



FACULTÉ
DES SCIENCES



UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES

Étude des rôles des récepteurs P2Y₂ et P2Y₆ dans la différenciation adipogénique et ostéoblastogénique des cellules stromales mésenchymateuses multipotentes dérivées du tissu adipeux sous-cutané inguinal murin

Thèse présentée par Laura KOSTOV

en vue de l'obtention du grade académique de Docteur en Sciences

Année académique 2020-2021

Promoteur : Bernard ROBAYE

Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire



Jury de thèse :

Louis DROOGMANS (Université libre de Bruxelles, Président)

Anna Maria MARINI (Université libre de Bruxelles, Secrétaire)

Luc VANHAMME (Université libre de Bruxelles, rapporteur interne)

Guillaume OLDENHOVE (Université libre de Bruxelles, rapporteur interne)

Gilles KAUFFENSTEIN (Université de Strasbourg, expert externe)

Danièle NOEL (Institut de Médecine Régénératrice et Biothérapies, Montpellier, experte externe)



TABLE DES MATIERES

I.	INTRODUCTION	1
1.	LA SIGNALISATION DES NUCLÉOTIDES EXTRACELLULAIRES	1
1.1	<i>La découverte des récepteurs aux nucléotides extracellulaires</i>	1
1.2	<i>Les mécanismes de relargage des nucléotides</i>	2
1.2.1	Le relargage par lyse cellulaire	2
1.2.2	Le relargage par vésicules d'exocytose.....	2
1.2.3	Les relargages par des canaux.....	2
1.3	<i>Le métabolisme des nucléotides extracellulaires par les ectonucléotidases</i>	3
1.3.1	Les nucléosides triphosphates diphosphohydrolases	3
1.3.2	Les nucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases.....	3
1.3.3	Les phosphatases alcalines.....	4
1.3.4	Les 5'-Nucléotidases	4
1.4	<i>Les récepteurs aux nucléotides/ nucléosides extracellulaires</i>	4
1.4.1	Les récepteurs P2Xs	4
1.5	<i>Les récepteurs P2Ys</i>	5
1.5.1	Considérations générales des récepteurs P2Ys.....	5
1.5.2	La signalisation des récepteurs P2Ys	5
1.5.2.1	La voie canonique dépendant des protéines G	6
1.5.2.2	La voie alternative dépendant des β -arrestines.....	7
1.5.2.3	L'oligomérisation des récepteurs P2Ys.....	8
1.5.2.4	Autres paramètres intervenant dans la signalisation des récepteurs P2Ys.....	8
1.5.3	La distribution des récepteurs P2Ys et leurs rôles physio-pathologiques	9
1.5.3.1	Les récepteurs P2Ys et le tissu adipeux.....	9
1.5.3.2	Les récepteurs P2Ys et la physiologie des os.....	9
1.5.4	Le potentiel thérapeutique des récepteurs P2Ys	10
2.	LES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES MULTIPOTENTES	12
2.1	<i>Les cellules souches : généralités</i>	12
2.2	<i>Les critères définissant les cellules stromales mésenchymateuses multipotentes</i>	13
2.3	<i>La multipotentialité des MSCs</i>	13
2.3.1	La différenciation adipogénique	13
2.3.2	La différenciation ostéoblastogénique	15
2.3.3	La balance entre l'adipogénèse et l'ostéoblastogénèse	20
2.4	<i>Les différenciations pathologiques des MSCs</i>	20
2.4.1	La calcification vasculaire.....	21
2.4.2	L'adipogénèse incontrôlée des os : l'ostéoporose	22
2.5	<i>La communication intercellulaire entre les MSCs et les macrophages</i>	22
2.6	<i>Le potentiel thérapeutique des MSCs : la médecine régénérative</i>	24
2.7	<i>Les cellules stromales multipotentes du tissu adipeux (ATMSCs)</i>	25
3.	LA SIGNALISATION DES NUCLÉOTIDES EXTRACELLULAIRES DANS LA BIOLOGIE DES CELLULES STROMALES MULTIPOTENTES	26
3.1	<i>L'influence des nucléotides extracellulaires sur la biologie des MSCs</i>	26
3.2	<i>La contribution des ectonucléotidases aux mécanismes de différenciation des MSCs</i>	26
3.3	<i>L'implication des récepteurs P2Ys dans la régulation de la différenciation des MSCs</i>	26
II.	BUT DU TRAVAIL	28
III.	RESULTATS	29
1.	CARACTERISATION DU MODELE EXPERIMENTAL DES ATMSCs	29
1.1	<i>Culture cellulaire</i>	29
1.2	<i>Caractérisation des cellules amplifiées en termes de « cluster of differentiation »</i>	29
1.3	<i>Potentiel de différenciation des cellules amplifiées</i>	29
1.3.1	Adipogénèse des cellules amplifiées.....	30
1.3.2	Ostéoblastogénèse des cellules amplifiées.....	30
1.4	<i>Conclusion</i>	32
2.	ETUDES SYSTEMATIQUES DES RECEPTEURS P2Y ₂ ET P2Y ₆ DANS LES PROCESSUS DE DIFFERENCIATION ADIPOGENIQUE ET OSTEOBLASTOGENIQUE DES ATMSCS	33
2.1	<i>Expression et fonctionnalité des récepteurs P2Ys dans les ATMSCs</i>	33
2.2	<i>Étude du P2Y₂R dans la différenciation des ATMSCs</i>	34
2.2.1	Rôle du P2Y ₂ R dans l'adipogénèse.....	34
2.2.1.1	Conclusion	35
2.2.2	Rôles du P2Y ₂ R dans l'ostéoblastogénèse.....	35
2.2.2.1	Comparaison des transcriptomes d'ATMSCs WT <i>vs.</i> P2Y ₂ R ^{-/-}	36

2.2.2.2	Conclusion	37
2.3	Étude du P2Y ₆ R dans la différenciation des <i>ATMSCs</i>	38
2.3.1	Rôle du P2Y ₆ R dans l'adipogénèse.....	38
2.3.1.1	Comparaison de l'expression des messagers codant les marqueurs d'adipogénèse précoces et tardifs entre les <i>ATMSCs</i> WT et P2Y ₆ R ^{-/-}	38
2.3.1.2	Rôle <i>in vivo</i> du P2Y ₆ R dans la physiologie du tissu adipeux	39
2.3.1.3	Quantification de la proportion de tissu adipeux par μ CT scan	39
2.3.1.4	Suivi de la prise de poids des souris P2Y ₆ R ^{-/-} <i>vs.</i> WT sous régime riche en graisse.....	40
2.3.1.5	Expression des marqueurs d'adipogénèse et de MSCs dans les FVS SAT et PGAT isolées de souris WT <i>vs.</i> P2Y ₆ R ^{-/-}	40
2.3.1.6	Conclusion	41
2.3.2	Étude du P2Y ₆ R dans l'ostéoblastogénèse.....	41
2.3.2.1	Comparaison de l'expression des facteurs de minéralisation entre les <i>ATMSC</i> <i>vs.</i> P2Y ₆ R ^{-/-}	42
2.3.2.2	Conclusion	42
3.	ROLES DES RECEPTEURS P2Y ₂ ET P2Y ₆ DANS LA TRANSDIFFERENCIATION DES VSMCS EN CELLULES MINERALISANTES.....	43
3.1	Caractérisation du modèle cellulaire des <i>VSMCs</i>	43
3.2	Effet de l'activation pharmacologique des P2Y ₂ R et P2Y ₆ R sur la capacité de minéralisation des <i>VSMCs</i>	44
3.3	Effet de l'inactivation des P2Y ₂ R et P2Y ₆ R sur la capacité de minéralisation des <i>VSMCs</i>	44
3.4	Effet <i>in vivo</i> de l'inactivation du P2Y ₆ R sur l'accumulation de calcification artérielle (modèle vitamine D3).....	44
3.5	Conclusion.....	45
4.	LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE ENTRE LES <i>ATMSCS</i> ET LES MACROPHAGES.....	46
4.1	Effet inhibiteur des macrophages sur la capacité de différenciation adipogénique et ostéoblastogénique des <i>ATMSCs</i>	46
4.2	Changement phénotypique des macrophages en présence des <i>ATMSCs</i>	46
4.3	Conclusion.....	47
IV.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	48
1.	CARACTÉRISATION DE LA SIGNALISATION DÉPENDANT DE P2Y ₂ R ET DE P2Y ₆ R DANS LES <i>ATMSCS</i>	48
2.	LE P2Y ₆ R SEMBLE POSITIVEMENT CONTRIBUER À L'ADIPOGÉNÈSE <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i>	48
3.	LE P2Y ₂ R CONTRIBUE POSITIVEMENT À L'OSTÉOBLASTOGÉNÈSE DES <i>ATMSCS</i>	50
4.	LE P2Y ₆ R EST UN RÉGULATEUR NÉGATIF DE LA MINÉRALISATION DES <i>ATMSCS</i>	52
5.	LES P2Y ₂ R ET P2Y ₆ R CONTRIBUENT POSITIVEMENT À LA CAPACITÉ DE MINÉRALISATION DES <i>VSMCS</i>	53
6.	L'ATP γ S INHIBE LA MINÉRALISATION DES <i>ATMSCS</i> ET DES <i>VSMCS</i>	54
7.	LES MACROPHAGES INHIBENT LA CAPACITÉ DE DIFFÉRENCIATION DES <i>ATMSCS</i>	55
8.	LES <i>ATMSCS</i> INDUISENT DES CHANGEMENTS PHÉNOTYPIQUES CHEZ LES MACROPHAGES	56
9.	AUTRES PERSPECTIVES	58
V.	CONCLUSION.....	60
VI.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	61
1.	ÉLEVAGE DES SOURIS ET ÉTHIQUE	61
2.2	Traitement adipogénique des <i>ATMSCs</i> (« DII »).....	61
2.3	Traitement ostéoblastogénique des <i>ATMSCs</i> (« RGA »).....	61
3.	CULTURE DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES VASCULAIRES (« <i>VSMCS</i> »).....	61
3.1	Isolement et culture des <i>VSMCs</i>	61
3.2	Traitement minéralisant des <i>VSMCs</i>	62
4.	CULTURE DES MACROPHAGES	62
4.1	Co-culture d' <i>ATMSCs</i> et macrophages.....	62
4.2	Culture des macrophages en milieu conditionné- <i>ATMSCs</i>	62
5.	CRYO-PRÉSERVATION DES CELLULES	62
6.	CARACTÉRISATION DES MSCS PAR CYTOMÉTRIE EN FLUX	62
7.	QUANTIFICATION DE LA DIFFÉRENCIATION ADIPOGÉNIQUE.....	63
7.1	Coloration Nile Red.....	63
7.2	Coloration Bodipy.....	63
8.	QUANTIFICATION DE LA DIFFÉRENCIATION OSTÉOBLASTOGÉNIQUE.....	63
8.1	Coloration QUANTI-Blue TM	63
8.2	Coloration Alizarin Red.....	63
9.	ANALYSES D'EXPRESSION DE GÈNE	63
9.1	Extraction d'ARN.....	63
9.2	Traitement « DNase » et reverse transcription (RT)	63
9.3	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	64
9.4	Réaction de polymérisation en chaîne (qPCR).....	64

10.	FONCTIONNALITÉ DES P2Y ₂ R ET P2Y ₆ R : ÉTUDE DE LA VOIE DES MAPKS (MARQUEURS ERK _{1/2}).....	64
10.1	<i>Préparation et stimulation pharmacologique des cultures</i>	64
10.2	<i>Extraction de protéines</i>	64
10.3	<i>Dosage protéique</i>	64
10.4	<i>Électrophorèse (SDS-PAGE), transfert et immunodétection</i>	64
11.	GÉNÉRATION, RECONSTRUCTION ET ANALYSE DES IMAGES RADIOLOGIQUES PAR MICRO-CT SCAN.....	65
12.	NUTRITION HIGH FAT DIET.....	65
13.	CALCIFICATION AORTIQUE.....	66
13.1	<i>Traitement vitamine D3</i>	66
13.2	<i>Dosage du calcium aortique</i>	66
13.3	<i>Dosage protéique</i>	66
14.	QUANTIFICATION DE LA PROLIFÉRATION DES MACROPHAGES (LIVE IMAGING).....	66
15.	CARACTÉRISATION DU MÉTABOLISME DES MACROPHAGES (LIVE IMAGING).....	66
16.	MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE À BALAYAGE DE CULTURES DE MACROPHAGES.....	66
17.	RNA SEQUENCING ET ANALYSES BIOINFORMATIQUES.....	67
18.	ANALYSES STATISTIQUES.....	67
VII.	ANNEXES	72
VIII.	PUBLICATIONS	101
IX.	RÉFÉRENCES	103