., 2004).



9. Cycle d'activation des AR6

L'activation des ARFs implique une GEF et une GAP. La GEF permet l'échange de la molécule de GDP pour une molécule de GTP, permettant alors à la ARF d'être sous sa forme active. La GAP quant à elle permet de désactiver la ARF en hydrolysant le troisième groupe phosphate du GTP, afin de revenir à l'état ARF-GDP inactif.

I.6.3 Inhibiteurs des ARFs

Différentes molécules sont capables de cibler le processus d'activation des ARFs. Dans la majorité des cas, ces molécules inhibent les capacités de facteur d'échange des ARF GEFs. La brefeldine A (BFA) est un antibiotique qui est connu pour interagir directement au niveau de leur domaine Sec7 et donc bloquer la liaison de la GBF1 avec ARF1 principalement (Helms et Rothman, 1992). Cet inhibiteur a donc comme effet d'inhiber le transport antérograde en favorisant le transport rétrograde, et éventuellement résulte en la dégradation du Golgi (Fujiwara, Oda, Yokota, Takatsuki et Ikehara, 1988). Cependant, la BFA ne cible que les ARF GEFs à haut poids moléculaire, il en existe donc d'autres qui sont capables de cibler les petites GEFs. La LM11, par exemple, cible les cytohésines spécifiquement responsables de l'activation des ARF1 et 5. Quant à SecinH3, il est un puissant inhibiteur de l'activation de ARF1 et ARF6

passant par la cytohésine 1, qui peut s'avérer responsable de la résistance à l'insuline (Hafner et al., 2006).

I.6.4 Rôle des ARFs

Les ARFs jouent un rôle essentiel dans l'organisation cellulaire. Plus particulièrement ARF1 et ARF6 sont les plus étudiées. Un des rôles attribués aux ARFs est la régulation de la composition des lipides membranaires en participant à l'activation de la phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5K) et PLD. PIP5K lorsqu'elle est active permet de générer PtdIns (4,5) P₂ (PIP2) qui est impliqué dans le remodelage du cytosquelette d'actine et le trafic à la membrane plasmique (Aikawa et Martin, 2003). L'interaction avec la PLD permet son activation qui est à l'origine de l'ondulation des membranes impliquée dans la formation des vésicules (Donaldson, 2003; Honda et al., 1999). Les ARFs sont aussi importantes dans la régulation du trafic intracellulaire. En effet, celles-ci régulent la formation des protéines de revêtement des vésicules comme coat protein I (COPI) qui est responsable du transport rétrograde du Golgi vers le réticulum endoplasmique en particulier ARF1 alors que COPII est responsable du transport antérograde du réticulum endoplasmique vers le Golgi (Donaldson et Klausner, 1994; Lee, Miller, Goldberg, Orci et Schekman, 2004). ARF6 est impliquée dans le recrutement de AP-2 à la membrane plasmique. AP-2 est une protéine qui participe à la formation des vésicules recouvertes de clathrine mais aussi à la sélection de molécules cargo. Ainsi, les ARFs, à la suite à leur activation, ont la capacité de moduler l'assemblage des différentes sortes de vésicules (Paleotti et al., 2005). De plus, ARF6 semble être impliquée dans l'endocytose et le recyclage des RCPG. En effet, il a été démontré que la déplétion d'ARF6 empêche l'internalisation du récepteur β 2-adrénergique mais aussi du AT1R (Claing et al., 2001; Houndolo, Boulay et Claing, 2005).

Le rôle de ARF1 dans la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire a été mis en avant dans le cancer du sein dans notre laboratoire (Schlienger, Campbell et Claing, 2014). ARF6 quant à elle, joue un rôle dans la migration des CMLV. L'activation de la petite GTPase est régulée par les voies dépendantes de la β -arrestine qui sont capables d'activer les voies mitogéniques au niveau des endosomes. Dans cette étude, l'inhibition d'ARF6 a permis d'observer la diminution de la migration induite par l'Ang II dans les CMLV mais aussi une

réduction de l'expression de protéines contractiles assimilées au phénotype synthétique (Charles, Bourmoum et Claing, 2018). De plus, dans notre laboratoire, il a aussi été démontré que l'inhibition d'ARF6 pouvait bloquer la production de ROS et la prolifération cellulaire (Bourmoum et al., 2016; Charles et al., 2016). Les ARFs possèdent donc un rôle essentiel dans de nombreux mécanismes cellulaires qui peuvent s'avérer pathologiques. Il est donc important de comprendre quel impact les ARFs peuvent avoir dans le développement de l'athérosclérose et si elles pouvaient jouer un rôle dans l'invasion des CMLV.

I.7 Objectifs et hypothèse de travail

Les CMLV jouent un rôle important dans le développement de l'athérosclérose. En effet, à la suite d'un changement phénotypique, celles-ci présentent une prolifération et une migration cellulaire accrue.

Au sein du laboratoire, l'implication d'ARF6 dans ces mécanismes pathologiques a été démontrée. Cet isoforme a d'abord été caractérisé pour son rôle dans l'internalisation des récepteurs de l'Ang II, puis plus tard pour son statut de modulateur du changement phénotypique, de la prolifération et la migration cellulaire. Toutes ces observations ont été réalisées à la suite d'une stimulation à l'Ang II dans des CMLV de rats.

Au cours de ce projet de recherche, nous nous sommes concentrés sur la migration anormale des CMLV qui joue un rôle crucial dans la formation de la néo-intima et le développement de l'athérosclérose, chez l'humain. Différents facteurs tels que l'Ang II et le PDGF stimulent la motilité des cellules, cependant ce processus seul n'est pas suffisant pour que les CMLV puissent migrer à travers le tissu environnant. Les CMLV peuvent alors présenter des capacités d'invasion cellulaire.

A la lumière de ces observations, nous avons énoncé l'hypothèse que la GTPase ARF6 est une protéine nécessaire qui engendre une cascade de signalisation menant au remodelage du cytosquelette d'actine, la formation de structures importantes pour l'invasion et l'activation des MMP dans les CMLV humaines.

Pour mener à bien ce projet, il a été important de reproduire les expériences réalisées avec des cellules provenant d'aortes de rats dans les cellules d'origine humaine. Dans ce contexte, nous souhaitons déterminer s'il existe un lien entre la stimulation à l'Ang II ou au PDGF et l'activation de la GTPase ARF6. En deuxième lieu, nous proposons d'examiner plus spécifiquement l'invasion des CMLV à la suite d'une stimulation avec ces deux agonistes après une déplétion de notre GTPase d'intérêt. L'objectif est de définir le rôle de ARF6 dans la dégradation de la matrice extracellulaire dans un contexte d'invasion, mais aussi le mécanisme moléculaire impliqué dans ces phénomènes.

Chapitre II : Role of ADP-ribosylation factor 6 in VSMC invasion

Emilie Fiola-Masson^{1#}, Julie Artigalas^{1#}, Audrey Claing¹

¹Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3T 1J4, Canada

These authors contributed equally to the work. EFM and JA participated in designing, performing and analyzing the experiences as well as writing the paper's draft.

*Corresponding author

E-mail : audrey.claing@umontreal.ca

II.1 ABSTRACT

Circulating and locally released hormones and growth factors stimulate the invasion of vascular smooth muscle cells (VSMC) to the tunica intima during the progression of atherosclerosis. We have shown that the GTPase ADP-ribosylation factor 6 (ARF6) is an important regulator of migration and proliferation of various cell types, but whether this small G protein can be activated by a variety of stimuli to actually regulate the invasive capacities of VSMC remains unknown. Here, we aimed to first define whether Angiotensin II (Ang II), a potent vasoactive peptide, and Platelet-derived growth factor (PDGF), a mitogenic stimulant of vascular tissues, can result in the activation of ARF6 in a human model of aortic VSMC. We found that indeed these two stimuli that respectively activate G protein-coupled receptors (GPCR) and receptor tyrosine kinases (RTK) can promote loading of GTP on this ARF isoform. Knockdown of ARF6 reduced the ability of both Ang II and PDGF to promote invasion suggesting that this GTPase regulate key molecular mechanisms mediating degradation of the extracellular matrix (ECM). We found that when cells were stimulated with PDGF, but not Ang II, ARF6 regulated the activation of both the MAPK/ERK1/2 and PI3K/AKT pathways essential for invasion. Altogether, our findings demonstrate that the GTPase ARF6 acts as a molecular switch to regulate specific signaling pathways that coordinate the process of invasion.

II.2 INTRODUCTION

Vascular smooth muscle cells (VSMCs) play key roles in regulating blood vessel tone and reactivity to stimuli, but also in the development of vascular diseases such as atherosclerosis. This is mainly possible because VSMCs have the ability to undergo modulation of their phenotype and phenotypic behavior. In their normal differentiated state, they are quiescent and express a complement of contractile proteins to assure their basic function. Following injury to the vessel, they dedifferentiate into a synthetic phenotype that is characterized by the loss of contractile capacity, but most importantly, they gain the ability to migrate and proliferate. When migrating and proliferating cells fail to switch back to the contractile phenotype after tissue reparation, due to the presence of excessive mitogens in the extracellular environment, these features are associated with the early onset of pathogenic vascular remodeling.

When VSMC form subcellular structures to promote degradation of the extracellular matrix (ECM), then cell motility is referred to as invasion instead of migration. Cells that invade their surroundings form membrane rich protrusions, invadopodia or podosome, on their ventral side. These actin rich structures contain metalloproteinases, providing enzymatic activity to degrade matrix proteins. VSMC were shown to form podosomes, which are smaller in size and exhibit slower turnover rate than invadopodia most often found in cancer cells. Podosomes were first identified in a mouse SMC line (1,2) and shown to contain components such as cortactin, the Arp2/3 complex, and vinculin (2,3). In VSMC, formation of podosomes was shown to be stimulated by the Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), a well-known mitogen that act through the activation of its tyrosine kinase receptor (PDGFR) (4). Excessive activity of PDGF has been associated with several human disorders including atherosclerosis and restenosis (5,6). The use of neutralizing antibodies against PDGF reduced VSMC invasion by about 80% in a rabbit model of atherogenesis (7), while transgenic overexpression of this mitogen, in a porcine model, induced by 8-fold intimal hyperplasia (8). Angiotensin II (Ang II), an agonist of the G protein-coupled type 1 Ang II receptor (AT1R) and a potent vasoconstrictor, can also promote podosome formation and VSMC invasion in porcine (9) and rat (10) cells upon sustained exposure. Ang II stimulation of VSMC is associated with the development and maintenance of neointima formation and restenosis.

Most studies describing the proteins and signaling pathways responsible for cell migration, invasion and proliferation have been performed using rodent isolated VSMC. We have shown that VSMC from rat aortic origin, when in the presence of Ang II, activate the small GTPase ARF6, to remodel the actin cytoskeleton and induce cell migration (11). Ang II also increases cellular proliferation, a response we showed was regulated by ARF6 (12). ARF (ADP-ribosylation factor) proteins are monomeric GTP-binding molecules that act as molecular switches to promote down-stream cellular signaling events. This family of GTPases comprises six isoforms (ARF1 to ARF6) that have specific localization and function in cells. However, ARF1 and ARF6 are the best characterized. In cells, ARF are key regulators of vesicle formation, membrane lipid transformation and actin remodeling. In VSMC, ARF6 controls ROS formation via the activation of Rac1, NADPH oxidase, and the MAPK pathway. In cancer cells, the isoforms ARF1 and ARF6 control invasion by regulating invadopodia maturation and microvesicle formation. ARF modulate the activity of the metalloprotease MMP-9 via a mechanism involving the coordination of Rho activation (13).

In this study, we aimed at defining whether ARF6 controlled the invasive capacities of human VSMC and define the mechanism by which it does. The study of cell responses to stimuli such as the PDGF and Ang II may vary between strains and species for various reasons, namely, because of the complement of proteins they express. For example, rat VSMC express type I arginase while in human VSMC, arginase II is the main isoform with a consequence on VSMC proliferation and collagen deposition (14). Furthermore, proliferation of bovine aortic VSMC can be stimulated by endothelial cells, while it is inhibited when examining human VSMC (15). Although animal models are extremely useful, these reported discrepancies further justify the study of human VSMC if one wants to delineate the underlying mechanisms regulating the development of pathologies in patients. Our data show for the first time that PDGF and Ang II promote the activation of ARF6 in human VSMC and that this GTPase is necessary for invasive capacity of the cells. In this context, ARF6 regulates both activation of the MAPK and PI-3K pathways by PDGF and these are key pathways for human VSMC invasion.

II.3 EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and Antibodies

BD Matrigel Matrix was purchased from BD Science (Bedford, MA). Alexa Fluor 568-phalloidin, DQ-Gelatin and puromycin were purchased from Invitrogen (Burlington, ON). Protein G PLUS-agarose beads, antibodies against ARF6 (3A-1), ERK and GAPDH were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-phospho-ERK1/2, anti-AKT and anti-phospho-AKT were purchased from Cell Signaling (Danvers, MA). PDGF-BB was obtained from Fitzgerald Industries Int'l (Acton, MA). SecinH3 was purchased from Abcam Biochemicals (Cambridge, MA). LY294002 was purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). All others products were obtained from Sigma Aldrich (Oakville, ON).

Cell culture and shRNA lentivirus infection

Human Aortic Smooth Muscle Cells were obtained from ScienCell Research Laboratories, cultured in smooth muscle cell medium (ScienCell) according to the manufacturer's instructions and maintained in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C. All experiments were performed between passages 4 to 8. VSMC were infected in the presence of polybrene (8 µg/ml) with control or ARF6 shRNA lentiviruses. Stable clones were selected using puromycin (5 µg/ml) and cells were used for experiments 72 h post-infection.

Cell invasion assay

For all experiments with scrambled or ARF6 shRNA, 100 000 VSMC were serum-starved 72 h after infection and seeded into Boyden chambers (24-well inserts with 8-µm pore coated with Matrigel). One hour after plating, cells were stimulated with PDGF-BB (25 ng/ml) or Ang II (100 nM) in the lower chamber for 24 h. Cells were fixed and stained using crystal violet (0.1% in 20% MeOH: overnight), the membranes were washed three times with H₂O, and cells were removed from the upper chamber with cotton tipped applicators (Innovatek). Pictures of five different fields of the inferior side of the membranes were taken, and the average number of invading cells was quantified manually for each condition. For condition with inhibitors, cells

were pre-treated, vehicle (DMSO 0.1%), PD98059 (25 μ M) or LY29402 (25 μ M) for 1h before performing the experiments as described above.

GST Pulldown Assay – ARF6 activation assay

VSMC were serum-starved and stimulated for the indicated times with PDGF-BB and Ang II. Cells were lysed in lysis buffer E (pH 7.4, 50 mm Tris-HCl, 1% Nonidet P-40, 137 mm NaCl, 10% glycerol, 5 mm MgCl₂, 20 mm NaF, 1 mm NaPPi, 1 mm Na₃VO₄, and protease inhibitors). Samples were spun for 10 min at 10,000 \times g at 4°C. GST-GGA3 fusion protein coupled to glutathione-Sepharose 4B beads (16) was added to each tube, and samples were rotated at 4°C for 1 h. Beads were washed, and proteins were eluted into 20 μ l of SDS-sample buffer containing 5% β -mercaptoethanol by heating to 65°C for 15 min and resolved on 14% SDS-PAGE. Western blot analysis was done using a specific anti-ARF6 antibody.

Western blotting

Cells were harvested, and total soluble proteins were run on polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blotted for relevant proteins using specific primary antibodies (as described for each experiment). Secondary antibodies were HRP-conjugated and the chemiluminescence reaction was triggered using the Amersham ECL Prime Western detection reagent. Membranes were exposed to autoradiography films, which were scanned using a Canon scanner. Quantification of the digital images obtained was performed using GelQuant (version 1.8.2).

shRNA

Plasmids were purchased from the MISSION® shRNA Library, Sigma Aldrich (ARF6: TRCN0000380270, ARF1: TRCN0000039876, ctl: SHC016). Lentiviruses containing the shRNA were generated using HEK293T cells transfected with the shRNA plasmid and the psPax.2 and pMD2.G packaging plasmids using a calcium phosphate mix (HBS 2X: 50 mM HEPES, pH 7.1, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄, mixed with 2.5 mM CaCl₂).

Matrix degradation assay

Previously sterilized in ethanol 70%, coverslips were coated with DQ-gelatin solution (50 µg/ml DQ-gelatin, 2% bovine gelatin, 2% D-sucrose in PBS) for 90 min, at room temperature and in the dark. Coverslips were rinsed in PBS and left in media without serum. Cells were then added to cover slips and incubated for 1h before stimulation with PDGF-BB or Ang II. Six hours post-stimulation, cells were fixed with a 4% paraformaldehyde solution, for 10 min at room temperature, and then permeabilized with 0.5% Triton X-100 solution for 10 min. After BSA blocking, they were labeled with Alexa-Fluor 568 phalloidin. Coverslips were mounted on slides with Aqua-Mount and observed using a confocal microscopy.

Statistical analysis

Statistical analysis were conducted with GraphPad Prism software version 7.0 (GraphPad PRISM, San Diego, CA) using the Student's *t*-test, a one-way analysis of variance with post hoc Tukey corrections or a two-way analysis. A P value <0.05 was statistically significant.

II.4 RESULTS

PDGF-BB and Ang II Stimulation Promote ARF6 Activation in Human Aortic VSMC

To investigate whether stimuli such as PDGF and Ang II lead to the activation of ARF6 in human aortic VSMC, we performed pull down assays using GST-GGA3. As illustrated in Figure 1A, PDGF-BB treatment resulted in a rapid and transient increase of ARF6-GTP levels, which were maximal after 2 min of stimulation and returned to basal levels 15 min post-treatment. Ang II stimulation, likewise, mediated a rapid and transient increase of active ARF6, with the maximal peak of activation at 2 min (Fig. 1B). These data demonstrate that this ARF isoform can be activated in VSMC of human origin by either agonist.

ARF6 mediates cellular invasion following stimulation

To explore the importance of ARF6 in the invasive response of these cells, we knocked down expression of this ARF isoform by shRNA and performed two complementary types of experiments. First, we used the classical transwell migration assay through Matrigel. This matrix is composed of type IV collagen and laminin and is used to mimic basement membrane. As demonstrated in Figure 2, a 24h stimulation with PDGF-BB induced invasion of human aortic VSMC by 2-fold over basal. This response was mainly dependent upon ARF6 since depletion of the GTPase led to inhibition of the basal as well as agonist-mediated responses. Indeed, ARF6 knockdown reduced PDGF-BB-induced invasion by 59%. Treatment of cells with Ang II had similar effects (Fig. 3A). At the dose used, Ang II stimulation also promoted invasion by 1-fold over basal in control cells. Depletion of ARF6 greater than 80% reduced the agonist-induced invasive responses by 82%, as well as the basal invasive capacities of these cells.

We next examined the ability of PDGF-BB and Ang II to promote invasion using a gelatin degradation assay. Plated onto a DQ-gelatin support, control and ARF6 depleted human VSMC were treated with either agonists. In order to observe invasive structure formation, cells were stimulated for 6h and the visualization of gelatin degradation was examined by assessing the liberation of sequestered fluorochrome from the gelatin. Cell stimulation with PDGF enhanced the invasive capacities of the cells by 50% (Fig. 2B). In turn, depletion of this ARF isoform

decreased invasion promoted by this growth factor by 49%. As illustrated in Figure 3B, Ang II treatment also promoted gelatin degradation, although to a lesser extent. As expected, ARF6 knockdown reduced invasion induced by Ang II by 43%.

Altogether, these findings suggest that PDGF-BB and Ang II-promoted invasion of human aortic VSMC is dependent upon the expression and/or activation of ARF6.

PDGF-BB mediates cell invasion via MAPK and AKT pathways in Human Aortic VSMC

Subsequently, we aimed to identify the different pathways that could be involved in the ARF6-dependent invasion process of human VSMC. In previous studies, PDGF-BB has been shown to activate mitogenic cascades. Stimulation of VSMC by this growth factor led to the rapid and sustained phosphorylation of ERK1/2 and AKT in control conditions. When we knocked down expression of this ARF isoform and stimulated the cells with PDGF-BB, we observed a 60% reduction of ERK1/2 phosphorylation and a 62% reduction of AKT phosphorylation (Figure 4A). These findings demonstrate that in human VSMC, activation of the MAPK and AKT pathways required ARF6. Next, we aimed at confirming that indeed ERK1/2 and AKT activation were important for cell invasion. As illustrated in Figure 4B, pre-treatment of the cells with the MEK inhibitor PD98059 reduced PDGF-BB-induced invasion by 46%. Alternatively, treatment of the cells with the PI3K inhibitor LY294002 blocked human VSMC invasion by 51% ($p=0.06$) (Fig. 4C). These findings demonstrate that both MAPK and AKT pathways are key signaling cascade mediating invasion of human VSMC induced by PDGF-BB and that ARF6 is an upstream regulator of the signaling events.

Activation of the MAPK pathway is important for Ang II-mediated invasion of human VSMC, but this process is independent of ARF6

In the same way, we tried to identify invasion pathways that could be activated by a GPCR agonist. In our previous studies, we have shown that Ang II can activate the MAPK pathway in rat VSMC. Here, we first examined whether this mitogenic pathway could be modulated in our human cell model and alternatively examined its role in invasion. As illustrated in Figure 5A, Ang II stimulation led to the phosphorylation of ERK1/2 as well as AKT. However, depletion of ARF6 did not impact the ability of this peptide to promote activation of these signaling

intermediates. These results therefore suggest that ARF6 is not a key regulator of MAPK and AKT pathways in human VSMC. We went on to define whether these events were important for invasion and observed that treatment of cells with PD98059 significantly reduced the capacity of Ang II to promote invasion (Fig. 5B). In contrast, treatment of the cells with LY294002 did not have any effect suggesting that this pathway is not key in this cell model (Fig. 5C).

Altogether, these findings suggest that ARF6 does not regulate the ability of Ang II to promote activation of ERK and AKT. Rather, some alternative pathways are used to activate this MAPK essential for invasion.

II.5 DISCUSSION

In recent years, the role of ARF proteins in controlling key physiological responses, such as migration, proliferation and invasion has been shown. Although, these results were obtained in murine models or cancerous cells.(11,17,18) The findings presented here demonstrate that ARF6 is a key player in human VSMC invasiveness and provide a mechanism by which this small GTPase controls this process. We have confirmed that ARF6 can be activate in human VSMC as it was in rats aortic VSMC (19). Indeed, a stimulation with an RTK or a GPCR agonist can lead to the activation of the GTPase. Here, PDGF has been used to show that a growth factor can engage cellular response through activation of ARF6. Futhermore, Ang II was shown to activate this ARF isoform via its GPCR. These observations are consistent with the ability of these agonists to induce the phenotypic switching of VSMC (20,21).

Using an ARF6 shRNA, we showed that ARF knockdown reduced the capacity to invade of the human VSMC. The use of two kinds of experiments allows to show two aspects of cellular invasion: the movement and the degradation of the matrix. Indeed, in previous studies, ARF1 was shown to be a key regulator in breast cancer cell invasiveness, ARF6 seems to have a similar role in VSMC. First, these results suggest that in control condition, stimulation with PDGF or Ang II is responsible of acute invasion, which is consistent with the ability of these agonists to induce the phenotypic switch of VSMC. Secondly, ARF6 depletion blocked the invasion of HAVSMC through a membrane that mimic the basement membrane and impeded the degradation of gelatin. Based on these results, we show that ARF6 acts like a regulator for HAVSMC invasion. In the literature, it is known that VSMC can invade its surrounding through formation of actin structures, called podosomes, that release MMP (22). Therefore, it would be significant to use antibodies specific for these structures such as Tsk5 and cortactin or look at the activation profile of MMPs (4,23-25). These results allowed to directly asses the role of ARF protein in cell invasion induced by a growth factor or a hormone, but the mechanism remains to be defined. Our findings underscore the importance of studying such cellular response because of their involvement in pathological development such as atherosclerosis.

In addition, we aimed at defining the cellular mechanisms implicated in this phenomenon. We showed that stimulation with PDGF induces an activation of both ERK1/2 and AKT pathways.

Using ARF6 shRNA, we demonstrated that ARF-depleted human cells showed a different profile of activation following the same stimulation with PDGF. Indeed, ARF6 knockdown reduced the phosphorylation of MAPK and AKT comparatively to the basal level. These results suggest that activation of ARF6 by PDGF leads to these cellular pathways (MAPK and AKT). MAPK pathway is a mitogenic pathway that was shown to be involved in VSMC migration, and AKT is an intermediate of the survival pathway. Because of the importance of these two signalling pathways, we therefore looked at the impact of their inhibition on the PDGF-induced invasion. We observed that this cellular response is extremely modulated by a MAPK inhibitor and tends to be influenced by a PI3K inhibitor. Interestingly, these two pathways seemed to be involved in HAVSMC invasion. However, our results highlight the need to pursue our investigation to other signaling pathways that could also be involved.

With these promising results, we wanted to know if these were dependent on the type of receptor and therefore the agonist used, so we reiterate the same experiments but following a stimulation with Ang II (26,27). Interestingly, even if Ang II is responsible for the activation of MAPK and AKT in control condition, the use of ARF6 shRNA do not modulate their phosphorylation. With the same idea, the inhibition of the AKT pathways did not affect the ability of invasion of the cells. In contrast, MAPK inhibition, by a biochemical inhibitor (SecinH3), is responsible for reducing the invasion induced by Ang II. It may be interesting to document how this contradictory result is possible. Our results suggest that, in HAVSMCs, ARF6 is not implicated in the activation of MAPK and AKT following a stimulation with Ang II. Moreover, only MAPK pathways seems to play a role in Ang II-induced invasion.

Altogether, our study has contributed to elucidate the role of ARF6 in cell invasion of the human VSMCs. ARF6 can be activated through RTK or GPCR signaling and led to the activation of different signaling pathways. Upon PDGF and Ang II treatments, ARF6 controls invasion of these cells. However, it remains to be fully documented how these HAVSMC manage to degrade the matrix and via which structure. These data have brought better knowledge of the mechanisms implicated in cellular response induced by ARF6 activation, and how this ARF is a key regulator very important during pathological response. Proteins such as ARFs could thus be an interesting molecular target for new treatments of the cardiovascular disease.

II.6 LEGENDS

Legend Figure 1: ARF6 is activated in HAVSMCs through RTK or GPCR signaling pathway. Cells were serum starved 24 h before stimulation with 25 ng/mL of PDGF-BB (A) or 100 nM of Ang II (B). They were stimulated for 0, 1, 2, 5 and 15 min. Cells were lysed and ARF6 activity was assessed in a GTPase activation assay with GST-GGA3. ARF6-GTP levels were evaluated by Western blotting using specific antibodies against ARF6. Quantifications are the mean \pm SEM realised on six different experiments (A) or three different experiments (B). **P<0.01, *P<0.05. (One-Way Anova)

Legend Figure 2: ARF6 depletion modulates PDGF-BB-mediated invasion in HAVSMC. (A) 100 000 cells were infected with a scrambled or ARF6 shRNA and seeded into Matrigel-coated Boyden chambers for 1h. Afterwards cells were left untreated (non-stimulated; ns) or stimulated with PDGF-BB (25 ng/mL) for 24 h. Images are from the lower part of the membrane and are representative of five images taken per condition. Quantifications are the mean \pm SEM of five independent experiments. **P<0.01 are values compared to the indicated condition. ARF6 depletion was confirmed by Western blotting. (B). Cells were infected as in (A) and seeded onto DQ gelatin for 1 h. They were stimulated with PDGF-BB (25 ng/mL). After 6 h, cells were fixed and actin stained using Alexa Fluor 488 phalloidin. Images are representative of the degradation area of four independent experiment with 30 cells examined per condition. Quantifications are the mean \pm SEM **P<0.01, *P<0.05. for the indicated condition. (Two-Way Anova)

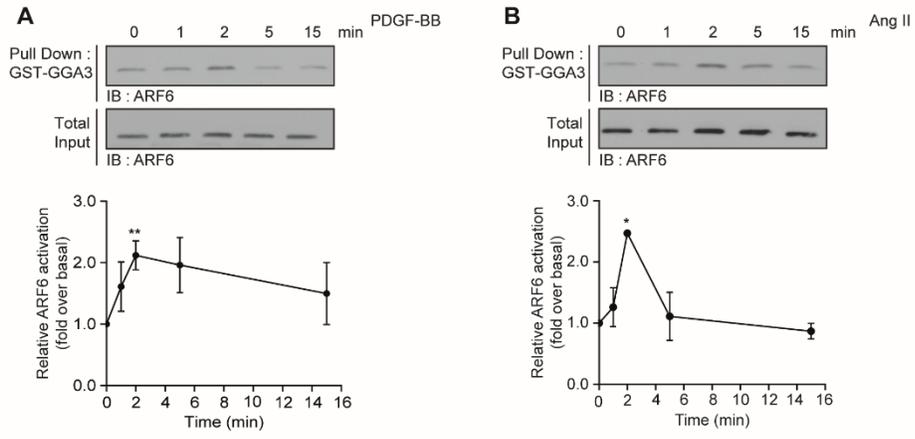
Legend Figure 3: ARF6 depletion modulates Ang II-mediated invasion in HAVSMC. (A) 100 000 cells were infected with a scrambled or ARF6 shRNA and seeded into Matrigel-coated Boyden chambers for 1 h. Afterwards cells were left untreated (non-stimulated; ns) or stimulated with Ang II (100 nM) for 24 h. Images are from the lower part of the membrane and are representative of five images taken per condition. Quantifications are the mean \pm SEM of six independent experiments. ****P<0.0001, **P<0.01 are values compared to the indicated condition. ARF6 depletion was confirmed by Western blotting. (B). Cells were infected as in (A) and seeded onto DQ gelatin for 1 hour. They were stimulated with Ang II (100 nM). After

6 h, cells were fixed and actin stained using Alexa Fluor 488 phalloidin. Images are representative of the degradation area of four independent experiment with 30 cells examined per condition. Quantifications are the mean \pm SEM **P<0.01, *P<0.05. for the indicated condition. (Two-Way Anova and *t*-test unpaired)

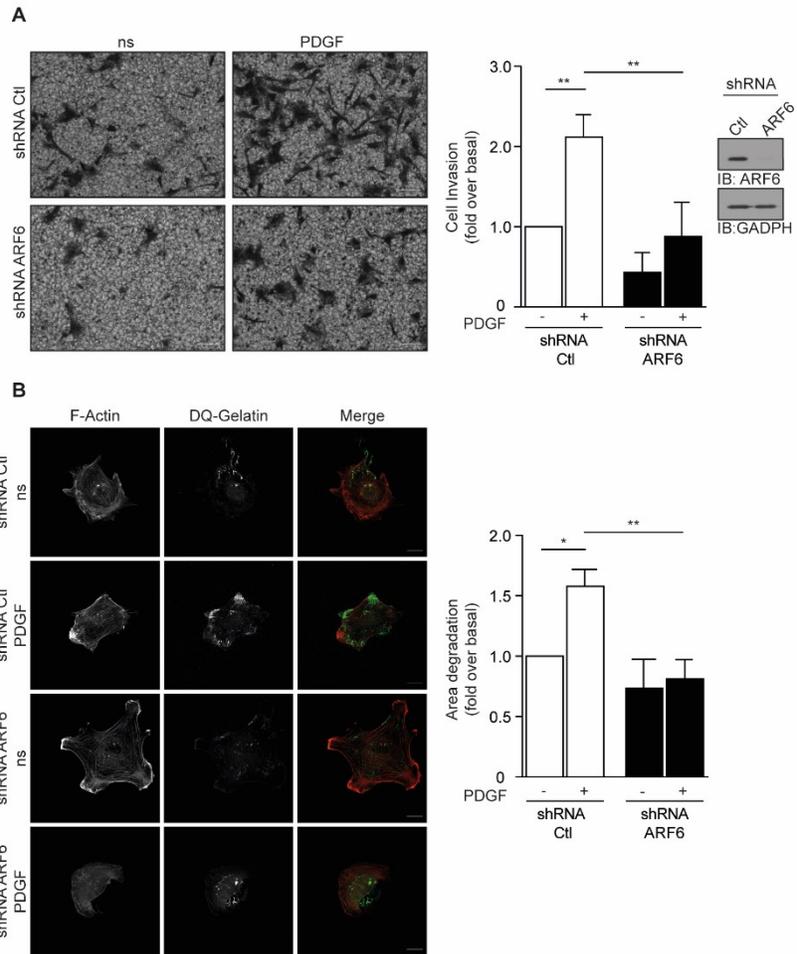
Legend Figure 4: MAPK and PI3K pathways play a role in invasion mediated by PDGF-BB. (A) HAVSMCs were infected with a scrambled or ARF6-shRNA and then serum starved 24 h before stimulation with 25 ng/mL of PDGF-BB for 0, 2, 5, 10 and 30 min. Cells were lysed and ERK1/2 or AKT activity were assessed by Western blotting using specific antibodies. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of six and three independent experiments. ****P < 0.001, ** P < 0.01. (B, C)100 000 cells were seeded into Matrigel-coated Boyden chambers and pretreated with DMSO (ctl), (B) PD98059 (25 μ M), or (C) LY294002 (25 μ M) for 1 hour. One set of cells was left untreated (non-stimulated; ns) and the other was stimulated with PDGF-BB (25ng/mL) for 24 h. Images are from the lower part of the membrane and are representative of five images taken per condition. Quantifications are the mean \pm SEM realised on five (B) or six (C) different experiments. **P<0.01, *P<0.05. (One-Way Anova and Two-Way Anova)

Legend Figure 5: Activation of the MAPK pathway is important for Ang II-mediated invasion in human VSMC, but this process is independent of ARF6. (A) HAVSMCs were infected with a scrambled or ARF6-shRNA and then serum starved 24 h before stimulation with 100 nM of Ang II for 0, 2, 5, 10 and 30 min. Cells were lysed and ERK1/2 or AKT activity were assessed by Western blotting using specific antibodies. Quantifications are the mean \pm S.E.M. of three independent experiments. (B, C)100 000 cells were seeded into Matrigel-coated Boyden chambers and pretreated with DMSO (ctl), (B) PD98059 (25 μ M), or (C) LY294002 (25 μ M) for 1 h. One set of cells was left untreated (non-stimulated; ns) and the other was stimulated with Ang II (100 nM) for 24 h. Images are from the lower part of the membrane and are representative of five images taken per condition. Quantifications are the mean \pm SEM realised on six (B) or four (C) different experiments. ****P<0.0001, *P<0.05. (One-Way Anova, Two-Way Anova and *t*-test unpaired)

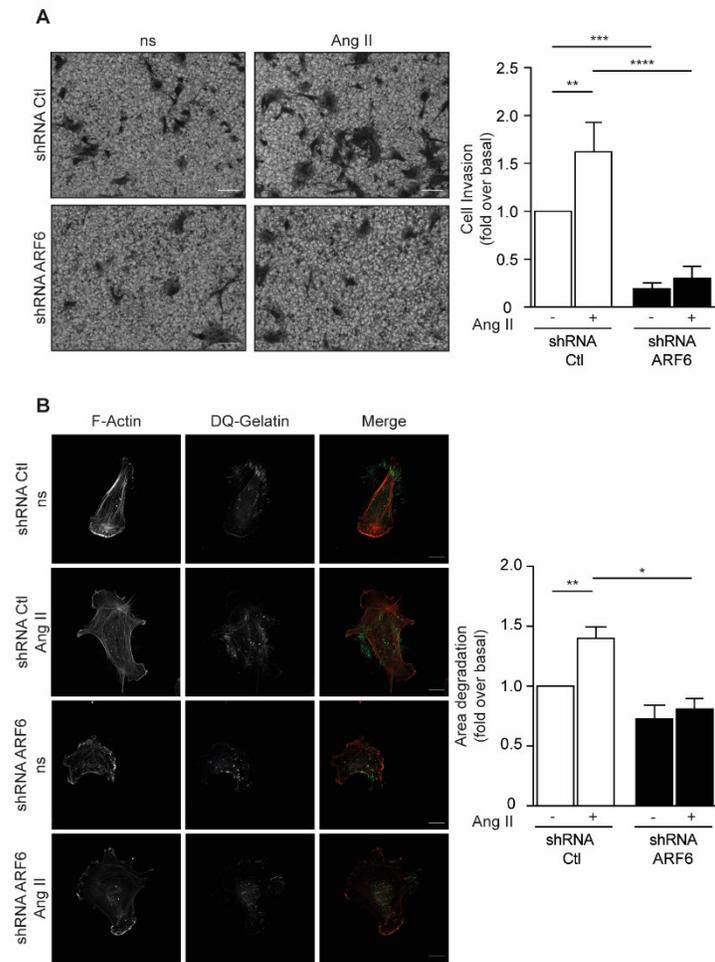
1. Figure 1



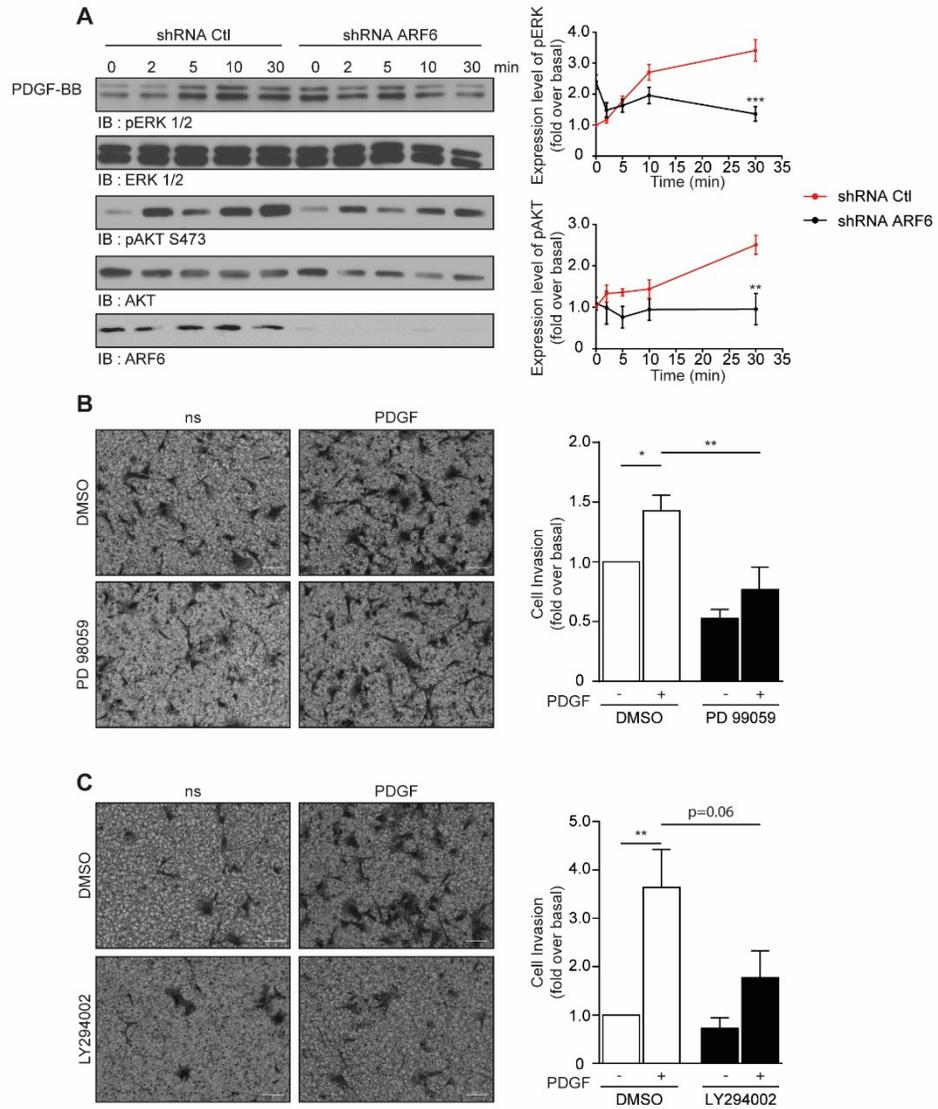
2. Figure 2



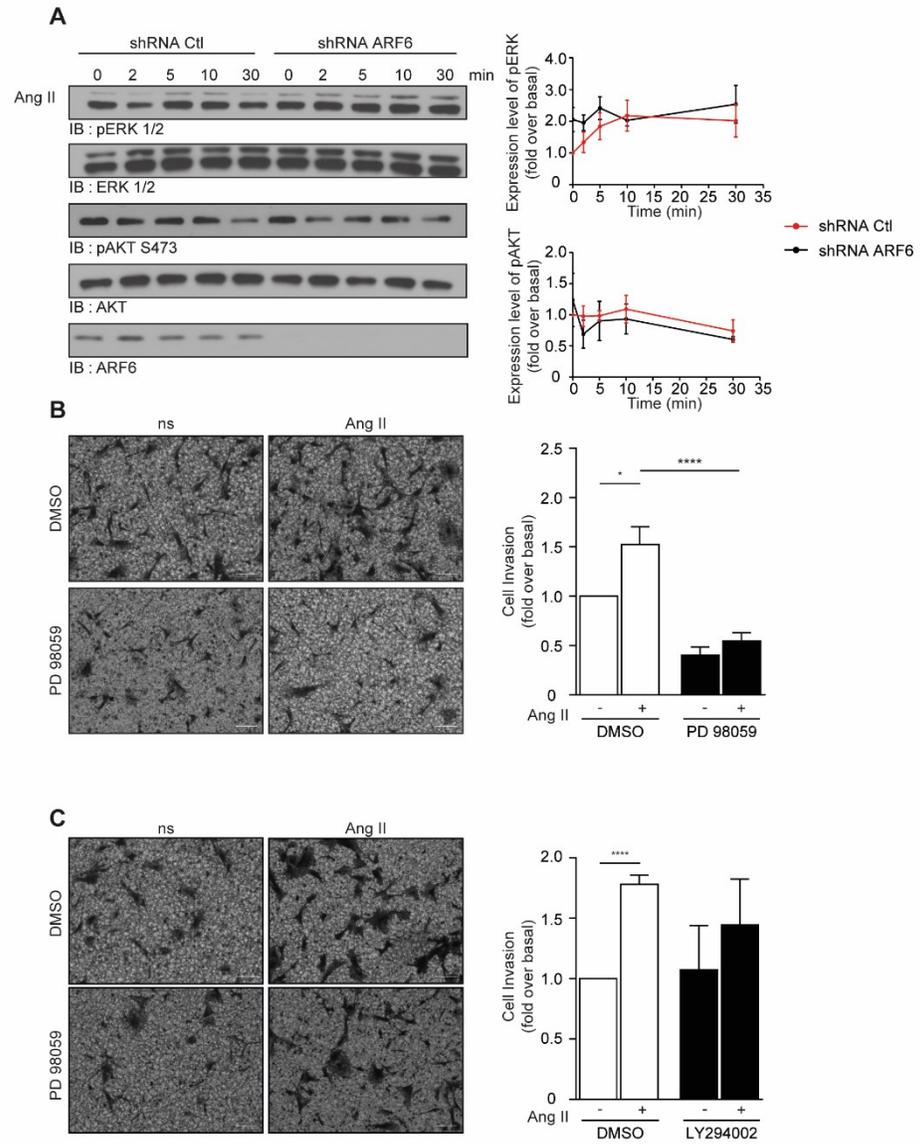
3. Figure 3



4. Figure 4



5. Figure 5



II.7 REFERENCES

1. Hai, C. M., Hahne, P., Harrington, E. O., and Gimona, M. (2002) Conventional protein kinase C mediates phorbol-dibutyrate-induced cytoskeletal remodeling in a7r5 smooth muscle cells. *Exp Cell Res* **280**, 64-74
2. Gimona, M., Kaverina, I., Resch, G. P., Vignal, E., and Burgstaller, G. (2003) Calponin repeats regulate actin filament stability and formation of podosomes in smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* **14**, 2482-2491
3. Mukhopadhyay, U. K., Eves, R., Jia, L., Mooney, P., and Mak, A. S. (2009) p53 suppresses Src-induced podosome and rosette formation and cellular invasiveness through the upregulation of caldesmon. *Mol Cell Biol* **29**, 3088-3098
4. Quintavalle, M., Elia, L., Condorelli, G., and Courtneidge, S. A. (2010) MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *J. Cell Biol.* **189**, 13-22
5. Alvarez, R. H., Kantarjian, H. M., and Cortes, J. E. (2006) Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clin. Proc.* **81**, 1241-1257
6. Andrae, J., Gallini, R., and Betsholtz, C. (2008) Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* **22**, 1276-1312
7. Lamb, D. J., Avades, T. Y., and Ferns, G. A. (2001) Endogenous neutralizing antibodies against platelet-derived growth factor-aa inhibit atherogenesis in the cholesterol-fed rabbit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 997-1003
8. Nabel, E. G., Yang, Z., Liptay, S., San, H., Gordon, D., Haudenschild, C. C., and Nabel, G. J. (1993) Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induce intimal hyperplasia in vivo. *J Clin Invest* **91**, 1822-1829
9. Zahradka, P., Storie, B., and Wright, B. (2009) IGF-1 receptor transactivation mediates Src-dependent cortactin phosphorylation in response to angiotensin II This article is one of a selection of papers published in a special issue celebrating the 125th anniversary of the Faculty of Medicine at the University of Manitoba. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **87**, 805-812
10. Wang, M., Zhang, J., Spinetti, G., Jiang, L.-Q., Monticone, R., Zhao, D., Cheng, L., Krawczyk, M., Talan, M., Pintus, G., and Lakatta, E. G. (2005) Angiotensin II activates matrix metalloproteinase type II and mimics age-associated carotid arterial remodeling in young rats. *The American journal of pathology* **167**, 1429-1442
11. Charles, R., Namkung, Y., Cotton, M., Laporte, S. A., and Claing, A. (2016) β -Arrestin-mediated Angiotensin II Signaling Controls the Activation of ARF6 Protein and Endocytosis in Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* **291**, 3967-3981

12. Bourmoum, M., Charles, R., and Claing, A. (2016) The GTPase ARF6 Controls ROS Production to Mediate Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *PLoS One* **11**, e0148097-e0148097
13. Schlienger, S., Campbell, S., and Claing, A. (2014) ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. *Mol Biol Cell* **25**, 17-29
14. Bacakova, L., Trávníčková, M., Filová, E., Matějka, R., Stepanovska, J., Musílková, J., Zarubova, J., and Molitor, M. (2018) The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in the Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels. pp
15. Jacot, J. G., and Wong, J. Y. (2008) Endothelial injury induces vascular smooth muscle cell proliferation in highly localized regions of a direct contact co-culture system. *Cell Biochem. Biophys.* **52**, 37-46
16. Charles, R., Bourmoum, M., Campbell, S., and Claing, A. (2019) Methods to Investigate the beta-Arrestin-Mediated Control of ARF6 Activation to Regulate Trafficking and Actin Cytoskeleton Remodeling. *Methods Mol. Biol.* **1957**, 159-168
17. Bourmoum, M., Charles, R., and Claing, A. (2016) The GTPase ARF6 Controls ROS Production to Mediate Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *PLoS One* **11**, e0148097
18. Schlienger, S., Campbell, S., and Claing, A. (2014) ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. *Mol. Biol. Cell* **25**, 17-29
19. Charles, R., Namkung, Y., Cotton, M., Laporte, S. A., and Claing, A. (2016) beta-Arrestin-mediated Angiotensin II Signaling Controls the Activation of ARF6 Protein and Endocytosis in Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* **291**, 3967-3981
20. Tong, L., and Qi, G. (2018) Crocin prevents platelet-derived growth factor BB-induced vascular smooth muscle cells proliferation and phenotypic switch. *Mol. Med. Report.* **17**, 7595-7602
21. Montezano, A. C., Nguyen Dinh Cat, A., Rios, F. J., and Touyz, R. M. (2014) Angiotensin II and vascular injury. *Curr. Hypertens. Rep.* **16**, 431
22. Kim, N. Y., Kohn, J. C., Huynh, J., Carey, S. P., Mason, B. N., Vouyouka, A. G., and Reinhart-King, C. A. (2015) Biophysical induction of vascular smooth muscle cell podosomes. *PLoS One* **10**, e0119008-e0119008
23. Paterson, E. K., and Courtneidge, S. A. (2018) Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *Febs j* **285**, 8-27
24. Kohn, J. C., Bordeleau, F., and Reinhart-King, C. A. (2013) Vascular Smooth Muscle Cell Matrix-Degradation by Podosomes. in *2013 39th Annual Northeast Bioengineering Conference*

25. Zhou, S., Webb, B. A., Eves, R., and Mak, A. S. (2006) Effects of tyrosine phosphorylation of cortactin on podosome formation in A7r5 vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **290**, C463-471
26. Griendling, K. K., Ushio-Fukai, M., Lassegue, B., and Alexander, R. W. (1997) Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension* **29**, 366-373
27. Li, F., and Malik, K. U. (2005) Angiotensin II-induced Akt activation through the epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells is mediated by phospholipid metabolites derived by activation of phospholipase D. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **312**, 1043-1054

Chapitre III : Discussion

Les différents rôles des petites GTPases de la famille des ARFs ont été définis dans différents modèles cellulaires et dans plusieurs pathologies. Tout d'abord, dans un contexte de cancer du sein, les ARFs influencent le caractère invasif de celui-ci. En effet ARF1 est surexprimée dans les types de cancer du sein triple négatif. ARF1 module de façon importante l'invasion des cellules cancéreuses via la sécrétion de différentes protéases de la matrice (Schlienger et al., 2014). Dans un contexte athérosclérotique, l'importance d'ARF6 a été montrée dans notre laboratoire dans le contrôle de la prolifération et de la migration des cellules du muscle lisse vasculaire de rats (Bourmoum et al., 2016; Charles et al., 2016).

Dans cette étude, nous avons mis l'accent sur l'élucidation des mécanismes impliqués dans l'invasion des CMLV humaines dans un contexte d'athérosclérose. Cela a permis de définir le rôle d'ARF6 au sein de ce phénomène ainsi que de compléter les travaux préalablement réalisés dans le laboratoire.

III.1 Caractérisation du modèle cellulaire

Toutes les expériences présentées dans ce mémoire ont été réalisées avec des cellules du muscle lisse vasculaire ayant été isolées d'une aorte humaine. Il s'agissait de la première fois au laboratoire que nous travaillions avec ce type cellulaire, il a donc fallu le caractériser et le comparer avec les cellules de rats. Dans des résultats qui ne sont pas montrés, la présence des récepteurs au PDGF-BB a été vérifiée, ainsi que la réactivité de ces cellules au PDGF-BB ou l'Ang II dans des essais de stimulation similaires à ceux réalisés dans les travaux présentés. Ces résultats ont permis de confirmer la réponse induite à la suite d'une stimulation avec ces deux agonistes. De plus, le profil migratoire des cellules à la suite d'une stimulation à l'Ang II et d'une déplétion de ARF6 semblait être similaire à celui observé dans les cellules de rats (Charles et al., 2016). Pour ce qui est de la protéine ARF6, les niveaux endogènes de celle-ci semblent augmenter en fonction du passage des CMLV humaines, nous avons donc contrôlé cette variable

afin de conserver des analyses physiologiques tout au long de notre étude. Ces résultats préliminaires nous ont permis de définir les caractéristiques de notre modèle cellulaire humain, d'optimiser l'utilisation de celui-ci et d'observer ses similitudes avec le modèle murin.

III.2 Activation de la petite GTPase ARF6

La prochaine étape était alors de confirmer l'activation d'ARF6 dans les CMLV humaines. Cependant, dans les résultats précédemment obtenus au laboratoire, l'activation de ARF6 dans les CMLV avait simplement été démontrée à la suite d'une stimulation à l'Ang II, ou alors dans d'autres types cellulaires via une stimulation à l'EGF (Haines, Saucier et Claing, 2014). Nous avons donc étudié l'effet d'une stimulation avec le PDGF-BB, qui est un des facteurs de croissance essentiels au changement phénotypique des CMLV dans le contexte pathologique de l'athérosclérose. Nous avons observé qu'ARF6 pouvait être activée par l'Ang II via le récepteur AT1R, ces résultats concordant avec l'observation qui avait été faite préalablement. D'autre part ARF6 est aussi réceptive au signal du PDGF-BB via le PDGFR qui s'ensuit par son activation. De plus, il est important de noter que le profil d'activation, c'est-à-dire une activation de façon transitoire, concorde avec les résultats du laboratoire obtenus avec le modèle cellulaire murin et les cellules cancéreuses.

III.3 Le rôle d'ARF6 dans l'invasion cellulaire

Dans l'objectif de mieux comprendre les rôles d'ARF6 dans les CMLV dans un contexte d'athérosclérose, nous avons décidé d'étudier leur implication dans l'invasion des CMLV humaines. En premier lieu, nous avons observé que dans des conditions de stimulation avec du PDGF-BB ou de l'Ang II, c'est-à-dire des conditions entraînant le changement phénotypique, il y avait une augmentation de l'invasion des CMLV. Les résultats sont issus de deux différents types d'expériences qui permettent d'attester l'invasion cellulaire, un essai d'invasion sur Matrigel et un essai de dégradation réalisée en microscopie. Dans les deux cas, l'augmentation de l'invasion à la suite d'une stimulation concorde avec des observations préalables. En effet, le PDGF-BB est souvent utilisé comme contrôle positif dans ce genre d'expérience (Karakiulakis, Papakonstantinou et Roth, 2001). Dans des travaux précédents de notre laboratoire, il a été démontré que l'inhibition d'ARF6 permettait de bloquer la production de

ROS, la prolifération cellulaire, la régulation du phénotype du muscle lisse vasculaire, mais aussi la migration cellulaire (Bourmoum et al., 2016; Charles et al., 2016). ARF6 apparaît alors comme une cible thérapeutique potentielle, car ces facteurs contribuent tous au développement de l'athérosclérose.

Nous avons tenté d'observer l'effet de l'absence d'ARF6 sur l'invasion cellulaire. En utilisant la technologie de l'interférence à l'ARN, soit un petit ARN de type *hairpin* ciblant de manière spécifique cet isoforme, nous avons démontré l'impact de la déplétion d'ARF6 dans l'invasion des CMLV. En effet, l'inhibition de l'expression endogène de celle-ci est suivie d'une diminution importante du phénomène d'invasion induite par différents agonistes dans les deux types d'expériences réalisées. Il serait aussi intéressant de vérifier si la surexpression de notre protéine d'intérêt permet l'augmentation de l'invasion. Afin de donner de la profondeur à nos résultats, il serait important de confirmer ces effets avec autre type d'ARN.

Comme discuté dans la section I.3, l'invasion cellulaire est un phénomène complexe qui est régulé par de nombreuses composantes, il serait donc important de définir lesquelles sont impliquées dans notre situation. Par exemple, lors de l'observation de la dégradation de la matrice par la méthode de gélatine fluorescente, nous pouvons observer la formation de structures d'actine. Il serait essentiel de définir s'il s'agit de podosomes ou alors de points d'adhésion focaux. En effet, nous avons principalement discuté des structures d'actine que sont les podosomes, mais les points d'adhésion focaux permettent eux aussi l'interaction de la cellule avec la MEC via des intégrines, et des études ont montré qu'ils peuvent aussi dégrader la matrice (Wang et McNiven, 2012). Dans des essais actuels, nous essayons donc de définir de quelle structure il s'agit en utilisant des anticorps spécifiques à Tsk5 et cortactine pour les podosomes et pour les points d'adhésion focaux (Paterson et Courtneidge, 2018). Cependant, il est difficile de différencier ces deux structures, car elles ont des compositions très proches.

De plus, nous savons que l'invasion cellulaire est souvent médiée par une dégradation de la MEC à l'aide de différentes protéases, il serait donc essentiel de définir quelles protéases permettent de dégrader la MEC dans les CMLV humaines, mais aussi quelles protéases ARF6 peut moduler. Pour cela, dans des résultats qui ne sont pas montrés, nous avons étudié à l'aide d'essais de zymographie l'activité protéolytiques de la MMP2 et la MMP9, qui sont les mieux

caractérisées dans ce type cellulaire. Les résultats suggéraient que celles-ci n'étaient pas modulées par l'absence d'ARF6. Il reste alors impératif de caractériser les protéases impliquées dans le phénomène d'invasion passant par l'activation d'ARF6, il serait peut-être intéressant de regarder l'expression des différentes MMPs via qPCR. Il y a plusieurs pistes que nous souhaiterions explorer : tout d'abord effectuer des essais d'activation pour CDC42, RhoA ou Rac1 en l'absence d'ARF6, car nous savons que celles-ci sont importantes pour la formation des podosomes (Burns et al., 2001; Tatin et al., 2006). De plus, il serait intéressant d'étudier de façon plus approfondie les voies de signalisations liées aux intégrines mais aussi à FAK et paxilline, des éléments présents au niveau des points d'adhésion focaux, mais aussi des podosomes (Cai et al., 2009; Kanda et al., 2000). Un des autres aspects qui pourrait s'avérer intéressant sachant que l'on connaît les capacités modulateurs du recyclage d'ARF6 serait d'investiguer si le recyclage de la MT1-MMP ou de son transport à la membrane pourrait être régulé par ARF6 (Grossmann et al., 2019). Il reste donc beaucoup de chemin et de possibilités afin de définir l'implication d'ARF6 dans l'invasion cellulaire, et de quelle façon elle la module.

Afin de confirmer l'importance d'ARF6 dans l'invasion cellulaire, il sera nécessaire de réaliser une expérience de sauvetage en surexprimant cet isoforme pour restaurer les niveaux physiologiques dans les cellules ayant subi le silençage. Il pourrait aussi être intéressant de regarder les résultats grâce à un dominant négatif d'ARF6 (T27N) ou encore en utilisant un isoforme constitutivement actif (Q67L). Ce genre d'expérience permettrait de donner de la valeur aux observations réalisées au cours de l'étude.

III.4 Les voies de signalisation impliquées dans l'invasion cellulaire

Éprouvant des difficultés à définir les mécanismes extracellulaires impliqués dans l'invasion des CMLV humaines, nous avons décidé de nous consacrer à l'étude des mécanismes subcellulaires engagés dans ce phénomène. Nous avons donc tenté d'observer l'impact de l'absence d'ARF6 sur l'activation de différentes voies de signalisation qui sont connues pour être importantes dans les phénomènes de migration, d'invasion, mais aussi de survie. En effet, nous nous sommes concentrés sur la voie ERK qui est une des voies mitogéniques les plus caractérisées et qui est impliquée dans le phénomène de migration induit par l'Ang II dans les CMLV (Charles et al., 2016). La voie PI3K quant à elle est plutôt une voie de survie cellulaire,

mais il a été démontré qu'elle pouvait jouer un rôle dans l'invasion des cellules cancéreuses (Chen et al., 2009). La disparité des résultats observés reste à ce jour, inexplicable. En effet la déplétion d'ARF6 joue un rôle sur l'activation des deux voies de signalisation lors d'une stimulation au PDGF-BB alors qu'il n'y a pas de modulation lors d'une stimulation à l'Ang II. Ce dernier résultat est d'autant plus surprenant que lors d'une inhibition de l'activation de ARF avec du SecinH3 dans les CMLV de rats, nous avons observé une régulation à la baisse des voies AKT et MAPK (Charles et al., 2018). Nous sommes actuellement en cours de reproduction de ce résultat dans les cellules humaines afin de définir s'il s'agit d'une différence au niveau du type cellulaire, ou s'il s'agit d'une différence entre l'inhibition et la déplétion d'ARF6. De plus, il serait pertinent de vérifier si l'internalisation du PDGFR se fait correctement, car si ARF6 est impliquée dans l'endocytose du complexe récepteur/agoniste, il se peut que cela explique que les deux voies soient indubitablement régulées à la baisse. Il est aussi important de noter l'augmentation du niveau basale de ERK en condition déplétée. En effet, ce résultat avait déjà été observé dans les cellules humaines lors des essais préliminaires du laboratoire et il serait intéressant d'explorer plus profondément l'origine cette augmentation. Il a été montré que le basal des MAPK pouvait être plus élevé dans les adipocytes en conditions de diabète de type II et que ce phénomène est souvent associé avec une mauvaise absorption du glucose (Carlson, Koterski, Sciotti, Pocard et Rondinone, 2003; Gogg, Smith et Jansson, 2009). Cette piste serait donc pertinente à développer.

Après avoir défini les voies de signalisation qui pouvaient être modulées par ARF6, nous avons voulu caractériser leur impact dans l'invasion. En utilisant des inhibiteurs spécifiques à chacune des voies, nous avons observé que l'invasion induite par le PDGF était à la fois diminuée lorsque la voie MAPK est inhibée et lorsque la voie PI3K est inhibée. Dans le cas plus complexe de l'Ang II, où la modulation des voies de signalisation par ARF6 n'est pas apparente, seulement la voie MAPK semble impliquée dans l'invasion cellulaire. Ce résultat intéressant pourrait suggérer une fonction redondante d'autres petites GTPases. Il serait aussi intéressant d'investiguer d'autres voies de signalisation comme JAK/STAT ou encore p38 afin de définir plus précisément les mécanismes subséquents à l'activation d'ARF6 qui pourraient jouer un rôle dans l'invasion des CMLV humaines.

III.5 Perspectives

Dans le but de définir l'implication d'ARF6 dans l'athérosclérose, il serait intéressant de regarder si ARF6 joue un rôle dans la sénescence ou encore l'autophagie, car nous savons que ces deux phénomènes participent au développement de cette pathologie. En effet, comme discuté plus haut ces deux caractéristiques sont impliquées dans le dérèglement de la stabilité de la plaque au niveau des CMLV. Sachant que nous avons défini différents rôles pour ARF6 dans le développement de l'athérosclérose, cette perspective de recherche apparaît comme un point important à aller vérifier. De plus, si on développe cette idée, ARF6 pourrait être utilisé en tant que biomarqueur pour l'athérosclérose. Pour ce genre de proposition de recherche, il faudrait obtenir des tissus de patients athérosclérotiques de la part d'une biobanque et les classer selon le statut clinique d'ARF6 : soit en termes d'expression protéique et/ou d'expression génique. De cette façon, il serait plus facile de déterminer de manière *in situ* la corrélation clinique entre le niveau d'expression d'ARF6 et le phénotype de sénescence tissulaire par exemple. Dans le même ordre idée, il serait intéressant de regarder les rôles d'ARF6 dans d'autres types cellulaires comme les cellules endothéliales.

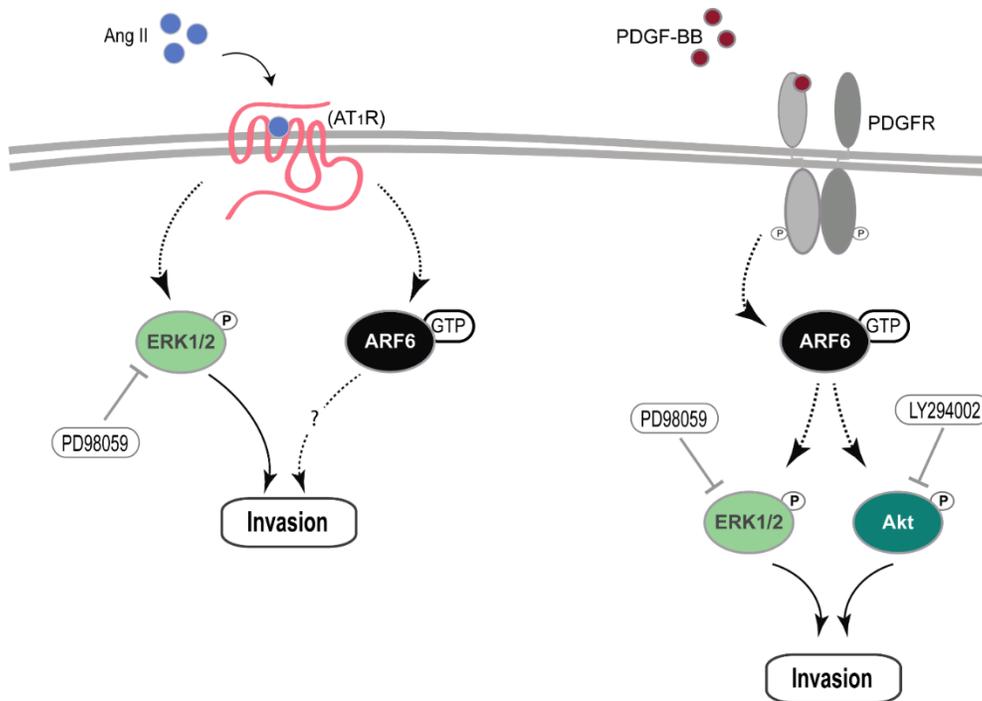
Toutes les perspectives de recherche proposées précédemment sont réalisées au niveau cellulaire, il est donc une des perspectives principales du laboratoire de passer dans un contexte *in vivo*. Pour ce faire nous avons développé un modèle de souris transgénique ARF6 *knockout* basé sur un système d'induction de l'excision allélique médiée par la recombinase Cre, et ce, de manière spécifique dans les cellules du muscle lisse vasculaire seulement. L'étude *in vivo* permettra de mieux comprendre le rôle physiopathologique d'ARF6 dans le contexte de l'athérosclérose.

III.6 Conclusion

Pour conclure, au cours de ce mémoire nous avons tenté de définir les rôles d'ARF6 dans la pathologie de l'athérosclérose. En effet, comme discuté dans l'introduction, les maladies cardiovasculaires sont encore aujourd'hui une des principales causes de décès au Canada, mais aussi dans le monde, il est donc primordial d'en comprendre le fonctionnement et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Afin de participer à la recherche dans ce domaine,

nous avons mis l'emphase sur l'impact des petites GTPases ARF sur le développement de la pathologie. L'importance de ces protéines a auparavant été démontrée dans la migration, la régulation du phénotype, mais aussi la prolifération des cellules du muscle lisse vasculaire, et à l'aide de ce mémoire nous avons montré leur implication dans l'invasion de ce type cellulaire.

Il reste encore beaucoup de mécanismes à élucider sur la façon dont ces GTPases sont capables de réguler ce phénomène invasif. Cependant, nous avons mis en avant l'importance des voies MAPK et PI3K dans l'aboutissement de ce mouvement (Figure 6). Ces résultats et ce projet de recherche nous ont permis de conforter l'idée que ces interrupteurs moléculaires jouent un rôle essentiel dans le développement de l'athérosclérose et qu'il est important de continuer à se pencher sur leur fonctionnement et leurs effecteurs.



10. Schématisation du modèle présenté dans l'étude

Cette figure représente les événements qui mènent à l'invasion cellulaire dans les CMLV humaines à la suite d'une stimulation au PDGF-BB ou à l'Ang II. Les deux agonistes sont alors responsables de l'activation de la petite GTPase ARF6 qui apparaît alors comme un modulateur de l'invasion. Cela passe par la phosphorylation de ERK 1/2 et AKT dans le contexte du PDGF, et le mécanisme impliqué dans le cas des GPCR reste encore à définir.

Références

- Abram, C. L., Seals, D. F., Pass, I., Salinsky, D., Maurer, L., Roth, T. M. et Courtneidge, S. A. (2003). The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 16844-16851. doi: 10.1074/jbc.M300267200
- Agence de la santé publique du Canada. (2016). Maladies cardiovasculaires. Repéré le 4 septembre 2018 à <https://cbpp-pcpe.phac-aspc.gc.ca/fr/chronic-diseases/cardiovascular-diseases/>
- Ahotupa, M. (2017). Oxidized lipoprotein lipids and atherosclerosis. *Free Radical Research*, 51(4), 439-447. doi: 10.1080/10715762.2017.1319944
- Aikawa, Y. et Martin, T. F. (2003). ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate required for regulated exocytosis. *Journal of Cell Biology*, 162(4), 647-659. doi: 10.1083/jcb.200212142
- Albinsson, S. et Sessa, W. C. (2011). Can microRNAs control vascular smooth muscle phenotypic modulation and the response to injury? *Physiological Genomics*, 43(10), 529-533. doi: 10.1152/physiolgenomics.00146.2010
- Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T. et Saltiel, A. R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 270(46), 27489-27494. doi: 10.1074/jbc.270.46.27489
- Alvarez, R. H., Kantarjian, H. M. et Cortes, J. E. (2006). Biology of platelet-derived growth factor and its involvement in disease. *Mayo Clinic Proceedings*, 81(9), 1241-1257. doi: 10.4065/81.9.1241
- Andrae, J., Gallini, R. et Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes and Development*, 22(10), 1276-1312. doi: 10.1101/gad.1653708
- Artym, V. V., Yamada, K. M. et Mueller, S. C. (2009). ECM degradation assays for analyzing local cell invasion. *Methods in Molecular Biology*, 522, 211-219. doi: 10.1007/978-1-59745-413-1_15
- Atlas, S. A. (2007). The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 13(8 Suppl B), 9-20. doi: 10.18553/jmcp.2007.13.s8-b.9
- Bacakova, L., Trávníčková, M., Filová, E., Matějka, R., Stepanovska, J., Musílková, J., . . . Molitor, M. (2018). The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in the Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels (
- Bader, M. (2010). Tissue renin-angiotensin-aldosterone systems: Targets for pharmacological therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50, 439-465. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105610

- Barnes, M. J. et Farndale, R. W. (1999). Collagens and atherosclerosis. *Experimental Gerontology*, 34(4), 513-525.
- Bauters, C. (2009). Athérome : épidémiologie et physiopathologie. Le malade poly-athéromateux. Repéré le 5 janvier 2018 à <http://campus.cerimes.fr/cardiologie-et-maladies-vasculaires/enseignement/cardiologie4/site/html/cours.pdf>
- Benigni, A., Cassis, P. et Remuzzi, G. (2010). Angiotensin II revisited: new roles in inflammation, immunology and aging. *EMBO Molecular Medicine*, 2(7), 247-257. doi: 10.1002/emmm.201000080
- Bennett, M. R., Sinha, S. et Owens, G. K. (2016a). Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), 692-702. doi: 10.1161/circresaha.115.306361
- Bennett, M. R., Sinha, S. et Owens, G. K. (2016b). Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), 692-702. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361
- Bharti, S., Inoue, H., Bharti, K., Hirsch, D. S., Nie, Z., Yoon, H.-Y., . . . Randazzo, P. A. (2007). Src-Dependent Phosphorylation of ASAP1 Regulates Podosomes. 27(23), 8271-8283. doi: 10.1128/MCB.01781-06 %J Molecular and Cellular Biology
- Blais, C. et Rochette, L. (2018). *Portrait de l'ensemble des maladies vasculaires au Québec : prévalence, incidence et mortalité* (n° 20). Repéré à https://www.inspq.qc.ca/sites/default/files/publications/2446_portrait_maladies_vasculaires.pdf
- Blank, R. S. et Owens, G. K. (1990). Platelet-derived growth factor regulates actin isoform expression and growth state in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*, 142(3), 635-642. doi: 10.1002/jcp.1041420325
- Blaukat, A., Barac, A., Cross, M. J., Offermanns, S. et Dikic, I. (2000). G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of Galpha(q) and Galpha(i) signals. *Molecular and Cellular Biology*, 20(18), 6837-6848. doi: 10.1128/mcb.20.18.6837-6848.2000
- Bonnans, C., Chou, J. et Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15, 786. doi: 10.1038/nrm3904
- Boshans, R. L., Szanto, S., van Aelst, L. et D'Souza-Schorey, C. (2000). ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Molecular and Cellular Biology*, 20(10), 3685-3694. doi: 10.1128/mcb.20.10.3685-3694.2000
- Bourmoum, M., Charles, R. et Claing, A. (2016). The GTPase ARF6 Controls ROS Production to Mediate Angiotensin II-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *PLoS One*, 11(1), e0148097. doi: 10.1371/journal.pone.0148097
- Braun-Menendez, E., Fasciolo, J. C., Leloir, L. F. et Muñoz, J. M. (1940). The substance causing renal hypertension. *The Journal of physiology*, 98(3), 283-298. doi: 10.1113/jphysiol.1940.sp003850

- Browatzki, M., Larsen, D., Pfeiffer, C. A., Gehrke, S. G., Schmidt, J., Kranzhofer, A., . . . Kranzhofer, R. (2005). Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner. *Journal of Vascular Research*, 42(5), 415-423. doi: 10.1159/000087451
- Burns, S., Thrasher, A. J., Blundell, M. P., Machesky, L. et Jones, G. E. (2001). Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein, and differentiation. *Blood*, 98(4), 1142-1149.
- Cai, W.-J., Li, M. B., Wu, X., Wu, S., Zhu, W., Chen, D., . . . Schaper, W. (2009). Activation of the integrins $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ and focal adhesion kinase (FAK) during arteriogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 322(1), 161-169. doi: 10.1007/s11010-008-9953-8
- Caligiuri, G. (2004). [Role of the immune response in atherosclerosis and acute coronary syndromes]. *Médecine Sciences*, 20(2), 175-181. doi: 10.1051/medsci/2004202175
- Carlson, C. J., Koterski, S., Sciotti, R. J., Pocard, G. B. et Rondinone, C. M. (2003). Enhanced Basal Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Adipocytes From Type 2 Diabetes. *Diabetes*, 52(3), 634. doi: 10.2337/diabetes.52.3.634
- Cavenagh, M. M., Whitney, J. A., Carroll, K., Zhang, C., Boman, A. L., Rosenwald, A. G., . . . Kahn, R. A. (1996). Intracellular distribution of Arf proteins in mammalian cells. Arf6 is uniquely localized to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 271(36), 21767-21774. doi: 10.1074/jbc.271.36.21767
- Chardin, P., Paris, S., Antony, B., Robineau, S., Beraud-Dufour, S., Jackson, C. L. et Chabre, M. (1996). A human exchange factor for ARF contains Sec7- and pleckstrin-homology domains. *Nature*, 384(6608), 481-484. doi: 10.1038/384481a0
- Charles, R., Bourmoum, M. et Claing, A. (2018). ARF GTPases control phenotypic switching of vascular smooth muscle cells through the regulation of actin function and actin dependent gene expression. *Cellular Signalling*, 46, 64-75. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.02.012
- Charles, R., Namkung, Y., Cotton, M., Laporte, S. A. et Claing, A. (2016). beta-Arrestin-mediated Angiotensin II Signaling Controls the Activation of ARF6 Protein and Endocytosis in Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 291(8), 3967-3981. doi: 10.1074/jbc.M115.684357
- Chaudhary, R., Garg, J., Shah, N. et Sumner, A. (2017). PCSK9 inhibitors: A new era of lipid lowering therapy. *World Journal of Cardiology*, 9(2), 76-91. doi: 10.4330/wjc.v9.i2.76
- Chen, J. S., Wang, Q., Fu, X. H., Huang, X. H., Chen, X. L., Cao, L. Q., . . . Zhang, L. J. (2009). Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9. *Hepatology Research*, 39(2), 177-186. doi: 10.1111/j.1872-034X.2008.00449.x

- Chen, P. H., Chen, X. et He, X. (2013). Platelet-derived growth factors and their receptors: structural and functional perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834(10), 2176-2186. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.10.015
- Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V. et Orekhov, A. N. (2016). Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(1), 17-28. doi: 10.1111/jcmm.12689
- Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Orekhov, A. N. et Bobryshev, Y. V. (2017). How do macrophages sense modified low-density lipoproteins? *International Journal of Cardiology*, 230, 232-240. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.12.164
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N. et Bobryshev, Y. V. (2015). Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 214(1), 33-50. doi: 10.1111/apha.12466
- Claing, A., Chen, W., Miller, W. E., Vitale, N., Moss, J., Premont, R. T. et Lefkowitz, R. J. (2001). beta-Arrestin-mediated ADP-ribosylation factor 6 activation and beta 2-adrenergic receptor endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42509-42513. doi: 10.1074/jbc.M108399200
- D'Souza-Schorey, C. et Chavrier, P. (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 7(5), 347-358. doi: 10.1038/nrm1910
- Dhanasekaran, D. N., Kashef, K., Lee, C. M., Xu, H. et Reddy, E. P. (2007). Scaffold proteins of MAP-kinase modules. *Oncogene*, 26(22), 3185-3202. doi: 10.1038/sj.onc.1210411
- Diaz, B., Shani, G., Pass, I., Anderson, D., Quintavalle, M. et Courtneidge, S. A. (2009). Tks5-dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for invadopodia formation. *Sci Signal*, 2(88), ra53. doi: 10.1126/scisignal.2000368
- Donaldson, J. G. (2003). Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 278(43), 41573-41576. doi: 10.1074/jbc.R300026200
- Donaldson, J. G. et Jackson, C. L. (2011). ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 12(6), 362-375. doi: 10.1038/nrm3117
- Donaldson, J. G. et Klausner, R. D. (1994). ARF: a key regulatory switch in membrane traffic and organelle structure. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(4), 527-532.
- Douillette, A., Bibeau-Poirier, A., Gravel, S. P., Clement, J. F., Chenard, V., Moreau, P. et Servant, M. J. (2006). The proinflammatory actions of angiotensin II are dependent on p65 phosphorylation by the I κ B kinase complex. *Journal of Biological Chemistry*, 281(19), 13275-13284. doi: 10.1074/jbc.M512815200
- Eisenreich, A. et Rauch, U. (2011). PI3K inhibitors in cardiovascular disease. *Cardiovascular Therapeutics*, 29(1), 29-36. doi: 10.1111/j.1755-5922.2010.00206.x

- Flynn, P. D., Byrne, C. D., Baglin, T. P., Weissberg, P. L. et Bennett, M. R. (1997). Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood*, 89(12), 4378-4384.
- Forrester, S. J., Kawai, T., O'Brien, S., Thomas, W., Harris, R. C. et Eguchi, S. (2016). Epidermal Growth Factor Receptor Transactivation: Mechanisms, Pathophysiology, and Potential Therapies in the Cardiovascular System. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56, 627-653. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-070115-095427
- Frantz, C., Stewart, K. M. et Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 24), 4195-4200. doi: 10.1242/jcs.023820
- Fritsch, R., de Krijger, I., Fritsch, K., George, R., Reason, B., Kumar, M. S., . . . Downward, J. (2013). RAS and RHO families of GTPases directly regulate distinct phosphoinositide 3-kinase isoforms. *Cell*, 153(5), 1050-1063. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.031
- Fujiwara, T., Oda, K., Yokota, S., Takatsuki, A. et Ikehara, Y. (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 263(34), 18545-18552.
- Geng, Y. J. et Libby, P. (2002). Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(9), 1370-1380.
- Geovanini, G. R. et Libby, P. (2018). Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 132(12), 1243-1252. doi: 10.1042/cs20180306
- Giasson, E. et Meloche, S. (1995). Role of p70 S6 protein kinase in angiotensin II-induced protein synthesis in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270(10), 5225-5231. doi: 10.1074/jbc.270.10.5225
- Gilman, A. G. (1984). G proteins and dual control of adenylate cyclase. *Cell*, 36(3), 577-579. doi: 10.1016/0092-8674(84)90336-2
- Gogg, S., Smith, U. et Jansson, P.-A. (2009). Increased MAPK Activation and Impaired Insulin Signaling in Subcutaneous Microvascular Endothelial Cells in Type 2 Diabetes: The Role of Endothelin-1. *Diabetes*, 58(10), 2238. doi: 10.2337/db08-0961
- Grootaert, M. O., da Costa Martins, P. A., Bitsch, N., Pintelon, I., De Meyer, G. R., Martinet, W. et Schrijvers, D. M. (2015). Defective autophagy in vascular smooth muscle cells accelerates senescence and promotes neointima formation and atherogenesis. *Autophagy*, 11(11), 2014-2032. doi: 10.1080/15548627.2015.1096485
- Grootaert, M. O. J., Moulis, M., Roth, L., Martinet, W., Vindis, C., Bennett, M. R. et De Meyer, G. R. Y. (2018). Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 114(4), 622-634. doi: 10.1093/cvr/cvy007
- Grossmann, A. H., Zhao, H., Jenkins, N., Zhu, W., Richards, J. R., Yoo, J. H., . . . Odelberg, S. J. (2019). The small GTPase ARF6 regulates protein trafficking to control cellular function during development and in disease. *Small GTPases*, 10(1), 1-12. doi: 10.1080/21541248.2016.1259710

- Gurevich, V. V. et Gurevich, E. V. (2006). The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacology and Therapeutics*, 110(3), 465-502. doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.09.008
- Hafner, M., Schmitz, A., Grune, I., Srivatsan, S. G., Paul, B., Kolanus, W., . . . Famulok, M. (2006). Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature*, 444(7121), 941-944. doi: 10.1038/nature05415
- Haines, E., Saucier, C. et Claing, A. (2014). The adaptor proteins p66Shc and Grb2 regulate the activation of the GTPases ARF1 and ARF6 in invasive breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 289(9), 5687-5703. doi: 10.1074/jbc.M113.516047
- Hansson, G. K. (2001). Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(12), 1876-1890.
- Hayashi, K., Saga, H., Chimori, Y., Kimura, K., Yamanaka, Y. et Sobue, K. (1998). Differentiated phenotype of smooth muscle cells depends on signaling pathways through insulin-like growth factors and phosphatidylinositol 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(44), 28860-28867.
- He, C., Medley, S. C., Hu, T., Hinsdale, M. E., Lupu, F., Virmani, R. et Olson, L. E. (2015). PDGFRbeta signalling regulates local inflammation and synergizes with hypercholesterolaemia to promote atherosclerosis. *Nat Commun*, 6, 7770. doi: 10.1038/ncomms8770
- Heldin, C.-H. et Lennartsson, J. Structural and functional properties of platelet-derived growth factor and stem cell factor receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(8), a009100-a009100. doi: 10.1101/cshperspect.a009100
- Heldin, C. H., Ostman, A. et Ronnstrand, L. (1998). Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1378(1), F79-113.
- Helms, J. B. et Rothman, J. E. (1992). Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature*, 360(6402), 352-354. doi: 10.1038/360352a0
- Hemmings, B. A. et Restuccia, D. F. PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), a011189-a011189. doi: 10.1101/cshperspect.a011189
- Heuchel, R., Berg, A., Tallquist, M., Ahlen, K., Reed, R. K., Rubin, K., . . . Soriano, P. (1999). Platelet-derived growth factor beta receptor regulates interstitial fluid homeostasis through phosphatidylinositol-3' kinase signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11410-11415. doi: 10.1073/pnas.96.20.11410
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., . . . Kanaho, Y. (1999). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell*, 99(5), 521-532.
- Hood, J. D. et Cheresch, D. A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature Reviews: Cancer*, 2(2), 91-100. doi: 10.1038/nrc727

- Houndolo, T., Boulay, P. L. et Claing, A. (2005). G protein-coupled receptor endocytosis in ADP-ribosylation factor 6-depleted cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(7), 5598-5604. doi: 10.1074/jbc.M411456200
- Hu, Y., Dietrich, H., Metzler, B., Wick, G. et Xu, Q. (2000). Hyperexpression and activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(1), 18-26.
- Hubbard, S. R. et Miller, W. T. (2007). Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), 117-123. doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.010
- Huo, Y. et Ley, K. F. (2004). Role of Platelets in the Development of Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 14(1), 18-22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2003.09.007>
- Institut de recherche en santé du Canada. (2016). L'hypertension artérielle au Canada. Repéré le 4 septembre 2018 à https://hypertension.ca/wp-content/uploads/2018/12/HTN-Fact-Sheet-2016_FR.pdf
- Itoh, Y. (2006). MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue. *IUBMB Life*, 58(10), 589-596. doi: 10.1080/15216540600962818
- Justus, C. R., Leffler, N., Ruiz-Echevarria, M. et Yang, L. V. (2014). In vitro cell migration and invasion assays. *Journal of visualized experiments : JoVE*(88), 51046. doi: 10.3791/51046
- Kahn, R. A., Cherfils, J., Elias, M., Lovering, R. C., Munro, S. et Schurmann, A. (2006). Nomenclature for the human Arf family of GTP-binding proteins: ARF, ARL, and SAR proteins. *Journal of Cell Biology*, 172(5), 645-650. doi: 10.1083/jcb.200512057
- Kahn, R. A. et Gilman, A. G. (1984). Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 259(10), 6228-6234.
- Kaiura, T. L., Itoh, H., Kubaska, S. M., 3rd, McCaffrey, T. A., Liu, B. et Kent, K. C. (2000). The effect of growth factors, cytokines, and extracellular matrix proteins on fibronectin production in human vascular smooth muscle cells. *Journal of Vascular Surgery*, 31(3), 577-584.
- Kanda, S., Kuzuya, M., Ramos, M. A., Koike, T., Yoshino, K., Ikeda, S. et Iguchi, A. (2000). Matrix metalloproteinase and alphavbeta3 integrin-dependent vascular smooth muscle cell invasion through a type I collagen lattice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(4), 998-1005.
- Kaplan-Albuquerque, N., Garat, C., Desseva, C., Jones, P. L. et Nemenoff, R. A. (2003). Platelet-derived Growth Factor-BB-mediated Activation of Akt Suppresses Smooth Muscle-specific Gene Expression through Inhibition of Mitogen-activated Protein Kinase and Redistribution of Serum Response Factor. 278(41), 39830-39838. doi: 10.1074/jbc.M305991200

- Karakiulakis, G., Papakonstantinou, E. et Roth, M. (2001). Assay for cell migration and invasion of vascular smooth muscle cells. *Methods in Molecular Medicine*, 52, 163-169. doi: 10.1385/1-59259-073-x:163
- Katsuda, S. et Kaji, T. (2003). Atherosclerosis and extracellular matrix. *J Atheroscler Thromb*, 10(5), 267-274. doi: 10.5551/jat.10.267
- Katz, M., Amit, I. et Yarden, Y. (2007). Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773(8), 1161-1176. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.01.002
- Kaverina, I., Stradal, T. E. et Gimona, M. (2003). Podosome formation in cultured A7r5 vascular smooth muscle cells requires Arp2/3-dependent de-novo actin polymerization at discrete microdomains. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 24), 4915-4924. doi: 10.1242/jcs.00818
- Kazlauskas, A. (2017). PDGFs and their receptors. *Gene*, 614, 1-7. doi: 10.1016/j.gene.2017.03.003
- Kazlauskas, A., Durden, D. L. et Cooper, J. A. (1991). Functions of the major tyrosine phosphorylation site of the PDGF receptor beta subunit. *Cell Regulation*, 2(6), 413-425. doi: 10.1091/mbc.2.6.413
- Kobilka, B. K. (2007). G protein coupled receptor structure and activation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768(4), 794-807. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.10.021
- Law, N. C., White, M. F. et Hunzicker-Dunn, M. E. (2016). G protein-coupled receptors (GPCRs) That Signal via Protein Kinase A (PKA) Cross-talk at Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1) to Activate the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 291(53), 27160-27169. doi: 10.1074/jbc.M116.763235
- Lee, M. C., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L. et Schekman, R. (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 87-123. doi: 10.1146/annurev.cellbio.20.010403.105307
- Lee, T. et Chau, L. (2001). Fas/Fas ligand-mediated death pathway is involved in oxLDL-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 280(3), C709-718. doi: 10.1152/ajpcell.2001.280.3.C709
- Lefkowitz, R. J., Pierce, K. L. et Luttrell, L. M. (2002). Dancing with different partners: protein kinase phosphorylation of seven membrane-spanning receptors regulates their G protein-coupling specificity. *Molecular Pharmacology*, 62(5), 971-974.
- Li, M., Qian, M., Kyler, K. et Xu, J. (2018). Endothelial–Vascular Smooth Muscle Cells Interactions in Atherosclerosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5(151). doi: 10.3389/fcvm.2018.00151
- Libby, P., Geng, Y. J., Aikawa, M., Schoenbeck, U., Mach, F., Clinton, S. K., . . . Lee, R. T. (1996). Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Current Opinion in Lipidology*, 7(5), 330-335.

- Libby, P., Ridker, P. M. et Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473, 317. doi: 10.1038/nature10146
- Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends in Cell Biology*, 17(3), 107-117. doi: 10.1016/j.tcb.2007.01.002
- Linder, S. (2009). Invadosomes at a glance. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 17), 3009-3013. doi: 10.1242/jcs.032631
- Linder, S. et Kopp, P. (2005). Podosomes at a glance. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 10), 2079-2082. doi: 10.1242/jcs.02390
- Linder, S., Wiesner, C. et Himmel, M. (2011). Degrading Devices: Invadosomes in Proteolytic Cell Invasion. 27(1), 185-211. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154216
- Lodish H, B. A., Zipursky SL. (2000). Section 22.3, Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix (*Molecular Cell Biology* (4^e éd.). New York: W. H. Freeman.
- Louis, S. F. et Zahradka, P. (2010). Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Experimental and Clinical Cardiology*, 15(4), e75-85.
- Lu, H. et Daugherty, A. (2015). Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(3), 485-491. doi: 10.1161/atvbaha.115.305380
- Luttrell, L. M. et Lefkowitz, R. J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 3), 455-465.
- Macia, E., Luton, F., Partisani, M., Cherfils, J., Chardin, P. et Franco, M. (2004). The GDP-bound form of Arf6 is located at the plasma membrane. *Journal of Cell Science*, 117(Pt 11), 2389-2398. doi: 10.1242/jcs.01090
- McCain, J. (2013). The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 38(2), 96-108.
- McNamara, C. R. et Degterev, A. (2011). Small-molecule inhibitors of the PI3K signaling network. *Future Medicinal Chemistry*, 3(5), 549-565. doi: 10.4155/fmc.11.12
- Mechanobiology Institute. (2018). What are podosomes? Repéré le 10 juillet 2019 à <https://www.mechanobio.info/cytoskeleton-dynamics/what-are-podosomes/>
- Mehta, P. K. et Griendling, K. K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 292(1), C82-97. doi: 10.1152/ajpcell.00287.2006
- Miano, J. M., Long, X. et Fujiwara, K. (2007). Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 292(1), C70-81. doi: 10.1152/ajpcell.00386.2006

- Murphy, D. A. et Courtneidge, S. A. (2011). The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 12(7), 413-426. doi: 10.1038/nrm3141
- Nie, Z., Hirsch, D. S. et Randazzo, P. A. (2003). Arf and its many interactors. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(4), 396-404.
- Okada, H. (2012). A look at transactivation of the EGF receptor by angiotensin II. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 23(2), 183-185. doi: 10.1681/ASN.2011121178
- Okopien, B., Buldak, L. et Boldys, A. (2018). Benefits and risks of the treatment with fibrates--a comprehensive summary. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 11(11), 1099-1112. doi: 10.1080/17512433.2018.1537780
- Ollinger, R., Bilban, M., Erat, A., Froio, A., McDaid, J., Tyagi, S., . . . Bach, F. H. (2005). Bilirubin: a natural inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*, 112(7), 1030-1039. doi: 10.1161/circulationaha.104.528802
- Padovani, D., Zeghouf, M., Traverso, J. A., Giglione, C. et Cherfils, J. (2013). High yield production of myristoylated Arf6 small GTPase by recombinant N-myristoyl transferase. *Small GTPases*, 4(1), 3-8. doi: 10.4161/sgtp.22895
- Paleotti, O., Macia, E., Luton, F., Klein, S., Partisani, M., Chardin, P., . . . Franco, M. (2005). The small G-protein Arf6GTP recruits the AP-2 adaptor complex to membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 280(22), 21661-21666. doi: 10.1074/jbc.M503099200
- Patel, R., Cardneau, J. D., Colles, S. M. et Graham, L. M. (2006). Synthetic smooth muscle cell phenotype is associated with increased nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity: effect on collagen secretion. *Journal of Vascular Surgery*, 43(2), 364-371. doi: 10.1016/j.jvs.2005.10.032
- Paterson, E. K. et Courtneidge, S. A. (2018). Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *Febs j*, 285(1), 8-27. doi: 10.1111/febs.14123
- Phan, B. A., Dayspring, T. D. et Toth, P. P. (2012). Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update. *Vasc Health Risk Manag*, 8, 415-427. doi: 10.2147/vhrm.S33664
- Pierce, K. L., Premont, R. T. et Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 3(9), 639-650. doi: 10.1038/nrm908
- Povsic, T. J., Kohout, T. A. et Lefkowitz, R. J. (2003). Beta-arrestin1 mediates insulin-like growth factor 1 (IGF-1) activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and anti-apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51), 51334-51339. doi: 10.1074/jbc.M309968200
- Premont, R. T., Perry, S. J., Schmalzigaug, R., Roseman, J. T., Xing, Y. et Claing, A. (2004). The GIT/PIX complex: an oligomeric assembly of GIT family ARF GTPase-activating proteins and PIX family Rac1/Cdc42 guanine nucleotide exchange factors. *Cellular Signalling*, 16(9), 1001-1011. doi: 10.1016/j.cellsig.2004.02.002

- Quintavalle, M., Elia, L., Condorelli, G. et Courtneidge, S. A. (2010). MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Journal of Cell Biology*, 189(1), 13-22. doi: 10.1083/jcb.200912096
- Rafieian-Kopaei, M., Setorki, M., Doudi, M., Baradaran, A. et Nasri, H. (2014). Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *International Journal of Preventive Medicine*, 5(8), 927-946.
- Rahman, M. S. et Woollard, K. (2017). Atherosclerosis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1003, 121-144. doi: 10.1007/978-3-319-57613-8_7
- Randazzo, P. A. et Hirsch, D. S. (2004). Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cellular Signalling*, 16(4), 401-413.
- Reilly, C. F. (1990). Rat vascular smooth muscle cells immortalized with SV40 large T antigen possess defined smooth muscle cell characteristics including growth inhibition by heparin. *Journal of Cellular Physiology*, 142(2), 342-351. doi: 10.1002/jcp.1041420217
- Ricci, C. et Ferri, N. (2015). Naturally occurring PDGF receptor inhibitors with potential anti-atherosclerotic properties. *Vascular Pharmacology*, 70, 1-7. doi: 10.1016/j.vph.2015.02.002
- Ronnstrand, L. et Heldin, C. H. (2001). Mechanisms of platelet-derived growth factor-induced chemotaxis. *International Journal of Cancer*, 91(6), 757-762.
- Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. et Harker, L. (1974). A Platelet-Dependent Serum Factor That Stimulates the Proliferation of Arterial Smooth Muscle Cells *In Vitro*. *71(4)*, 1207-1210. doi: 10.1073/pnas.71.4.1207 %J Proceedings of the National Academy of Sciences
- Rudijanto, A. (2007). The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Medica Indonesiana*, 39(2), 86-93.
- Salabei, J. K., Cummins, T. D., Singh, M., Jones, S. P., Bhatnagar, A. et Hill, B. G. (2013). PDGF-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress. *Biochemical Journal*, 451(3), 375-388. doi: 10.1042/bj20121344
- Saleh, T., Iratni, R. et Eid, A. (2015). *Anti-atherosclerotic plants which modulate the phenotype of vascular smooth muscle cells*.
- Schlienger, S., Campbell, S. et Claing, A. (2014). ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. *Molecular Biology of the Cell*, 25(1), 17-29. doi: 10.1091/mbc.E13-06-0335
- Seo, K. W., Lee, S. J., Kim, Y. H., Bae, J. U., Park, S. Y., Bae, S. S. et Kim, C. D. (2013). Mechanical stretch increases MMP-2 production in vascular smooth muscle cells via activation of PDGFR-beta/Akt signaling pathway. *PLoS One*, 8(8), e70437. doi: 10.1371/journal.pone.0070437
- Simic, I. et Reiner, Z. (2015). Adverse effects of statins - myths and reality. *Current Pharmaceutical Design*, 21(9), 1220-1226.

- Sirtori, C. R. (2014). The pharmacology of statins. *Pharmacological Research*, 88, 3-11. doi: 10.1016/j.phrs.2014.03.002
- Somerville, R. P., Oblander, S. A. et Apte, S. S. (2003). Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology*, 4(6), 216. doi: 10.1186/gb-2003-4-6-216
- Sary Herbert, C. (2000). Natural History and Histological Classification of Atherosclerotic Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(5), 1177-1178. doi: 10.1161/01.ATV.20.5.1177
- Sary Herbert, C., Chandler, A. B., Dinsmore Robert, E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., . . . Wissler Robert, W. (1995). A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. *Circulation*, 92(5), 1355-1374. doi: 10.1161/01.CIR.92.5.1355
- Stegemann, J. P., Hong, H. et Nerem, R. M. (2005). Mechanical, biochemical, and extracellular matrix effects on vascular smooth muscle cell phenotype. *J Appl Physiol (1985)*, 98(6), 2321-2327. doi: 10.1152/jappphysiol.01114.2004
- Sugden, P. H. et Clerk, A. (1997). Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cellular Signalling*, 9(5), 337-351.
- Takatsu, H., Yoshino, K., Toda, K. et Nakayama, K. (2002). GGA proteins associate with Golgi membranes through interaction between their GGAH domains and ADP-ribosylation factors. *The Biochemical journal*, 365(Pt 2), 369-378. doi: 10.1042/BJ20020428
- Tatin, F., Varon, C., Genot, E. et Moreau, V. (2006). A signalling cascade involving PKC, Src and Cdc42 regulates podosome assembly in cultured endothelial cells in response to phorbol ester. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 4), 769-781. doi: 10.1242/jcs.02787
- Thanassoulis, G. et Afshar, M. (2017). Athérosclérose. Repéré le 26 août 2019 à <https://www.merckmanuals.com/fr-ca/professional/troubles-cardiovasculaires/art%C3%A9rioscl%C3%A9rose/ath%C3%A9roscl%C3%A9rose>
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C. et Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*, 97, 4-27. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001
- Thomas, J. A., Deaton, R. A., Hastings, N. E., Shang, Y., Moehle, C. W., Eriksson, U., . . . Owens, G. K. (2009). PDGF-DD, a novel mediator of smooth muscle cell phenotypic modulation, is upregulated in endothelial cells exposed to atherosclerosis-prone flow patterns. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 296(2), H442-H452. doi: 10.1152/ajpheart.00165.2008
- Touyz, R. M. (2004). Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(8), 1263-1273. doi: /s0100-879x2004000800018
- Uryga, A. K. et Bennett, M. R. (2016). Ageing induced vascular smooth muscle cell senescence in atherosclerosis. *Journal of Physiology*, 594(8), 2115-2124. doi: 10.1113/jp270923

- Vetter, I. R. et Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*, 294(5545), 1299-1304. doi: 10.1126/science.1062023
- Wang, J., Uryga, A. K., Reinhold, J., Figg, N., Baker, L., Finigan, A., . . . Bennett, M. (2015). Vascular Smooth Muscle Cell Senescence Promotes Atherosclerosis and Features of Plaque Vulnerability. *Circulation*, 132(20), 1909-1919. doi: 10.1161/circulationaha.115.016457
- Wang, Y. et McNiven, M. A. (2012). Invasive matrix degradation at focal adhesions occurs via protease recruitment by a FAK-p130Cas complex. *The Journal of Cell Biology*, 196(3), 375. doi: 10.1083/jcb.201105153
- Willis, A. I., Pierre-Paul, D., Sumpio, B. E. et Gahtan, V. (2004). Vascular smooth muscle cell migration: current research and clinical implications. *Vascular and Endovascular Surgery*, 38(1), 11-23. doi: 10.1177/153857440403800102
- Worby, C. A. et Dixon, J. E. (2014). PTEN. *Annual Review of Biochemistry*, 83, 641-669. doi: 10.1146/annurev-biochem-082411-113907
- Yarden, Y. et Ullrich, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annual Review of Biochemistry*, 57, 443-478. doi: 10.1146/annurev.bi.57.070188.002303
- Yoshida, H. et Kisugi, R. (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta*, 411(23-24), 1875-1882. doi: 10.1016/j.cca.2010.08.038
- Yoshida, T., Gan, Q., Shang, Y. et Owens, G. K. (2007). Platelet-derived growth factor-BB represses smooth muscle cell marker genes via changes in binding of MKL factors and histone deacetylases to their promoters. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 292(2), C886-895. doi: 10.1152/ajpcell.00449.2006
- Zahradka, P., Storie, B. et Wright, B. (2009). IGF-1 receptor transactivation mediates Src-dependent cortactin phosphorylation in response to angiotensin II. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 87(10), 805-812. doi: 10.1139/y09-052
- Zhang, M. J., Zhou, Y., Chen, L., Wang, Y. Q., Wang, X., Pi, Y., . . . Zhang, L. L. (2016). An overview of potential molecular mechanisms involved in VSMC phenotypic modulation. *Histochemistry and Cell Biology*, 145(2), 119-130. doi: 10.1007/s00418-015-1386-3

Annexe

Figure A

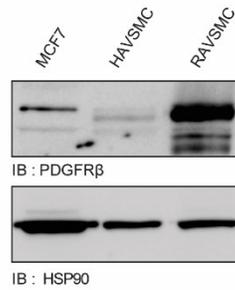


Figure A: PDGFR β est exprimé chez les CMLV humaines. Les cellules ont été lysées et l'expression du récepteur au PDGF-BB a été évaluée via immunobuvardage en utilisant un anticorps spécifique contre PDGFR β . Les cellules MCF7 ont été utilisées comme contrôle négatif et la bande apparente est non-spécifique. Les CMLV de rats sont des cellules à phénotypes synthétiques et expriment en grande quantité le récepteur au PDGF-BB. N=2

Figure B

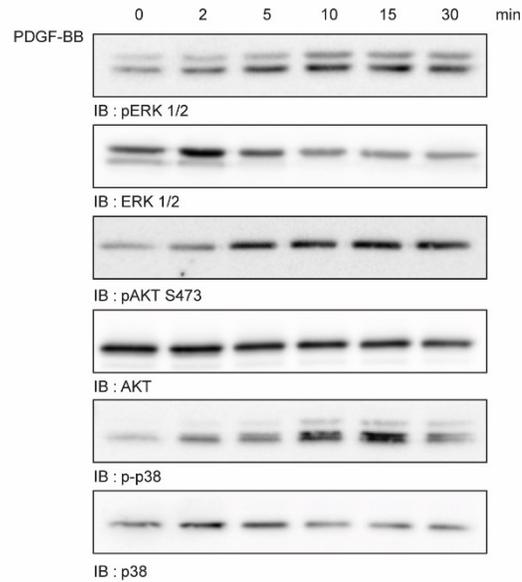


Figure B: La stimulation des CMLV humaines engendrent l'activation de différentes voies de signalisation. Les cellules ont été privées de sérum pendant 24h puis stimulées avec du PDGF-BB (25 ng/mL) à différents temps. Les cellules ont ensuite été lysées et l'activation de ERK 1/2, p38 et AKT été évaluée via immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques. N=3

Figure C

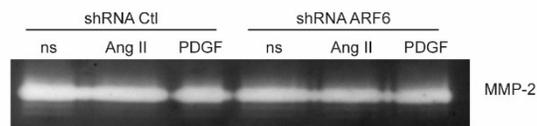


Figure C: L'activité enzymatique de MMP-2 est indépendante de ARF6. Les cellules ont été déplétées puis mises en condition sans sérum pour 24 h. Après un changement de milieu frais, les cellules ont été stimulées à l'Ang II (100 nM) ou au PDGF-BB (25 ng/mL) pendant 24 h. Les surnageants ont été concentrés et un essai de zymographie a été réalisée. N=5