

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>I</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABREVIATIONS.....</b>	<b>XII</b>
<b>RESUME / SUMMARY .....</b>	<b>XV</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>I La pollution particulaire et ses effets cardiovasculaires.....</b>	<b>2</b>
<b>I.1 Les particules en suspension.....</b>	<b>2</b>
<b>I.2 Epidémiologie.....</b>	<b>4</b>
<b>I.3 Réglementation .....</b>	<b>5</b>
<b>I.4 Effets des PM sur le système cardiovasculaire .....</b>	<b>6</b>
I.4.1 Manifestations cardiovasculaires associées à l'exposition aux PM .....	6
I.4.2 Susceptibilités particulières à l'exposition aux PM .....	7
<b>I.5 Mécanisme d'action des particules fines .....</b>	<b>8</b>
I.5.1 Hypothèse 1 : Stress oxydatif et inflammation pulmonaire induits par les PM .....	9
I.5.2 Hypothèse 2 : Translocation des particules dans la circulation systémique .....	10
I.5.3 Hypothèse 3 : Implication du système nerveux autonome.....	11
<b>II Les maladies cardiovasculaires.....</b>	<b>12</b>
<b>II.1 L'endothélium vasculaire .....</b>	<b>13</b>
II.1.1 Le monoxyde d'azote (NO*) .....	14
II.1.2 La NO synthase endothéliale (eNOS) .....	15
II.1.2.1 Structure et fonction de la eNOS .....	15
II.1.2.2 Localisation et régulation de l'activité de la eNOS .....	16
<b>II.2 Le stress oxydatif.....</b>	<b>18</b>
II.2.1 Les sources des ROS contribuant au stress oxydatif vasculaire.....	19
II.2.2 Les défenses antioxydantes .....	21
<b>II.3 La dysfonction endothéliale.....</b>	<b>22</b>
II.3.1 La NADPH oxydase.....	23
II.3.1.1 Structure et assemblage de la NADPH oxydase.....	24

II.3.1.2	Autres isoformes de la NADPH oxydase présentes au niveau vasculaire.....	26
II.3.2	Le découplage de la eNOS .....	27
II.3.3	La formation de peroxynitrite .....	29
<b>II.4</b>	<b>Les macrophages impliqués dans l’inflammation vasculaire.....</b>	<b>30</b>
II.4.1	Généralités sur les macrophages .....	30
II.4.2	Origine des macrophages .....	31
II.4.3	Les populations de macrophages.....	31
II.4.4	Rôle des macrophages au niveau vasculaire .....	33
<b>III</b>	<b>Prévention de la dysfonction endothéliale induite par les PM.....</b>	<b>34</b>
<b>III.1</b>	<b>Les statines .....</b>	<b>34</b>
III.1.1	Classification des statines.....	34
III.1.2	Mécanismes d’action.....	35
III.1.3	Effets pléiotropes des statines .....	36
III.1.3.1	Effets des statines sur la biodisponibilité du NO*.....	37
III.1.3.2	Effets antioxydants des statines .....	38
III.1.3.3	Effets anti-inflammatoires des statines.....	38
<b>III.2</b>	<b>Autres traitements médicamenteux de la dysfonction endothéliale .....</b>	<b>39</b>
III.2.1	Les antioxydants.....	39
III.2.2	Les médicaments du système rénine-angiotensine-aldostérone.....	40
III.2.3	Les bêta-bloquants.....	40
III.2.4	Les dihydropyridines, antagonistes calciques .....	41
III.2.5	L’apocynine.....	41
<b>BUT DU TRAVAIL</b>	.....	<b>42</b>
<b>MATERIEL ET METHODES</b>	.....	<b>44</b>
<b>I</b>	<b>Matériel.....</b>	<b>45</b>
<b>I.1</b>	<b>Origine des produits utilisés .....</b>	<b>45</b>
<b>I.2</b>	<b>Animaux .....</b>	<b>46</b>
<b>I.3</b>	<b>Lignées cellulaires.....</b>	<b>47</b>

I.3.1	HUVEC .....	47
I.3.2	THP-1 .....	47
<b>II</b>	<b>METHODES.....</b>	<b>48</b>
<b>II.1</b>	<b>Préparation des suspensions de DEP.....</b>	<b>48</b>
<b>II.2</b>	<b>Caractères physico-chimiques.....</b>	<b>49</b>
II.2.1	Mesure de la taille des particules .....	49
II.2.2	Mesure de la charge des particules.....	50
II.2.3	Mesure de la taille des gouttelettes d'aérosol.....	50
<b>II.3</b>	<b>Traitements des animaux.....</b>	<b>51</b>
II.3.1	Exposition aux DEP .....	51
II.3.1.1	Exposition <i>ex vivo</i> aux DEP .....	51
II.3.1.2	Exposition <i>in vivo</i> aux DEP.....	51
II.3.2	Traitements médicamenteux .....	52
II.3.2.1	Exposition <i>ex vivo</i> aux DEP .....	52
II.3.2.2	Exposition <i>in vivo</i> aux DEP.....	52
II.3.3	Mesure de la pression artérielle systolique des rats .....	53
II.3.4	Détermination du poids corporel, prise de sang et prélèvement des poumons .....	53
II.3.5	Dosage plasmatique du cholestérol et des triglycérides.....	53
II.3.6	Coupe histologique et coloration hématoxyline-éosine .....	53
<b>II.4</b>	<b>Réponses vasomotrices de l'aorte isolée de rats .....</b>	<b>54</b>
II.4.1	Effets <i>ex vivo</i> des DEP .....	55
II.4.2	Effets <i>in vivo</i> des particules diesel .....	55
<b>II.5</b>	<b>Différenciation et polarisation des THP-1.....</b>	<b>56</b>
II.5.1	Différenciation des monocytes en macrophages M $\phi$ .....	56
II.5.2	Polarisation des macrophages M $\phi$ en macrophages pro-inflammatoires M1, en macrophages anti-inflammatoires M2 et incubation avec les DEP .....	56
<b>II.6</b>	<b>Test de cytotoxicité (MTT) .....</b>	<b>56</b>
<b>II.7</b>	<b>Mesure du stress oxydatif.....</b>	<b>57</b>

II.7.1	Mesure de la production d'anion superoxyde par chémiluminescence à la lucigénine ....	57
II.7.1.1	Principe .....	57
II.7.1.2	Mesure de la production d'anion superoxyde dans l'aorte thoracique de rats .....	58
II.7.1.3	Mesure de la production d'anion superoxyde dans les cellules HUVEC .....	58
II.7.2	Mesure des ROS par la 2',7'-dichlorodihydrofluorescéine diacétate .....	59
II.7.2.1	Principe .....	59
II.7.2.2	Mesure des ROS dans les cellules HUVEC .....	60
II.7.2.3	Mesure des ROS dans les M $\phi$ , M1, M2 et M $\phi$ exposés aux DEP .....	60
II.7.3	Dosage plasmatique de la nitrotyrosine par LC-MS/ MS .....	61
II.7.4	Mesure des ROS par le dosage plasmatique du malonyldialdéhyde.....	62
II.7.4.1	Principe .....	62
II.7.4.2	Dosage plasmatique du MDA chez les rats exposés aux DEP .....	62
<b>II.8</b>	<b>Extraction de l'ARN, transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (RT-qPCR) .....</b>	<b>63</b>
II.8.1	Dans l'aorte thoracique de rats exposés aux DEP.....	63
II.8.1.1	Extraction de l'ARN .....	63
II.8.1.2	Transcription inverse .....	63
II.8.1.3	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative .....	64
II.8.2	Dans les macrophages .....	64
II.8.2.1	Extraction de l'ARN .....	64
II.8.2.2	Transcription inverse .....	65
II.8.2.3	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative .....	65
<b>II.9</b>	<b>Test immuno-enzymatique ELISA en sandwich .....</b>	<b>66</b>
II.9.1	Dosage plasmatique de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$ par test ELISA .....	66
II.9.2	Dosage de l'IL-10 dans le surnageant des cellules M $\phi$ polarisées par test ELISA.....	66
<b>II.10</b>	<b>Mise en évidence de l'expression de protéines par Western blot.....</b>	<b>67</b>
II.10.1	Préparation des échantillons.....	67
II.10.1.1	Préparation des segments d'aorte de rat .....	67

II.10.1.2	Préparation des cellules HUVEC.....	68
II.10.1.3	Préparation des cellules THP-1 .....	68
II.10.2	Dosage des protéines totales .....	68
II.10.3	Electrophorèse.....	69
II.10.4	Transfert .....	69
II.10.5	Incubation avec les anticorps .....	69
II.10.6	Révélation.....	69
II.10.7	Décapage des membranes .....	70
II.10.8	Coloration des gels au bleu de Coomassie .....	70
<b>II.11</b>	<b>Analyse statistique des résultats.....</b>	<b>70</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....		<b>71</b>
<b>CHAPITRE 1 : EFFETS DES DEP SUR LA FONCTION VASCULAIRE ENDOTHELIALE</b>		<b>72</b>
<b>I</b>	<b>But.....</b>	<b>72</b>
<b>II</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>72</b>
<b>II.1</b>	<b>Taille et charge des particules en suspension.....</b>	<b>72</b>
<b>II.2</b>	<b>Exposition <i>ex vivo/in vitro</i> aux DEP .....</b>	<b>73</b>
II.2.1	Rats Wistar normotendus .....	73
II.2.1.1	Effets des DEP sur la relaxation de l'aorte.....	73
II.2.1.2	Effets des DEP sur la contraction de l'aorte.....	75
II.2.1.3	Production d'anion superoxyde .....	75
II.2.2	HUVEC .....	76
II.2.2.1	Viabilité des cellules.....	76
II.2.2.2	Production d'anion superoxyde .....	77
<b>II.3</b>	<b>Exposition <i>in vivo</i> aux DEP.....</b>	<b>78</b>
II.3.1	Taille des gouttelettes de l'aérosol.....	78
II.3.2	Répartition des DEP dans les poumons de rats exposés aux DEP .....	78
II.3.3	Réponses vasomotrices .....	79
II.3.4	Pression artérielle systolique et poids corporel.....	80

II.3.5	RT-qPCR.....	81
<b>III</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>82</b>
<b>IV</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>87</b>
<b>CHAPITRE 2 : TRAITEMENT MEDICAMENTEUX ET STRESS OXYDATIF VASCULAIRE</b>		
<b>INDUIT PAR LES DEP ..... 88</b>		
<b>I</b>	<b>But.....</b>	<b>88</b>
<b>II</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>89</b>
<b>II.1</b>	<b>Traitement médicamenteux et exposition <i>ex vivo</i> aux DEP (rat Wistar).....</b>	<b>89</b>
<b>II.2</b>	<b>Traitement médicamenteux et exposition <i>in vivo</i> aux DEP (SHR).....</b>	<b>89</b>
II.2.1	Pression artérielle systolique et poids corporel.....	89
II.2.2	Stress oxydatif.....	90
II.2.3	RT-qPCR.....	90
II.2.4	Dosages plasmatiques.....	91
II.2.4.1	Cytokines pro-inflammatoires.....	91
II.2.4.2	Nitrotyrosine.....	91
II.2.4.3	Malonyldialdéhyde.....	91
II.2.5	Mise en évidence de la eNOS et du P-VASP.....	92
<b>II.3</b>	<b>Traitement médicamenteux et exposition <i>in vitro</i> aux DEP (HUVEC).....</b>	<b>93</b>
Production de ROS.....		93
<b>III</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>94</b>
<b>IV</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>98</b>
<b>CHAPITRE 3 : EFFETS DES DEP SUR LA POLARISATION DES MACROPHAGES..... 99</b>		
<b>I</b>	<b>But.....</b>	<b>99</b>
<b>II</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>100</b>
<b>II.1</b>	<b>Test de cytotoxicité.....</b>	<b>100</b>
<b>II.2</b>	<b>Effets des DEP sur la polarisation des macrophages M<math>\phi</math>.....</b>	<b>100</b>
II.2.1	Marqueurs M1.....	100
II.2.2	Marqueurs M2.....	101

<b>II.3 Effets des DEP sur les macrophages polarisés en M1 ou M2 .....</b>	<b>102</b>
<b>III Discussion.....</b>	<b>103</b>
<b>IV Conclusion.....</b>	<b>107</b>
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>108</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>113</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>124</b>