



Implication de LRP1 et ShcA dans deux pathologies cardiovasculaires : l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque

Mohamed Mlih

► To cite this version:

Mohamed Mlih. Implication de LRP1 et ShcA dans deux pathologies cardiovasculaires : l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ086 . tel-01089539

HAL Id: tel-01089539

<https://theses.hal.science/tel-01089539>

Submitted on 2 Dec 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de Strasbourg

UMR7213 : Laboratoire de Biophotonique et de Pharmacologie

THÈSE

Présentée par :

Mohamed MLIH

Soutenue le : **29 Novembre 2012**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Sciences du vivant :

Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

**Implication de LRP1 et ShcA dans deux
pathologies cardiovasculaires :
l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque**

THÈSE dirigée par :

Pr BOUCHER Philippe

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Pr COLLET Xavier

Pr HENRIET Patrick

Directeur de Recherche, I2MC, Toulouse

Professeur, Université de Louvain

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Pr STAELS Bart

Dr. METZGER Daniel

Dr. MATZ-WESTPHAL Rachel

Professeur, Institut Pasteur de Lille

Directeur de Recherche, IGBMC, Illkirch

Maître de Conférences, Université de Strasbourg

**Qui veut faire quelque chose trouve un moyen ; qui ne veut rien faire
trouve une excuse.**

Remerciements

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Xavier Collet, Monsieur le Professeur Patrick Henriët, Monsieur le Professeur Bart Steals et Monsieur le Docteur Daniel Metzger d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. J'en suis très honoré.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur le Professeur Philippe Boucher de m'avoir accueilli dans son équipe et d'avoir accepté de diriger mon travail de thèse. Je tiens également à vous remercier de la confiance et du soutien sans faille que vous m'avez apporté.

Je remercie bien sûr Madame le Docteur Rachel Matz-Westphal, de m'avoir accepté dans son chic projet et d'avoir encadré la grande majorité de mon travail de thèse. Je la remercie pour son investissement dans la correction du manuscrit et la préparation de la soutenance. J'ai beaucoup apprécié ta disponibilité, ton écoute et tes conseils dans toutes les épreuves que j'ai rencontrées pendant cette thèse.

Je remercie Madame le Docteur Véronique Bruban qui m'a encadré durant la première année de ma thèse. Je te remercie pour ton écoute, ta disponibilité et de la confiance que tu m'as accordée. Je me rappellerai aussi des moments amusants Madame le Docteur Calimero Des GelsquiBullent.

Je souhaite également à remercier les membres de l'équipe. Monsieur le Docteur Jérôme Terrand pour avoir toujours pris le temps de répondre à toutes mes questions quand la science n'était encore pour moi qu'une chimère. Je remercie Madame Sophie Foppolo, merci de m'avoir initié aux techniques qui m'ont permis d'avancer dans ma thèse et je te remercie également pour le temps que tu as pris pour relire ma thèse. Je remercie également Madame le Docteur Zeina El Asmar pour son soutien et toutes les conversations que l'on a eues et qui m'ont permis de relativiser sur ma thèse. Je remercie le Duo de Choc Fanny et Lionel (Madame le Docteur Fanny Coudane et Monsieur le Docteur Lionel Host ... pour ne froisser personne). C'était super de travailler avec vous et merci pour le soutien à la fin de ma thèse. Je tiens également à remercier et souhaiter bonne chance à Marion Jenty. Je remercie également l'ensemble des stagiaires que j'ai pris plaisir à encadrer et qui ont tous fournis d'énormes efforts pour faire avancer mon projet de thèse.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont permis d'avancer dans mon travail de thèse : Particulièrement Madame le Docteur Sophie Martin pour sa disponibilité même quand je devenais très envahissant avec toutes mes questions existentielles. Madame

Nathalie Schallon pour sa bonne humeur et son super travail. Je remercie également l'ensemble du personnel de l'animalerie.

Je remercie également mes colocataires de bureau Anne-Marie, Hanna et Anne-Flo qui ont apporté la joie et la bonne humeur. Une spéciale dédicace à Madame le Docteur Erika Cosset, travailler avec toi m'a permis de me sentir moins seul au labo les soirs et les weekends. J'ai beaucoup apprécié ta joie, « ton feu sacré » et ton regard critique sur mon travail. Je remercie également l'ensemble des Doctorants de l'UMR 7213 qui ont partagés cette aventure qu'est la thèse avec moi. Je remercie bien sur l'ensemble de l'équipe Dontenwill.

Merci à l'ensemble de ceux qui m'ont supporté durant cette thèse. Merci à Ingrid et Marlyse, l'efficacité à l'état pure. Merci à Cyril Auger et Nelly Etienne et Fanny Noulet pour leurs précieux conseils scientifiques. Je remercie également, Evelyne, Brigitte, Tania, Hélène, Ludo pour leur disponibilité.

Je tiens également à remercier le Docteur Nathalie Niedderoffer et le Docteur Thierry Chataigneau de m'avoir initié aux enseignements en pharmacologie. Enseigner avec vous était une bulle d'oxygène dans l'océan qu'est la thèse.

Je remercie bien sûr l'ensemble des chercheurs qui ont participé à ce travail de thèse, Madame le docteur Nadia Messadeq, le professeur Monassier.

Je remercie bien évidemment ma famille, ma mère pour m'avoir motivé à faire une thèse, mon père pour son soutien et ses précieux conseils pour la soutenance : « tu sais le jury il est comme toi, ils ont une paire d'oreilles et une paire d'yeux, rien de bien effrayant ». A mes sœurs : Salka et Elbatoul qui ont été très présentes durant toute cette aventure et à mes frères.

Liste des abréviations.

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
Apo : Apoprotéine
ALP : Alkaline phosphatase
ATG : Adénine Thymine Guanine
ATP : Adénosine Triphosphate
AVC : Accident Vasculaire Cérébral
Bande A : Bande Anisotrope
Bande I : Bande Isotrope
BMP : Bone Morphogenetic Protein
BSA : Bovine Serum Albumin
Cart1 : Cartilage homeo protein 1
CH1 : Collagen Homology I
CMLV : Cellule Musculaire Lisse Vasculaire
C-Terminal : terminaison carboxyle
Dkk : Dickkopf
Dsh : Dishevelled
E7.3 : Embryon de 7.5 jours
E14,5 : Embryon de 14.5 jours
E18,5 : Embryon de 18.5 jours
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFr : Epidermal Growth Factor receptor
Erk : Extracellular signal-regulated kinase
FAK : Focal Adhesion Kinase
FGF : Fibroblast Growth Factor
GAPDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GRB2 : Growth factor Receptor-Bound protein 2
GSK-3 : Glycogen Synthase Kinase 3
IGF-1 : Insulin-like Growth Factor I
IGF-1r : Insulin-like Growth Factor I receptor
KI : knock-in
KO : knock-out
LDL : Low Density Lipoprotein
LDLr : Récepteur des LDLs
LEF : Lymphoid enhancer factor
LRP : Low density lipoprotein Receptor-related Protein
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MEF : Mouse Embryonic Fibroblast
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
N-Terminal : terminaison amine
P32 : Phosphore 32
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PDGFr : Platelet-Derived Growth Factor receptor
Pi : Phosphate inorganique

Pi3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPRE : PPAR Responsive Element
PTB : Phosphotyrosin-binding
RUNX2 : Runt-related transcription factor 2
RYR 2 : Ryanodine Receptor 2
RXR : Retinoid X Receptor
SERCA2A : Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase type 2 A
ShC: Src homology and collagen A
SFRP : Secreted Frizzled Related Protein
SH2 : Src homology 2
SiARN : small interfering Acide Ribonucléique
Sm : smooth muscle
SOS : Son of Sevenless protein
Sox9 : SRY (sex determining region Y)-box TCF : T Cell Factor 9
Src : growth sarcoma oncogene
TGFβ : Transforming Growth Factor beta
TGFβRV : Récepteur α V du TGF
TK: Tyrosine Kinase
TnC : Troponine C
TnI : Troponine I
TnT : Troponine T
Tubule T : Tubule Transverse
VD : Ventricule Droit
VG : Ventricule Gauche
VLDL : Very Low Density Lipoprotein
VLDLr : Very Low Density Lipoprotein Receptor
WIF : Wnt Inhibitory Factor

Table des matières

Remerciements.....	2
Liste des abréviations.....	4
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures.....	9
Liste des annexes.....	11
Introduction.....	12
Première partie Implication de ShcA dans l'insuffisance cardiaque.....	16
1. Le système cardiovasculaire.....	17
1.1. Le Cœur.....	17
1.1.1. Anatomie du cœur sain.....	17
1.1.2. Fonctionnement du cœur.....	18
1.1.3. Les cellules qui composent le cœur.....	19
1.1.4. Le sarcomère.....	23
1.2. Les différents types d'insuffisance cardiaque.....	27
1.3 Les causes des cardiomyopathies.....	29
1.3.1 Les mutations induisant une cardiomyopathie.....	29
2. Src homology and collagen protein A (ShcA).....	31
2.1. ShcA.....	32
2.2. L'isoforme p66 de ShcA.....	34
2.3. ShcA dans le cœur.....	35
Objectif.....	37
Matériel et Méthodes.....	38
3. Matériel et méthodes.....	39
3.1. Modèle Animal.....	39
3.1.1. Génération des souris déficientes en ShcA tissu spécifique.....	39
3.2. Caractérisation Phénotypique.....	39
3.2.1. Génotypage.....	39
3.2.2. Analyse transcriptionnelle.....	41
3.2.3. Analyse Protéique.....	42
3.2.4. Phosphorylation in vitro des domaines Zis1 et Zis5 de titine.....	44
3.2.5. Histologie.....	47
3.2.6. Microscopie électronique.....	48
3.2.7. Immunomarquage.....	48
3.2.8. Mesure des paramètres hémodynamiques de la souris.....	49

Résultats	52
4. Résultats	53
4.1. Caractérisation phénotypique des souris déficientes en ShcA dans le cœur.....	53
4.1.1. Génération des souris déficientes en ShcA dans le cœur	53
4.1.2. Caractérisation phénotypique vasculaire des souris SmShcA-	58
4.1.3. Caractérisation phénotypique cardiaque des souris SmShcA-.....	60
4.1.4. Caractérisation des paramètres hémodynamiques.....	62
4.1.5. Histologie des cœurs de souris SmShcA-	64
4.1.6. Histologie des cœurs d'embryon de souris SmShcA-.....	70
4.2. Voies de signalisation de ShcA dans le cœur.....	72
4.2.1. Voies de signalisation des MAPkinase et AKT/mTOR dans le cœur des souris SmShcA-72	
4.2.2. Rôle de ShcA dans l'expression des protéines du sarcomère	73
4.2.3. Implication de ShcA dans les jonctions cellulaires.....	75
4.3. Hypothèses mécanistiques.....	79
Discussion et Perspectives	80
5. Discussion et Perspectives	81
Deuxième partie Rôle : de LRP1 dans la calcification vasculaire	86
6. L'athérosclérose et ses complications	87
6.2. Physiologie de la paroi vasculaire	87
6.3. Physiopathologie de l'athérosclérose.....	88
6.4. La calcification vasculaire.....	90
6.4.1. Mécanismes impliqués dans la calcification des plaques d'athérome	90
6.4.2. LRP1 dans l'athérosclérose	92
6.4.3. PPAR gamma dans l'athérosclérose	93
Objectifs	95
Article.....	96
Discussions et Perspectives	106
7. Discussions et Perspectives.....	113
Bibliographie	115
8. Bibliographie	116
Annexes	123

Liste des tableaux

Tableau 1 : Cardiomyopathies : causes génétiques et conséquences d'après (Harvey and Leinwand, 2011) <i>modifié</i>	29
Tableau 2 : Classification des lésions athéroscléreuses selon (Stary et al., 1995).....	89

Liste des figures

Figure 1 : Représentation anatomique du cœur (image Servier Medical Art)	17
Figure 2 : Représentation des tuniques qui constituent le cœur (image Servier Medical Art).	18
Figure 3 : Système de conduction du cœur (image Servier Medical Art).....	20
Figure 4 : Structure du sarcolème..	21
Figure 5 : Organisation du cardiomyocyte (Goldstein and Entman, 1979)	22
Figure 6 : Organisation des sarcomères (Lee et al., 2007).....	23
Figure 7: Structure des filaments fins d'après (Gordon et al., 2000)	24
Figure 8 : Organisation de la Myosine	25
Figure 9 : Contraction glissement des filaments fins sur les filaments épais.....	26
Figure 10 : Structure et ultrastructure du sarcomère.	27
Figure 11 : Les voies de signalisation impliquées dans l'insuffisance cardiaque (Mudd and Kass, 2008).....	30
Figure 12 : Architecture des protéines Shc d'après (Wills and Jones, 2012) <i>modifié</i>	32
Figure 13 : Les différentes voies d'activation de ShcA	33
Figure 14 : Détermination du génotype des souris SmShcA-.	54
Figure 15 : Excision de ShcA dans le cœur à E14,5, E18,5 et 3 mois.	55
Figure 16 : Expression de ShcA dans les cellules musculaires lisses vasculaires..	57
Figure 17 : Histologie des aortes de souris SmShcA-.	58
Figure 18 : Réactivité vasculaire des souris SmSchA-.	59
Figure 19 : Manifestation de l'insuffisance cardiaque chez les souris SmShcA-.	60
Figure 20 : Cardiomégalie des souris de 9 mois SmShcA-.	61
Figure 21 : Cœurs des souris de 3 mois SmShcA- et contrôle (WT).....	61
Figure 22 : Pression artérielle systolique des souris Sm22ShcA-.	62
Figure 23 : Dilatation des ventricules des souris SmShcA-	63
Figure 24 : Perte de la contractilité des souris SmShcA-.	63
Figure 25: Dilatation ventriculaire.	64
Figure 26 : Organisation du myocarde ventriculaire.....	65
Figure 27 : Absence de fibrose chez les souris SmShcA-.	66
Figure 28 : Hypertrophie et désorganisation des cardiomyocytes des souris SmShcA-.	68
Figure 29 : Dilatation des mitochondries dans le cœur des souris SmShcA-.	68
Figure 30 : Désorganisation des sarcomères dans les cardiomyocytes des souris SmShcA-. .	69
Figure 31: Dégénérescence du myocarde des embryons à E18,5..	70
Figure 32 : Désorganisation précoce des sarcomères dans les cardiomyocytes des souris SmShcA-.	71

Figure 33 : Voies de signalisation mises en jeu par ShcA dans le cœur.....	72
Figure 34: Pas de différence d'expression de titine dans les lysats de cœur de souris SmShcA-	73
Figure 35: Absence de différence de phosphorylation des domaines Zis1 et Zis5 de titine....	74
Figure 36 : Augmentation de l'expression de la téléthonine dans le cœur des Souris SmShcA-	75
Figure 37 : Organisation du disque intercalaire des souris SmShcA-.....	76
Figure 38 : Désorganisation des costamères chez les embryons de souris à E18,5.	77
Figure 39 : Membrane latérale des cardiomyocytes des souris SmShcA-.....	78
Figure 40 : Implication de ShcA dans l'organisation du costamère.	79
Figure 41 : Structure des artères de large calibre (image Servier Medical Art).....	88
Figure 42 : Genèse de la formation de la plaque d'athérome (Libby, 2002)	89
Figure 43: Etapes de la chondrogenèse.	91
Figure 44 : La famille des récepteurs LDL d'après (Lillis et al., 2008).....	93

Liste des annexes

Annexes 1 :	124
<i>LRP1 et ShcA dans la régulation de la voie de la différenciation adipocytaire par l'IGF-1</i> <i>récepteur :</i>	124

Introduction

Les maladies cardiovasculaires sont les premières causes de mortalité dans le monde. D'après les chiffres publiés par l'OMS en 2012, elles représentent 48% des causes de mortalité non infectieuse dans le monde. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques est nécessaire pour optimiser les traitements actuels. Durant ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à deux pathologies cardiovasculaires : l'insuffisance cardiaque et la calcification des plaques d'athérosclérose, une des complications de l'athérosclérose.

L'insuffisance cardiaque est une pathologie qui touche un muscle essentiel de l'organisme, le cœur. Les causes de l'insuffisance cardiaque sont variées allant de mutations qui touchent certains gènes essentiels à la contraction cardiaque, aux conséquences d'une hypertension ou d'une obstruction des coronaires. A ces causes variées correspondent différentes expressions de cardiomyopathies. Récemment, une protéine adaptatrice nommée ShcA a été identifiée comme jouant un rôle majeur au niveau du système cardiovasculaire. ShcA pour Src homology and collagen homology A comprend trois isoformes p46, p52, p66. Elle joue un rôle essentiel dans la transduction du signal intracellulaire initié par les intégrines et les récepteurs à activité tyrosine kinase tels que l'IGF-1r, l'EGFr et le PDGFr. ShcA est impliquée dans différents processus tels que la prolifération, la survie et la différenciation cellulaires. Au niveau du système cardiovasculaire, ShcA joue un rôle majeur au cours de l'embryogenèse. En effet, la délétion de ShcA est létale très tôt au cours de l'embryogenèse à E11,5 ce qui est dû, entre autres, à des anomalies dans l'organogenèse du cœur. Dans ce contexte, la première partie de ce travail de thèse s'est intéressée à l'étude du rôle de ShcA dans la fonction cardiaque.

La deuxième partie de ce travail de thèse s'est intéressée à la compréhension des mécanismes impliqués dans la calcification des plaques d'athérome. Récemment, un récepteur important a été identifié comme jouant un rôle dans la physiopathologie de l'athérosclérose : LRP1.

La calcification des plaques d'athérome est une complication fréquente associée à des risques élevés d'infarctus. La calcification vasculaire fait intervenir des processus complexes de minéralisation et certains facteurs de transcription également impliqués lors de l'ossification endochondrale et membranaire comme Sox9 et Cart1. L'ossification endochondrale fait intervenir la famille des protéines Wnts qui sont des glycoprotéines sécrétées dont Wnt5a fait partie. Wnt5a est bien connu pour jouer un rôle dans la différenciation chondrogénique. De

plus, l'absence de Wnt5a chez la souris induit une grave malformation du squelette. Récemment, nous avons identifié un récepteur membranaire, le low density protein receptor-related protein 1 (LRP1) comme étant un récepteur interagissant avec la voie canonique de Wnt5a. En effet, la présence de LRP1 protège de l'accumulation de cholestérol intracellulaire en induisant l'expression de Wnt5a dans les fibroblastes embryonnaires de souris. Par ailleurs, LRP1 joue un rôle protecteur dans l'athérosclérose. En effet, les souris déficientes en LRP1 spécifiquement dans les cellules musculaires lisses (SmLRP1-) développent plus de plaques d'athérome que les souris sauvages. Ce phénotype est corrigé par le traitement des souris à la rosiglitazone, un agoniste de PPAR γ . Ces résultats suggèrent une interaction entre LRP1 et PPAR γ . PPAR γ est un récepteur nucléaire impliqué dans les processus de différenciation. Il joue un rôle d'activateur de la différenciation adipocitaire et d'inhibiteur de la chondrogenèse. Même si plusieurs gènes ont déjà été impliqués dans le programme d'ossification, les mécanismes moléculaires, les voies de signalisation et de régulation impliqués dans ce processus et au cours de la calcification des plaques d'athérome restent encore mal connus.

Dans ce contexte, la deuxième partie de ce travail de thèse s'est intéressée à la compréhension des mécanismes impliquant LRP1, Wnt5a et PPAR γ dans la calcification des plaques d'athérome.

Première partie

Implication de ShcA dans l'insuffisance
cardiaque

1. Le système cardiovasculaire

1.1. Le Cœur

Le cœur joue un rôle essentiel dans la régulation du flux sanguin, il permet de faire circuler le sang dans tout le corps dans un sens bien précis. Il peut réguler le débit sanguin en fonction des besoins de l'organisme.

1.1.1. Anatomie du cœur sain

Le cœur est divisé en deux grâce au septum et chaque partie est elle-même divisée en deux chambres pour former les ventricules et les oreillettes (Figure 1). Pour permettre la circulation du sang dans un sens unique les oreillettes et ventricules communiquent grâce à des valves qui s'ouvrent et se ferment en fonction de l'état de contraction du cœur ce qui empêche le sang de refluer.

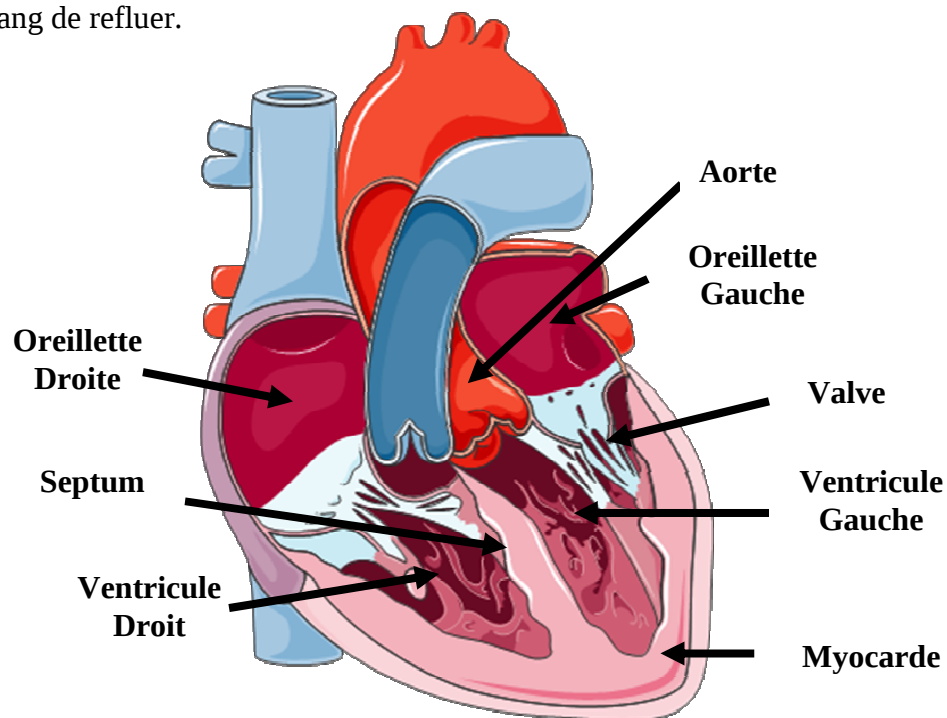


Figure 1 : Représentation anatomique du cœur (image Servier Medical Art)

Le cœur est un muscle constitué de trois enveloppes : le péricarde, le myocarde et l'endocarde. Le péricarde est l'enveloppe externe du cœur, il est constitué de deux feuillets :

le feuillet viscéral qui adhère au myocarde et que l'on appelle l'épicarde, et l'autre pariétal. Le myocarde est principalement constitué de cellules musculaires et permet la contraction du cœur. L'endocarde est la mince couche qui tapisse la face interne du cœur, elle est constituée de cellules endothéliales (Figure 2).

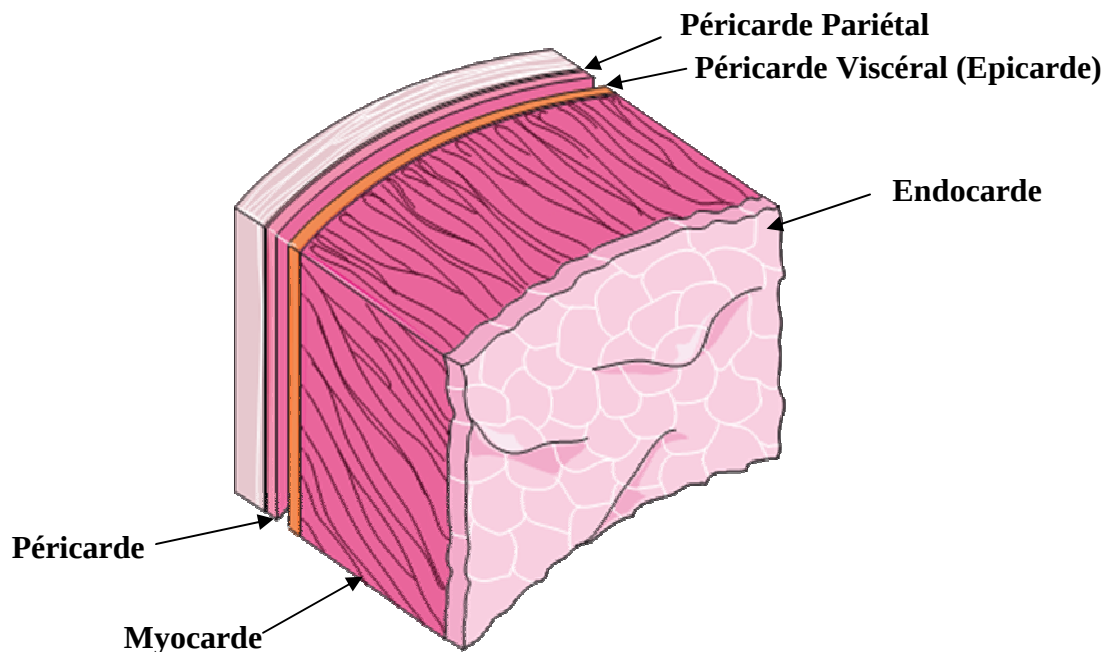


Figure 2 : Représentation des tuniques qui constituent le cœur (image Servier Medical Art).

1.1.2. Fonctionnement du cœur

Le cœur permet d'expulser le sang dans les vaisseaux grâce à des cycles de contraction et de relaxation. La contraction du muscle cardiaque est appelée systole. Durant la systole les ventricules se contractent ce qui permet d'expulser le sang dans les artères. Le ventricule gauche se vide dans l'aorte alors que le ventricule droit se vide dans l'artère pulmonaire. L'augmentation de la pression sanguine lors de l'expulsion du sang est appelée pression systolique. La relaxation du muscle cardiaque est appelée diastole. Pendant la diastole le cœur se remplit de sang, c'est à ce moment que l'on peut déterminer la pression diastolique. La fraction d'éjection est caractérisée par la différence entre le volume diastolique c'est-à-dire le volume du ventricule gauche pendant la diastole et le volume systolique c'est-à-dire le volume du ventricule gauche après la systole.

1.1.3. Les cellules qui composent le cœur

Le myocarde est constitué principalement de deux types de cellules, les cellules musculaires myocardiques qui sont majoritaires, les cellules cardionectrices qui permettent de générer et conduire le potentiel d'action. Ces deux types cellulaires jouent des rôles totalement différents mais essentiels au bon fonctionnement du cœur. Les cellules cardionectrices ont une fonction de conduction alors que les cellules musculaires ont un rôle de contraction (Miquerol et al., 2011).

1.1.3.1. Le système de conduction du cœur.

Les cellules cardionectrices forment un système organisé au sein du cœur afin de permettre une propagation du potentiel d'action de façon coordonnée. L'activité électrique du cœur est générée par des cellules pacemaker localisées dans le nœud sino-auriculaire (ou nœud sinusal) situé dans la région dorsale de l'oreillette droite. L'activité électrique se propage rapidement dans les deux oreillettes conduisant à leur contraction. Pour propager le potentiel d'action au sein des ventricules, le potentiel d'action emprunte le système de conduction Auriculo-ventriculaire. Cela commence par la convergence de l'activité électrique initiée par le nœud sinusal au niveau du nœud auriculo-ventriculaire. L'activité électrique se propage rapidement vers l'apex des ventricules grâce au système de conduction ventriculaire qui est constitué du faisceau de His qui se sépare en deux branches : la branche droite et gauche de His. Ces dernières vont se séparer en un réseau de fibres appelé fibres de Purkinje (Miquerol et al., 2011) (figure3).

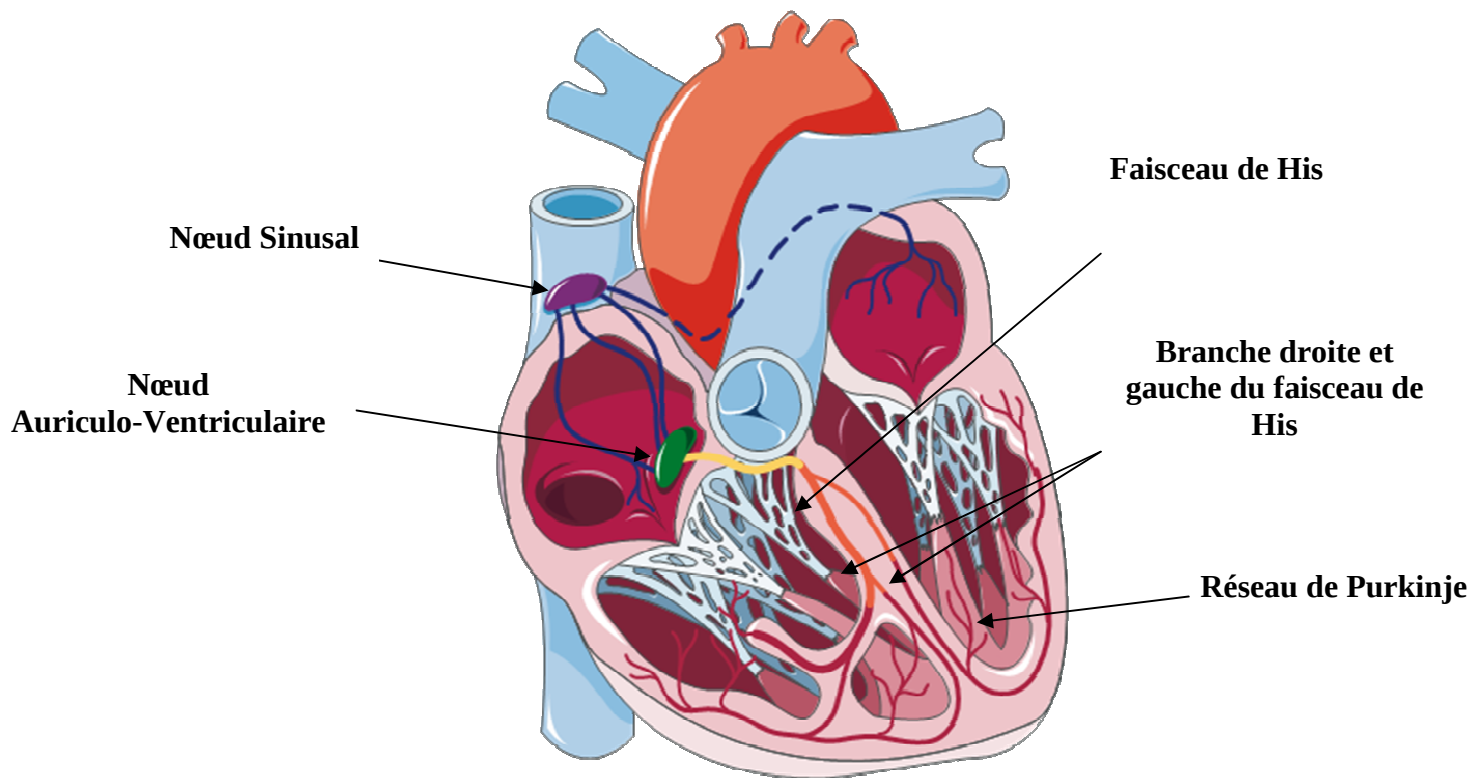


Figure 3 : Système de conduction du cœur (image Servier Medical Art).

Les cellules qui composent le système de conduction du cœur ont la même origine que les cardiomyocytes (Cheng et al., 1999), cependant elles se différencient des cardiomyocytes par leur cytoplasme pauvre en fibres contractiles.

1.1.3.2. Le cardiomyocyte

Le cardiomyocyte est la cellule contractile du cœur. Il est constitué d'une membrane plasmique appelée sarcolème qui joue un rôle essentiel dans la transmission du potentiel d'action, dans la communication entre cellules et également dans la jonction entre le cardiomyocyte et la matrice extracellulaire. Respectivement ces structures correspondent au **tubule transversal** (tubule T), au **disque intercalaire** et aux **costamères** (Balse et al., 2012) (figure 4, figure 5).

Les Tubules T sont des invaginations du sarcolème qui sont riches en canaux ioniques et en protéines impliquées dans le couplage excitation-contraction. Lors de la dépolarisation du sarcolème, il y a ouverture des canaux calciques de type L présents sur le sarcolème qui vont conduire à la libération du calcium retenu dans le réticulum sarcoplasmique. Ceci est rendu possible grâce à l'étroite association des tubules T et du réticulum sarcoplasmique (Ibrahim et al., 2011).

Le disque intercalaire permet la communication entre les myocytes. On retrouve plusieurs types de jonction : jonctions adhérentes, gaps jonctions et desmosomes. Le disque

intercalaire permet la propagation rapide du potentiel d'action et l'étirement du cardiomyocyte, il joue également un rôle mécanique afin d'assurer la cohésion au sein du myocarde.

Les costamères connectent les protéines associées à la bande Z des sarcomères et la matrice extracellulaire. Ils ont comme rôle de transmettre la force mécanique durant les phases de systole et de diastole du cœur (Balse et al., 2012). Deux principaux complexes protéiques sont impliqués dans le costamère, le complexe intégrine-taline-vinculine et les complexes sarcoglycane-dystroglycane-dystrophine. Les intégrines sont des hétérodimères composés d'une sous-unité alpha et une beta. Les intégrines exprimées dans le cœur sont les intégrines α -3B, α -6A, α -6B, α -7B, α -7C, α -7D et α -11 et les sous-unités β -1A, β -1D, β -3 et β -5. Au niveau de la partie intracellulaire, les intégrines peuvent se lier à différentes protéines du cytosquelette et du sarcomère comme l'actine, l' α -actinine...

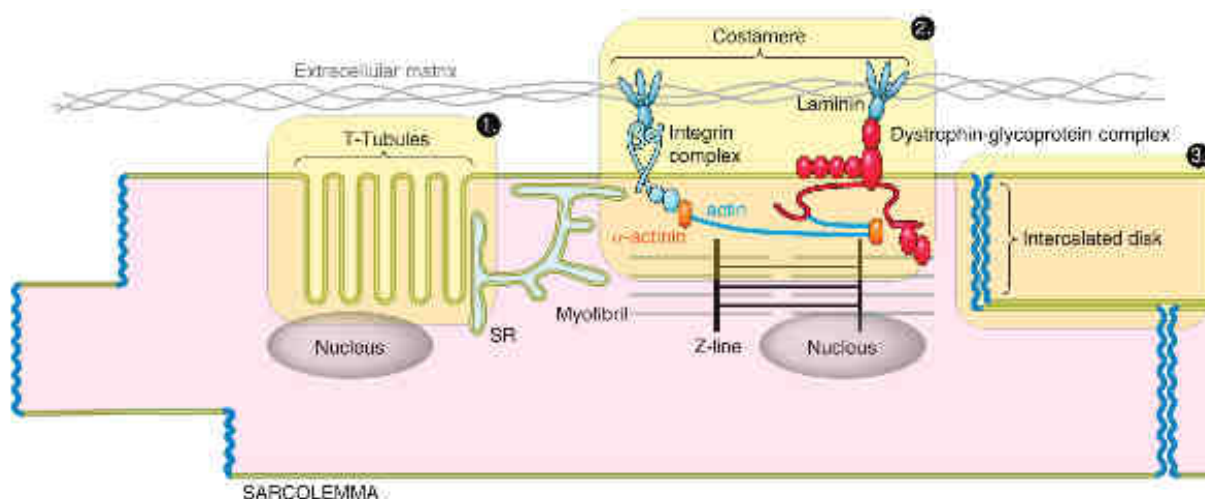


Figure 4 : Structure du sarcolèmme. 1) Tubules T, 2) costamère et 3) disque intercalaire (Balse et al., 2012).

Le réticulum sarcoplasmique joue un rôle central dans la contraction du cardiomyocyte (Michalak and Opas, 2009). Contrairement au réticulum endoplasmique des cellules qui joue un rôle essentiellement dans la synthèse, la modification post-traductionnelle des protéines et la synthèse des phospholipides et des hormones stéroïdes, le réticulum sarcoplasmique est plus spécialisé dans la régulation de la concentration intracellulaire des ions calcium du cardiomyocyte (Bers, 2002). La concentration du Ca^{2+} intracellulaire est un élément clé de la régulation du couplage excitation-contraction qui est le moteur de la contraction cyclique du cœur. La contraction survient lors de la propagation du potentiel d'action qui provoque la libération du Ca^{2+} par les récepteurs canaux à la ryanodine

(ryanodine receptor, RYR2) présents au niveau du reticulum sarcoplasmique ce qui entraîne la contraction. Ceci est suivi par la recapture du calcium principalement dans le réticulum sarcoplasmique par la pompe calcique (SERCA2A) ou par élimination de la cellule par les canaux échangeurs d'ions $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ afin de rétablir une concentration physiologique de calcium dans la cellule ce qui induit la relaxation (Michalak and Opas, 2009)

Les mitochondries sont également très abondantes au sein des cardiomyocytes. En effet, l'essentiel de l'énergie nécessaire au cardiomyocyte pour se contracter lui provient de l'ATP synthétisé par la mitochondrie. Elles sont localisées essentiellement sous forme de clusters au niveau du sarcolème ou longitudinalement le long des sarcomères (Rosca and Hoppel, 2010).

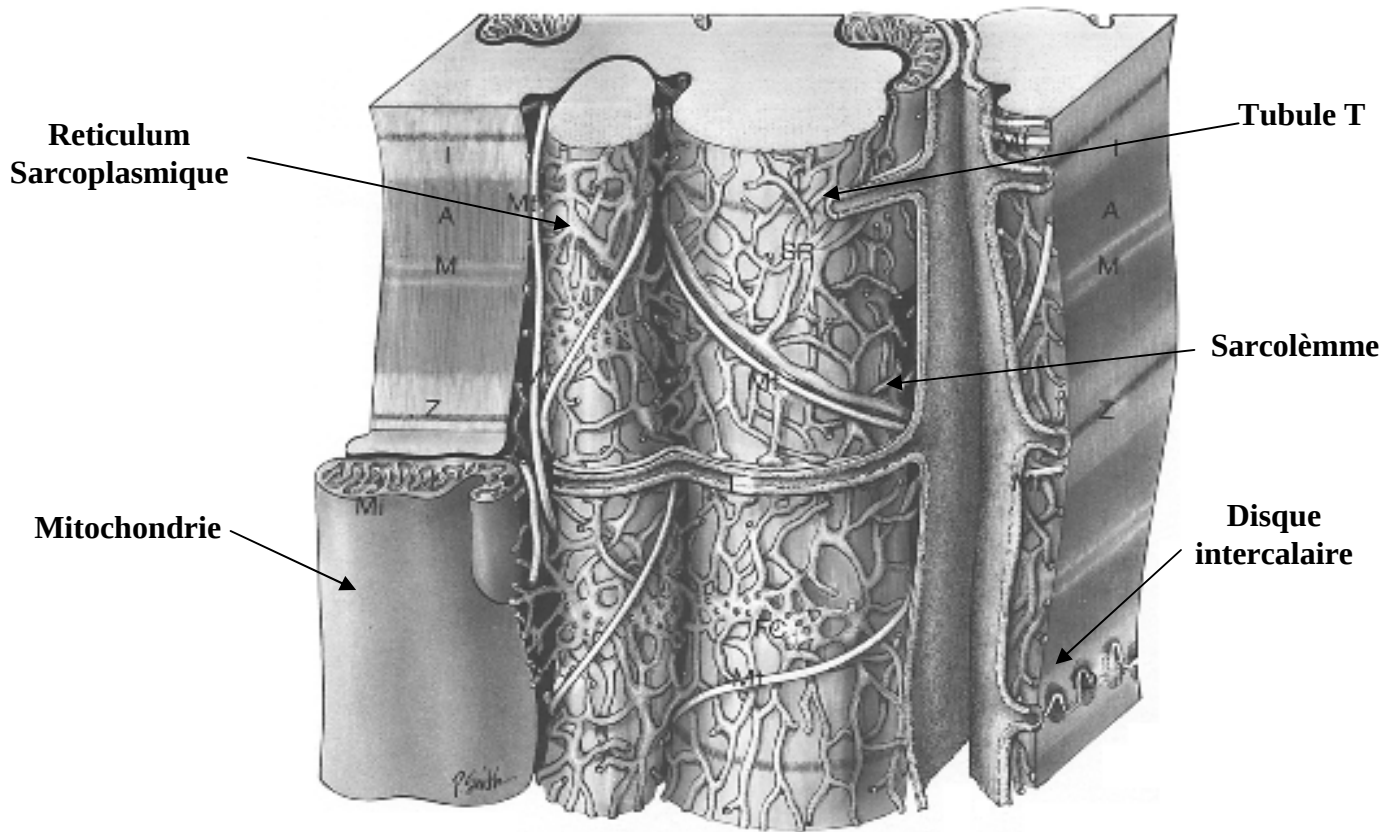


Figure 5 : Organisation du cardiomyocyte (Goldstein and Entman, 1979)

Les cellules musculaires cardiaques ont la faculté de se contracter grâce à une organisation bien spécifique de leur cytosquelette qui leur confère un aspect strié avec une alternance de bandes claires (bande I) et de bandes sombres (bande A). On retrouve la même organisation dans les fibres musculaires squelettiques (Figure 4).

1.1.4. Le sarcomère

L'unité de contraction de la cellule musculaire est le sarcomère. Le sarcomère est délimité par deux stries Z (pour Zwischenscheibe) situées au centre de la bande I. Le centre du sarcomère est délimité par la bande H (pour Hensen) qui est traversée en son centre par la ligne M (pour Mittelmembran) (figure 6). Cet aspect est en réalité le reflet d'une architecture de filaments protéiques fins et épais qui s'entrecroisent.

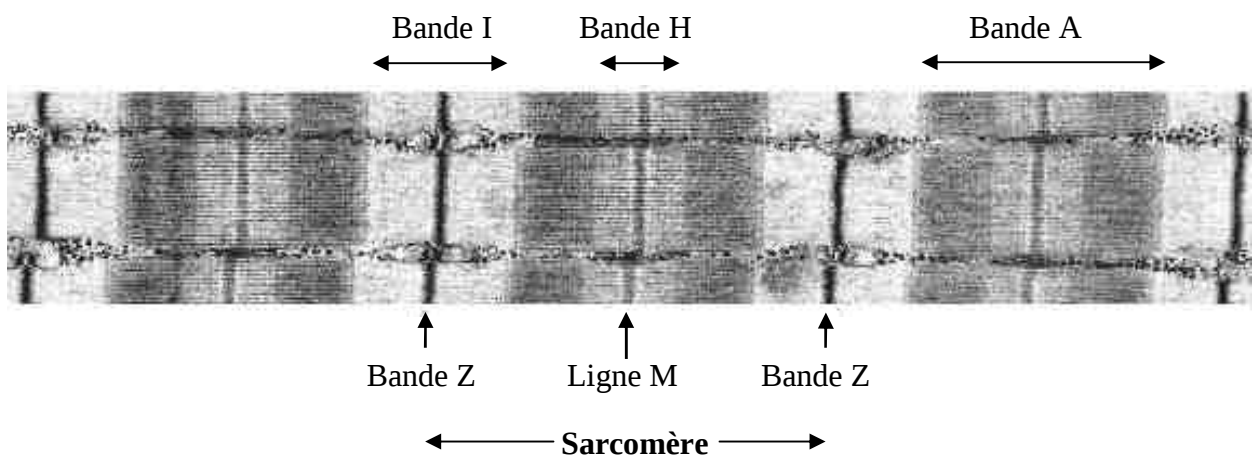


Figure 6 : Organisation des sarcomères (Lee et al., 2007)

1.1.4.1. Les protéines du sarcomère

L'assemblage des protéines en myofibrilles est un processus complexe qui nécessite une bonne coordination entre la synthèse des protéines qui les constituent et leur polymérisation en filaments. Les filaments épais et les filaments fins sont alignés latéralement et perpendiculairement à la bande Z. L'assemblage de ces protéines ne suffit pas et le maintien de cette structure fait intervenir d'autres protéines telles que **titine**, filament élastique permettant le maintien de l'organisation du sarcomère et son élasticité.

1.1.4.2. Les filaments fins

Les filaments fins sont composés de trois protéines : l'actine, les troponines et la tropomyosine (figure 7) (Gordon et al., 2000).

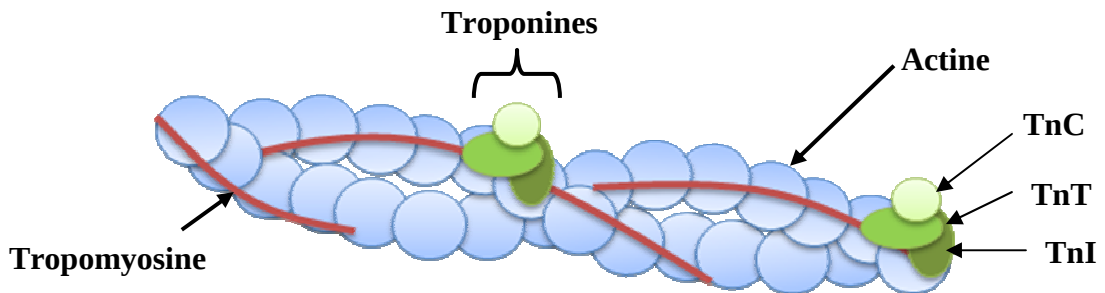


Figure 7: Structure des filaments fins d'après (Gordon et al., 2000)

Les filaments fins sont constitués de filaments d'actine. Les monomères d'actine (Actine G) sont capables de se polymériser spontanément pour former des filaments d'actine qui vont former une double hélice alpha (Actine F). Dans le sarcomère, on retrouve essentiellement l'actine sous forme de filament (Schoenenberger et al., 2011). Dans le muscle squelettique et cardiaque, l'actine se retrouve attachée à la bande Z grâce à une autre protéine du cytosquelette qui est l' α -actinine (Schoenenberger et al., 2011). La tropomyosine est sous forme de dimère en hélice alpha, chaque molécule de tropomyosine s'étend sur sept monomères d'actine (Gordon et al., 2000). Les troponines sont constituées de 3 sous-unités : la troponine I (TnI), C (TnC) et T (TnT). La troponine C possède un site de fixation au calcium, la troponine I se lie à l'actine et la troponine T fait le lien entre le complexe troponine et la tropomyosine. Lors de la libération de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique, le calcium vient se fixer à la troponine C ce qui va induire un changement de conformation du complexe troponine. Ce changement de conformation va permettre l'interaction entre l'actine et la tête globulaire des filaments épais de myosine (Gordon et al., 2000).

1.1.4.3. Les filaments épais

Le filament épais est un polymère bipolaire constitué de protéine de myosine qui interagit avec l'actine pour produire la force nécessaire au raccourcissement du sarcomère. La

myosine est composée de deux chaînes lourdes (~200kDa chacune) qui forment une hélice super-enroulée au niveau de la queue de la myosine pour terminer par deux structures globulaires au niveau de la tête. Chaque tête globulaire est reliée à 2 chaînes légères. On retrouve au niveau de la tête S1 de myosine les sites d'hydrolyse de l'ATP et les sites de fixation à l'actine (Gordon et al., 2000) (figure 8).

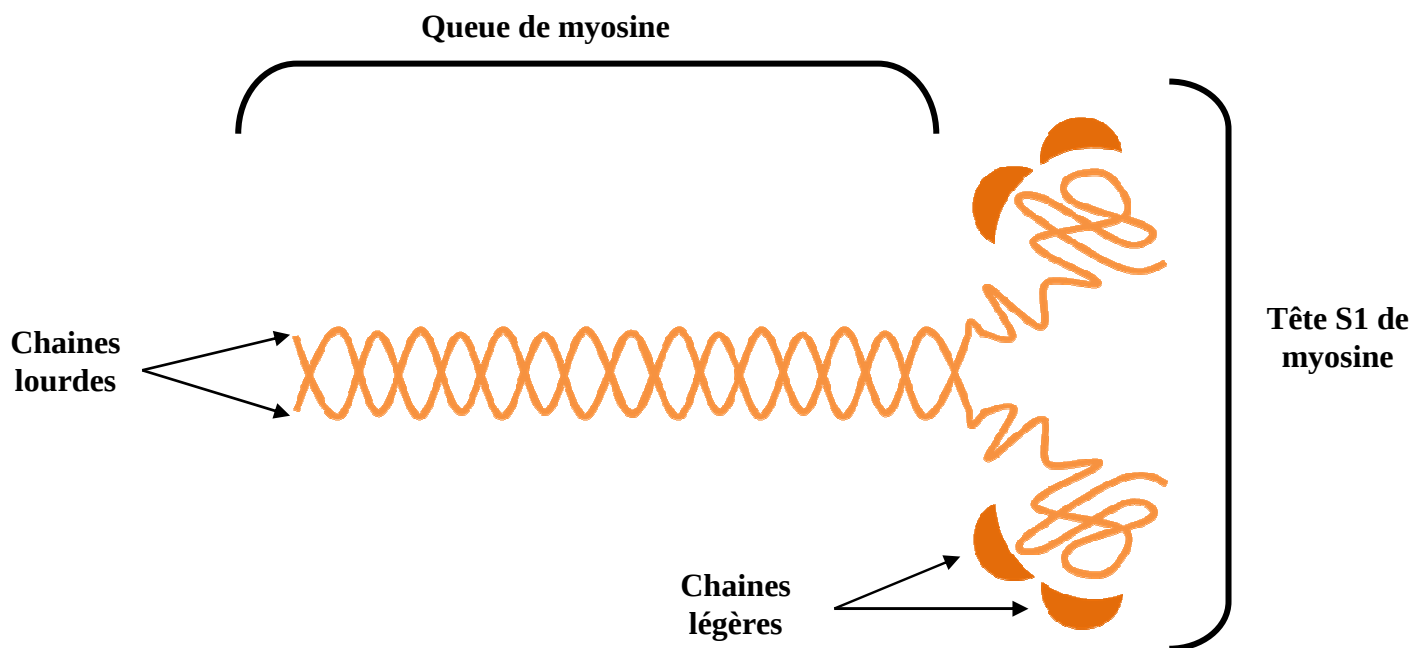


Figure 8 : Organisation de la Myosine

La contraction a lieu lorsque la tête S1 de la myosine des filaments épais se fixe à l'actine en exerçant une force sur les filaments fins. Cette force induit le glissement des filaments épais sur les filaments fins ce qui cause le raccourcissement des sarcomères et produit la force de contraction du cœur (figure 9).

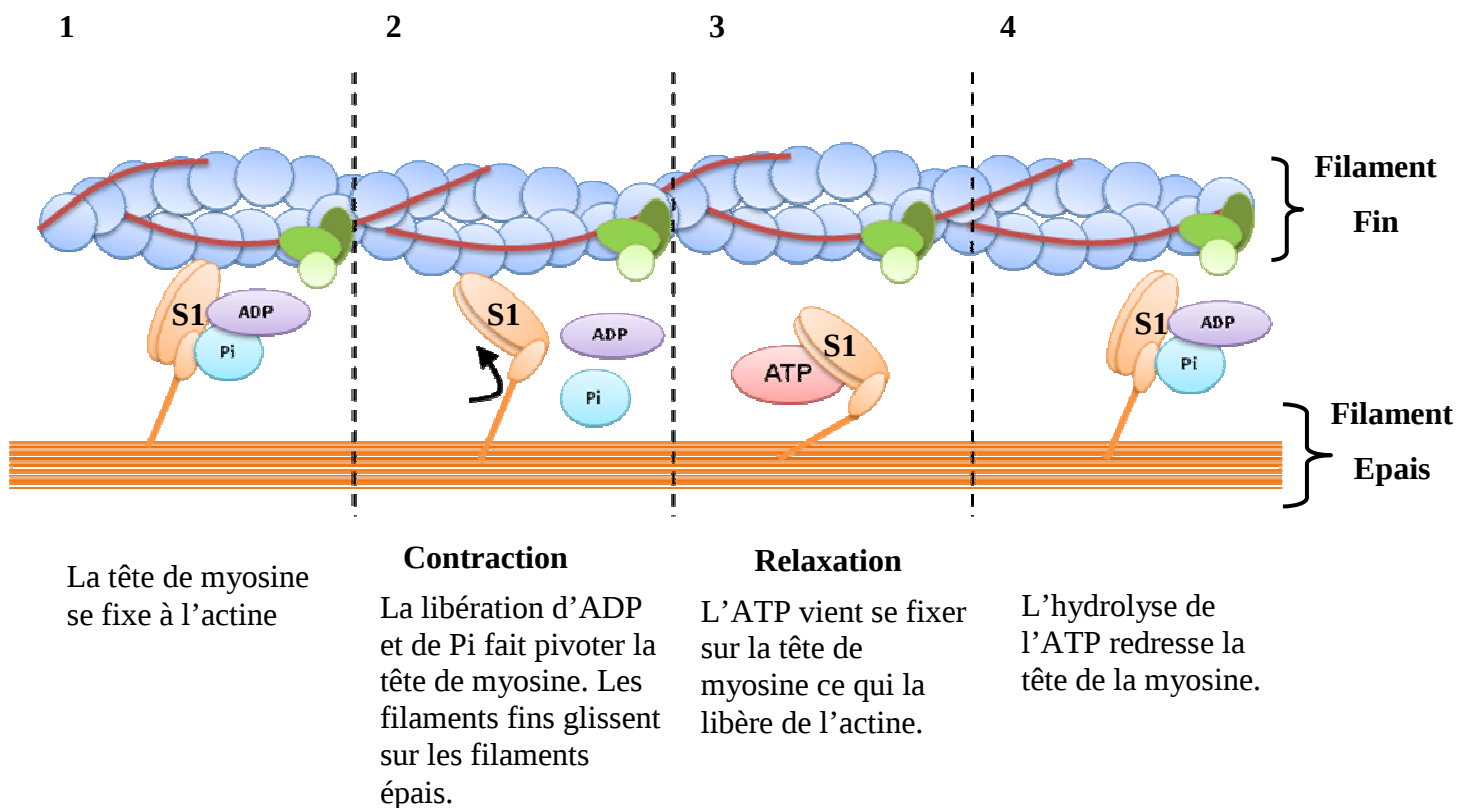


Figure 9 : Contraction glissement des filaments fins sur les filaments épais

1.1.4.4. Les filaments élastiques

Contrairement aux filaments fins et épais, les filaments élastiques sont constitués d'une seule protéine appelée titine ou connectine. Titine est la plus grosse protéine du corps humain actuellement identifiée (~3 000 kDa). Elle s'étend de la bande Z où elle est liée à la téléthonine et l' α -actinine, jusqu'à la bande M (Figure 10). Elle permet l'élasticité du sarcomère. Dans le muscle cardiaque, elle est présente sous 2 isoformes : une courte et rigide N2B (3.0MDa) et une plus longue et plus élastique N2BA (3.2-3.7 MDa) (Kruger and Linke, 2009). Les propriétés élastiques de titine permettent de maintenir la structure du sarcomère pendant la contraction et la relaxation du muscle. En dehors de son rôle mécanique, titine est impliquée dans différentes voies de signalisation. Titine peut se lier à une vingtaine de protéines différentes dont des protéines de contraction, de structure mais également des protéines des voies de signalisation. En effet, titine présente des sites de phosphorylation au niveau de sa partie N-terminale dans la bande Z (Gautel et al., 1996) (Sebestyen et al., 1995) et un site à activité kinase en C-terminal (Kruger and Linke, 2009).

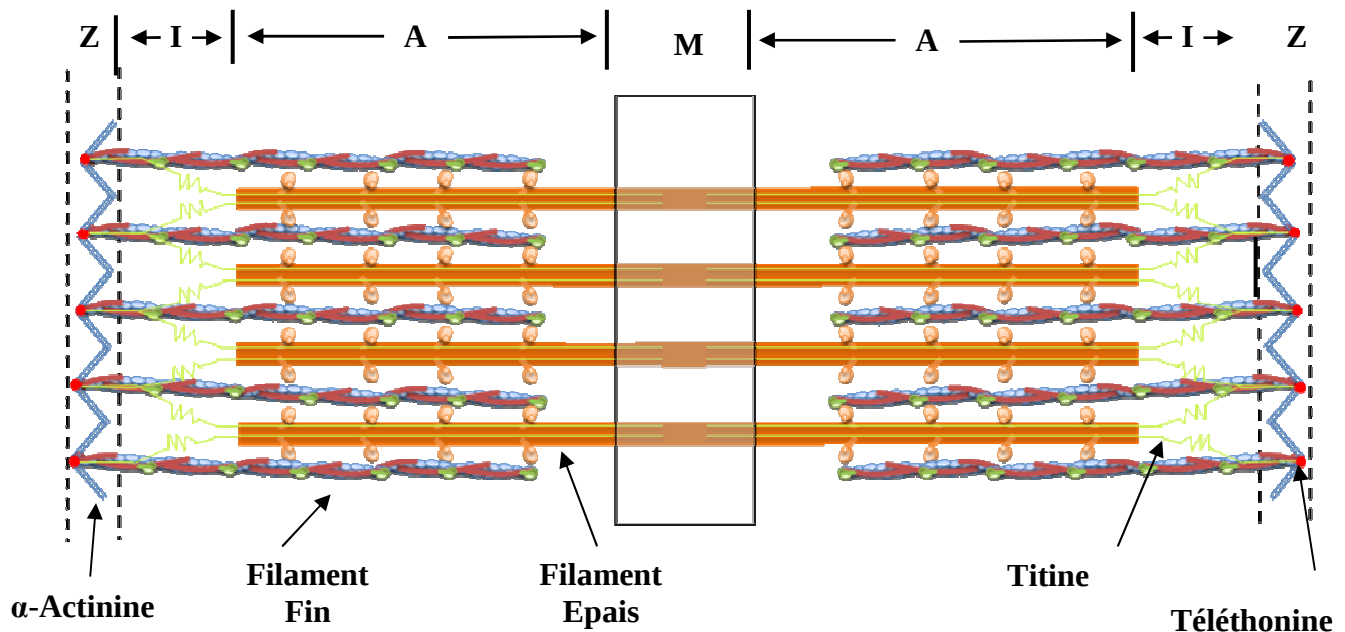


Figure 10 : Structure et ultrastructure du sarcomère.

1.2. Les différents types d'insuffisance cardiaque

On parle d'insuffisance cardiaque lorsque le cœur n'est plus capable de maintenir un flux sanguin et/ou une pression sanguine suffisante pour répondre aux besoins de l'organisme. L'insuffisance cardiaque peut être rattachée à une multitude de cardiomyopathies. Les cardiomyopathies sont les maladies du cœur. Il existe différents types de cardiomyopathies, qui sont classées selon l'origine de la pathologie allant des valvulopathies, aux infections du cœur, ou des malformations cardiaques. Mais le plus souvent l'insuffisance cardiaque est la conséquence d'une hypertension ou d'une pathologie coronarienne.

Il existe dans les cardiomyopathies, des maladies qui touchent les valves cardiaques principalement les valves mitrales et aortique, on parle alors de valvulopathie. Les lésions valvulaires peuvent être causées par des calcifications valvulaires ou par des anomalies de formation des valves. Chez l'homme les lésions valvulaires conduisent à la formation d'œdèmes pulmonaires ou périphériques et à une faible tolérance à l'exercice. Les traitements actuels sont essentiellement chirurgicaux (Houser et al., 2012).

La cardiomyopathie restrictive se caractérise par une augmentation excessive de la pression diastolique causée par une perte de la compliance des ventricules. Ceci peut être dû à une fibrose au niveau du myocarde causée par différentes maladies infectieuses qui touchent le cœur. Dernièrement, il a été montré que la cardiomyopathie restrictive pouvait avoir des origines génétiques. En effet, des mutations sur certaines protéines du cytosquelette ont été identifiées comme des mutations sur les gènes de la troponine I ou la troponine T. Les mutations sur une de ces protéines du sarcomère peuvent entraîner une cardiomyopathie restrictive qui peut évoluer en un phénotype d'hypertrophie cardiaque (Houser et al., 2012).

Les insuffisances cardiaques causées par une hypertension sont la principale cause d'infarctus. L'hypertension artérielle touche principalement les personnes âgées, obèses ou les personnes diabétiques de type 2. Elle débute par une hypertrophie concentrique, s'exprimant par un épaississement des parois des ventricules et donc à une diminution du volume diastolique qui peut entraîner une diminution de la fraction éjection. Avec la progression de la maladie le cœur s'hypertrophie, avec un amincissement des parois du ventricule et une augmentation du volume diastolique du cœur. Les causes de l'hypertension sont variées ce qui conduit à une variété de traitements différents (Houser et al., 2012).

Un autre type de cardiomyopathie est la cardiomyopathie dilatée qui se caractérise par une dilatation ventriculaire gauche ou/et droite avec une dysfonction systolique et diastolique du cœur. Les causes primaires de la cardiomyopathie dilatée sont d'origine génétique. En effet, des mutations sur des gènes des protéines du cytosquelette, du sarcolème ou du sarcomère peuvent conduire à cette pathologie (Watkins et al., 2011). La cardiomyopathie dilatée peut également être une conséquence d'une maladie antérieure comme une maladie coronarienne ou suite à un infarctus du myocarde ou une conséquence de l'hypertension. Les marqueurs histologiques de la cardiomyopathie dilatée sont une hypertrophie des cardiomyocytes, présence de fibrose, une mort progressive des cardiomyocytes (apoptose, nécrose ou autophagie). Ceci cause une altération des fonctions cardiaques avec des anomalies dans la fonction systolique et diastolique du cœur, avec une perte de la contractilité.

1.3 Les causes des cardiomyopathies

1.3.1 Les mutations induisant une cardiomyopathie

Les principales causes connues qui conduisent à une cardiomyopathie sont les mutations qui touchent directement les protéines du sarcomère (Harvey and Leinwand, 2011) (tableau 1). Ces mutations causent des désorganisations du sarcomère qui conduisent à une perte de la contraction. Les mutations sur des gènes ont déjà été identifiées comme étant la principale cause d'insuffisance cardiaque (Watkins et al., 2011). Cependant les mécanismes et les voies de signalisation conduisant à une insuffisance cardiaque sont encore peu connus. En effet, souvent les voies de signalisation qui induisent l'insuffisance cardiaque viennent bien souvent se mêler aux voies de signalisation de compensation du cœur.

Cardiomyopathies	Gènes mutés	Pathologies
Cardiomyopathie Hypertrophique	Chaine lourde de myosine- β α -tropomyosine Troponine-T/I/C α -actinine Titine Téléthonine	Augmentation de la masse du cœur Epaississement des parois du VD Augmentation de la taille des myocytes Diminution du volume diastolique Fibrose interstitielle
Cardiomyopathie Dilatée	Chaine lourde de myosine- β Desmine TAZ Titine α -actinine Troponine-T/I/C	Amincissement des parois du VD Augmentation du volume diastolique Apoptose des cardiomyocytes
Cardiomyopathie Restrictive	Troponine I Desmine α -actinine	Apoptose Fibrose Désorganisation myofibrillaire

Tableau 1 : Cardiomyopathies : causes génétiques et conséquences d'après (Harvey and Leinwand, 2011) *modifié*.

Les modèles *in vitro* et l'utilisation de souris génétiquement modifiées ont permis d'identifier des voies de signalisation impliquées dans l'insuffisance cardiaque. L'expression de certains gènes a été identifiée *in vitro* comme induisant l'hypertrophie des cardiomyocytes. Les plus étudiées sont les voies de l'endothéline, angiotensine II, des récepteurs couplés aux protéines Gq, la voie Ras et la voie de l'IGF-I (Hunter and Chien, 1999) (Reiss et al., 1996), (Powell-Braxton et al., 1993), (Donath et al., 1998). Il existe une multitude de voies de signalisation impliquées dans l'insuffisance cardiaque (Mudd and Kass, 2008) (figure 11).

Récemment, ShcA (Src homology and collagen homology), une protéine adaptatrice, a été identifiée comme jouant un rôle dans la formation et la fonction cardiaque (Hardy et al., 2007) ; (Vanderlaan et al., 2011).

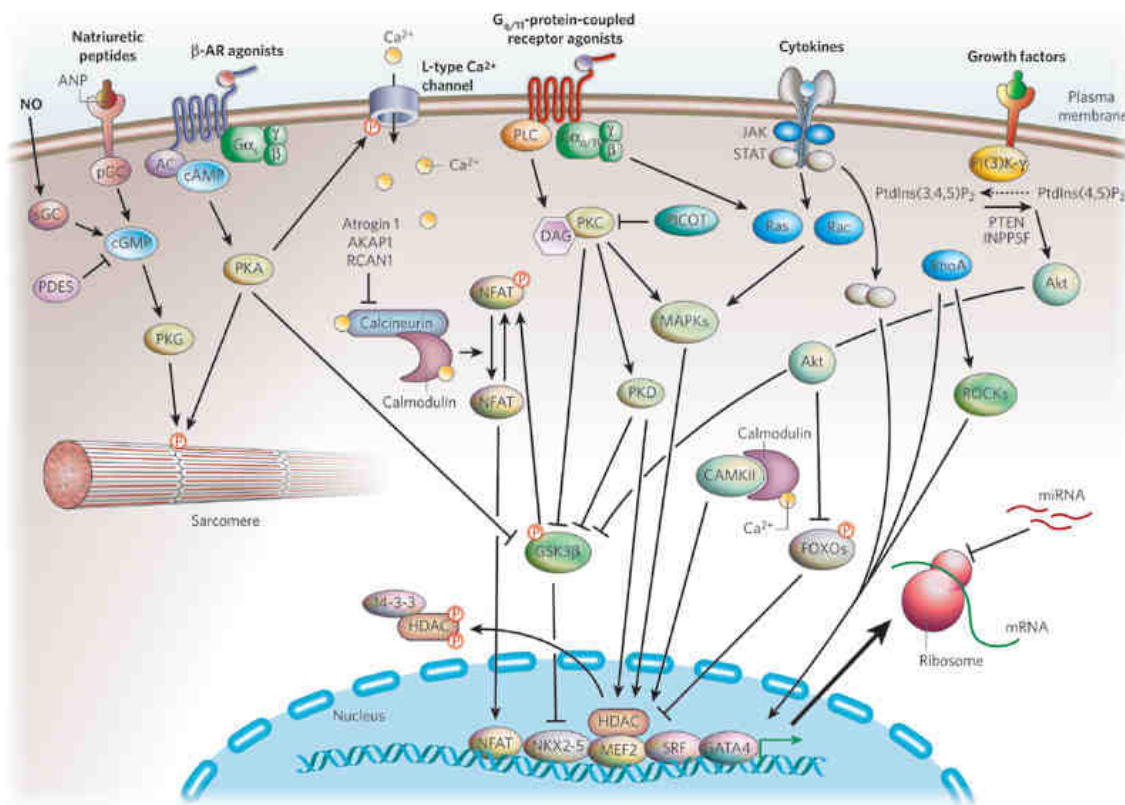


Figure 11 : Les voies de signalisation impliquées dans l'insuffisance cardiaque (Mudd and Kass, 2008)

2. Src homology and collagen protein A (ShcA)

Les protéines shc sont des protéines adaptatrices capables de se fixer aux récepteurs à activité tyrosine kinase intrinsèque (RTK). Toutes les protéines Shc possèdent une architecture commune : un domaine PTB (phosphotyrosine binding-domain) en N-terminal, un domaine SH2 (Src homology 2 domain) en C-terminal et entre les deux un domaine CH1 (collagen homology 1) qui possède des résidus tyrosines pouvant être phosphorylés (figure 12). Les protéines Shc peuvent être phosphorylées par une multitude de récepteurs à activité tyrosine kinase comme les récepteurs à l'EGF, au PDGF, à erbB-2, à l'IGF1... (Migliaccio et al., 1997) Les protéines Shc peuvent également être phosphorylées par des tyrosines kinases cytosoliques (TK) tel que Src et FAK (Migliaccio et al., 1997). Elles peuvent également se fixer à d'autres récepteurs qui ne possèdent pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque comme LRP1 (Woldt et al., 2011) ou certaines intégrines (Wary et al., 1996). Une fois phosphorylé Shc forme un complexe stable grâce à son domaine SH2 et/ou à son domaine PTB avec les RTK et les récepteurs capables de recruter les TK cytosoliques. Le domaine CH1 phosphorylé de Shc peut se fixer au domaine SH2 de GRB2 qui forme un complexe constitutif avec SOS. Le recrutement de SOS à la membrane suffit à induire l'activation de Ras et la voie des MAPkinases (Figure 13) (Aronheim et al., 1994)

Chez les mammifères 4 gènes *shc* ont été identifiés *ShcA*, *ShcB* et *ShcC* et récemment *ShcD* (Hawley et al., 2011) (figure 12). *ShcA* (*Shc1*) est une protéine exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme, présente sous 3 isoformes p66, p52 et p46. Le Knock-Out de *ShcA* chez la souris est létal très tôt, à E11,5 de l'embryogenèse, dû à des anomalies cardiovasculaires. *ShcB* (*Sck/Sli/Shc2*) est présent sous une seule isoforme de 68kDa, *ShcC* (*Rai/N-Shc/Shc3*) comprend deux isoformes de 64kDa et 52kDa. Le KO de *ShcB* et *ShcC* est viable chez la souris cependant l'absence de *ShcB* et *ShcC* induit une diminution des neurones sensoriels nocicepteurs peptidergiques et non peptidergiques (Sakai et al., 2000). Récemment, *Shc D* (*Shc 4/RaLP*) a été identifié comme jouant un rôle dans le développement embryonnaire, on le retrouve essentiellement dans les précurseurs des cellules du système nerveux central, des muscles et des os (Wills and Jones, 2012)

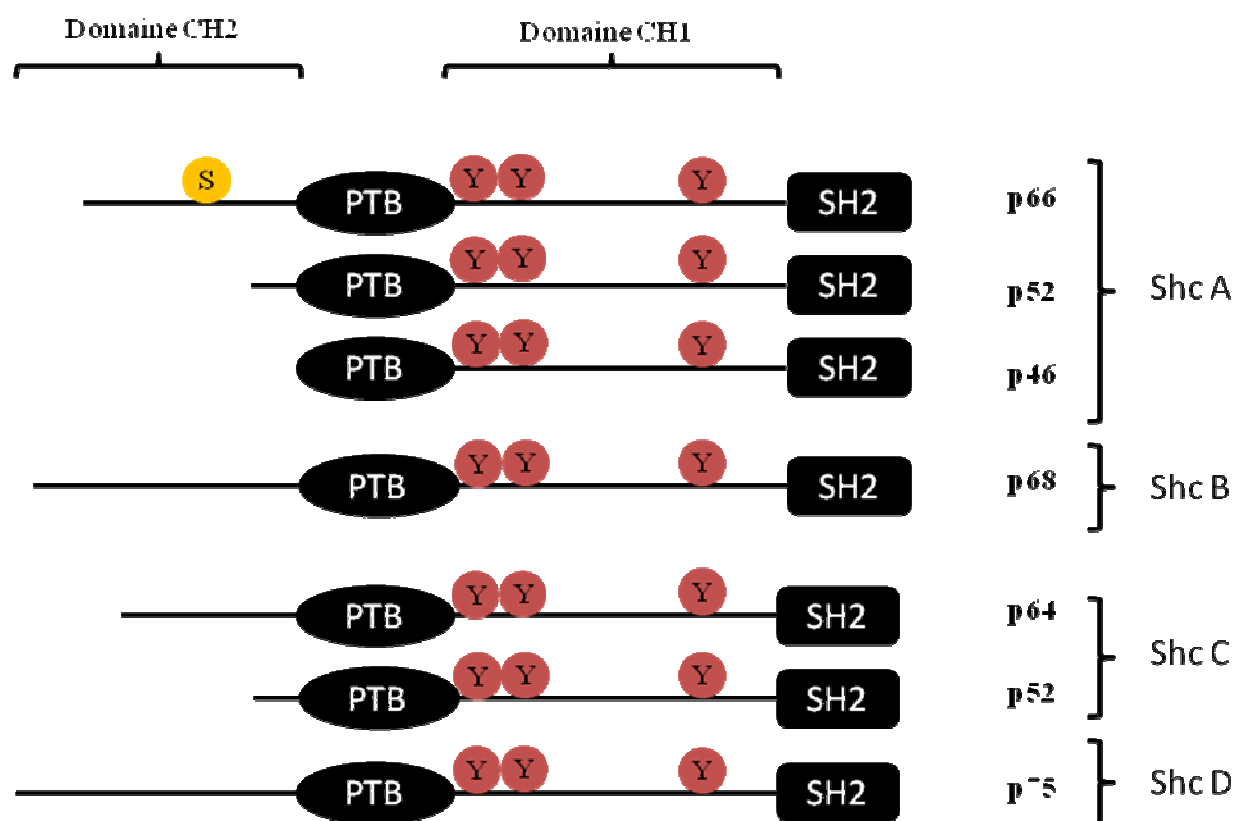


Figure 12 : Architecture des protéines Shc d'après (Wills and Jones, 2012) *modifié*. (Y) tyrosine phosphorylable du domaine CH1 ; (S) serine phosphorylable du domaine CH2 de P66. PTB: Phosphotyrosine binding-domain; SH2: Src homology 2 domain; CH: Collagen homology.

2.1. ShcA

ShcA est exprimé sous 3 isoformes p46, p52 et p66, ces trois isoformes sont issues de deux transcrits différents qui présentent des promoteurs indépendants. Un promoteur pour les isoformes p46/p52 et un autre pour l'isoforme p66. Les isoformes p46 et p52 sont produites à partir de codons Start différents au sein d'un même ARNm (Wills and Jones, 2012). L'isoforme p66, plus longue que les p46 et p52, possède un motif supplémentaire CH2 en N-terminal (Ravichandran, 2001). Les isoformes p46 et p52 sont exprimées de façon ubiquitaire alors que l'isoforme p66 se retrouve absente de certaines lignées hématopoïétiques (Ravichandran, 2001).

ShcA peut être phosphorylé par les RTK au niveau de deux motifs tyrosine situés sur les Tyr^{239/240} et Tyr³¹⁷ dans le domaine CH1. Une fois phosphorylées ces tyrosines peuvent recruter Grb2/SOS et induire l'activation de la voie des MAPK (Wills and Jones, 2012). La voie des MAPK est la voie de signalisation la plus décrite impliquant ShcA.

En dehors des récepteurs à activité tyrosine kinase, il existe d'autres récepteurs sans activité tyrosine kinase et des kinases cytosoliques capables de recruter ShcA pour induire des voies de signalisation. Des kinases cytosoliques comme FAK (Focal adhesion kinase) (Schlaepfer et al., 1999), v-Src et c-Src ont déjà été identifiées comme pouvant phosphoryler ShcA au niveau de ses motifs tyrosine dans le domaine CH1 (McGlade et al., 1992). Les intégrines font partie de la famille des récepteurs sans activité tyrosine kinase intrinsèque qui sont capables de recruter ShcA au niveau de leur partie intracellulaire. Les intégrines sont des récepteurs membranaires capables de faire le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette des cellules. Les intégrines permettent également de traduire les messages chimiques ou mécaniques au sein de la cellule. Le domaine intracellulaire des intégrines peut également être phosphorylé par des kinases cytosoliques. Certaines intégrines ont déjà été décrites comme pouvant recruter ShcA comme les intégrines $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ (Wary et al., 1996) (Figure 13).

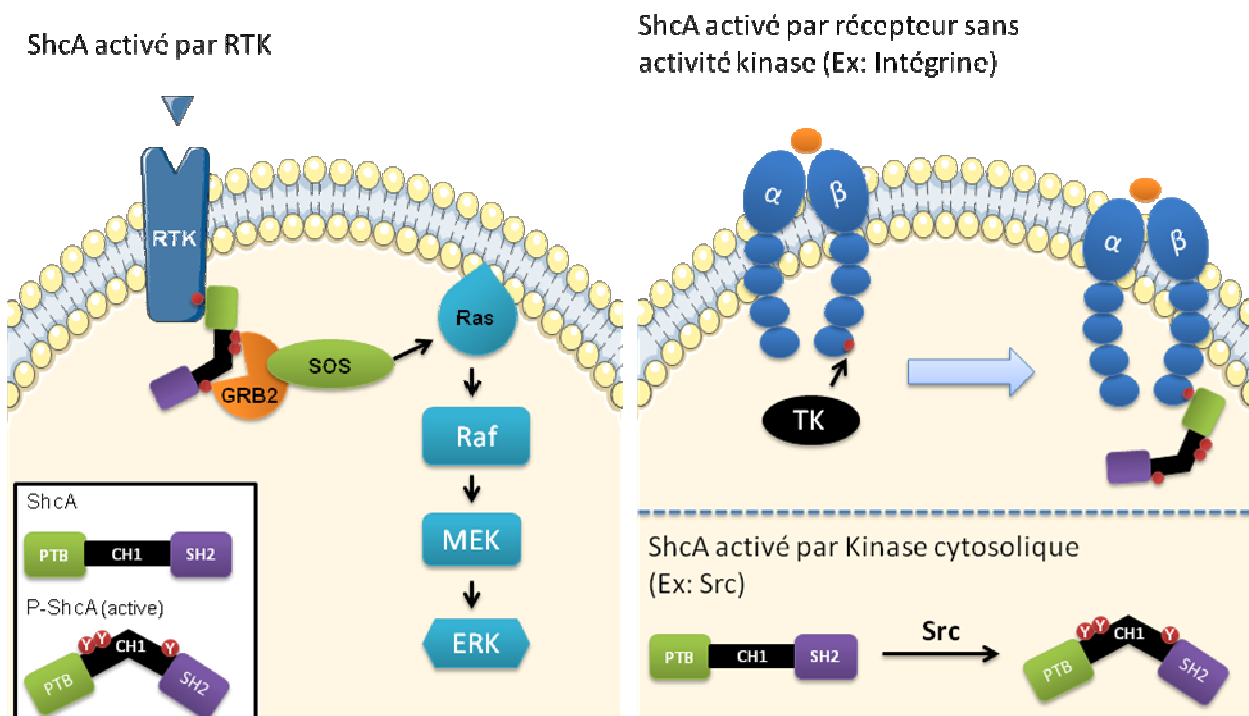


Figure 13 : Les différentes voies d'activation de ShcA

Certaines études sur ShcA confèrent un rôle supplémentaire et différent à l'isoforme p66.

2.2. L'isoforme p66 de ShcA

L'isoforme p66 de ShcA est essentiellement localisée au niveau mitochondrial. Elle joue un rôle essentiel dans la transduction du signal de mort cellulaire via la voie de signalisation p53. Par l'intermédiaire de son domaine CH2 supplémentaire en N-Terminal, p66 contrôle la réponse au stress oxydant et ainsi la survie cellulaire. En effet, chez les souris KO p66 (p66^{Shc-/-}), il a été montré que l'absence de p66 leur permettait de résister au stress oxydant ce qui conduisait à une augmentation de l'espérance de vie de 30% (Migliaccio et al., 1999). Plusieurs groupes se sont intéressés à p66 dans le vieillissement de la paroi vasculaire mais également dans différentes pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque. Dans l'athérosclérose, l'absence de p66 a un effet protecteur dans la formation des plaques d'athérome, ceci étant corrélé à une diminution au niveau systémique et tissulaire de stress oxydant ce qui protège les vaisseaux des lésions au niveau de l'endothélium (Napoli et al., 2003). Au niveau cardiaque aucun phénotype visible n'a été identifié chez les souris p66^{Shc-/-}, cependant le knock-out spécifique de l'isoforme p66 de ShcA chez la souris semble développer une plus grande tolérance à des doses élevées d'angiotensine II. L'angiotensine II se fixe sur les récepteurs couplés aux protéines G AT₁. Elle est impliquée dans la sénescence des cellules cardiaques des patients souffrant d'hypertension, d'athérosclérose ou de diabète. Ainsi, l'absence de p66 pourrait protéger des conséquences cardiovasculaires liées à ces maladies (Graiani et al., 2005). Le rôle cardioprotecteur en l'absence de p66 a également été montré dans les cardiomyopathies diabétiques (Rota et al., 2006).

p66 peut également jouer un rôle de rétrocontrôle négatif des voies de signalisation activées par ShcA comme pour la voie de l'EGF (epidermal growth factor) où les isoformes p52, p46 activent la voie des MAP kinases alors que l'isoforme p66 peut en plus inhiber cette voie dans les fibroblastes embryonnaires de souris (Migliaccio et al., 1997). En effet, l'isoforme p66 phosphorylée en tyrosine au niveau du domaine CH1 par le récepteur à l'EGF va recruter le complexe GRB2/SOS et activer la voie des MAPKinases. Cependant dans un premier temps une deuxième phosphorylation par MEK ou/et ERK (l'origine et la nature de la kinase n'est pas clairement définie) (Okada et al., 1997) en sérine/thréonine sur son domaine

CH2 supplémentaire vient déstabiliser la liaison de p66 au récepteur mais conserve l'interaction avec Grb2/SOS intacte. Cela induit la séquestration de Grb2/SOS qui ne pourront plus être recrutés à la membrane par les autres isoformes de Shc (Okada et al., 1997) (Migliaccio et al., 1997).

2.3. ShcA dans le cœur

ShcA joue un rôle essentiel dans la formation du cœur au cours de l'embryogenèse. En effet, la délétion des exons 2 et 3 de ShcA par recombinaison homologue conduit à la production d'une protéine tronquée pour une partie du domaine PTB. Cette protéine tronquée est non fonctionnelle selon les auteurs. Les souris KO ShcA meurent à E11,5 ce qui est dû, entre autres, à des anomalies dans l'organogenèse du cœur (Lai and Pawson, 2000). Les embryons de souris qui n'expriment pas ShcA ont des cœurs avec des parois ventriculaires plus fines et irrégulières avec la présence de trabécules à l'intérieur du ventricule (Lai and Pawson, 2000). Les études *in vitro* sur les fibroblastes embryonnaires des souris KO ShcA ont montré qu'en l'absence de ShcA les fibroblastes étaient moins sensibles aux effets des facteurs de croissance. En effet, il faut des concentrations 50 fois plus élevées en EGF et 25 fois plus élevées en PDGF-BB pour induire la même activation de ERK2 que dans les fibroblastes contrôles. La présence de ShcA dans les fibroblastes embryonnaires de souris facilite l'induction de la voie des MAPK lorsque les cellules adhèrent à fibronectine. De plus ShcA est essentiel à la formation de points d'adhésion focaux et à l'organisation du cytosquelette des fibroblastes embryonnaires de souris. Ceci est corrigé lorsque l'isoforme p52 est réexprimée dans les cellules (Lai and Pawson, 2000). Une étude fonctionnelle des domaines de ShcA a également été réalisée par la même équipe afin d'identifier les domaines impliqués dans ce processus. Le domaine PTB de ShcA est essentiel à la formation du cœur durant l'embryogenèse alors que la phosphorylation des tyrosines du domaine CH1 n'est pas nécessaire au développement du cœur. En revanche, l'absence de phosphorylation du domaine CH1 de ShcA cause une perte de coordination des mouvements de la souris. Cette absence de coordination est causée par une malformation du fuseau musculaire impliqué dans le système de proprioception de la souris (Hardy et al., 2007). Récemment, l'équipe du professeur Pawson a élucidé le rôle de ShcA dans la fonction cardiaque post-natale en développant un modèle de souris qui n'exprime plus le domaine PTB de ShcA spécifiquement dans les cardiomyocytes ventriculaires grâce au système cre-lox et au promoteur de la chaîne légère de myosine (CKO ShcA). L'excision de ShcA est observée à partir de 2 semaines sur des

préparations de cardiomyocytes purifiés (Vanderlaan et al., 2011). Dans cette étude, les auteurs ont montré que les souris CKO ShcA développent les premiers signes d'une insuffisance cardiaque dès l'âge de 3 mois avec une diminution de la fonction cardiaque et une dilatation du ventricule gauche. Cependant, aucune anomalie au niveau des mitochondries, ni au niveau myofibrillaire n'a été observée (Vanderlaan et al., 2011). Seule l'étude sur des cardiomyocytes isolés a montré que l'absence de ShcA augmentait la contractilité des cardiomyocytes dû à une hypersensibilité au calcium (Vanderlaan et al., 2011). Les auteurs ont montré que l'absence de ShcA induisait une altération de la matrice extracellulaire due à une hyperactivité des métalloproteinases matricielles (MMP) comme la MMP9 et MMP2.

Objectif

ShcA est une protéine adaptatrice qui a la capacité de se lier à un certain nombre de récepteurs qui sont par ailleurs des récepteurs jouant un rôle important dans l'insuffisance cardiaque, tels que les intégrines, l'IGFr, Erbb2... Par ailleurs, ShcA est une protéine qui joue un rôle important dans la formation du cœur au cours de l'embryogenèse. Afin de mieux comprendre le rôle de ShcA dans la fonction cardiaque nous avons utilisé un modèle de souris déficientes en ShcA spécifiquement dans le cœur.

Objectif 1 : Caractérisation phénotypique des souris déficientes en ShcA dans le cœur.

Objectif 2 : Implication de ShcA dans les voies de signalisation du cœur.

Objectif 3 : Rôle de ShcA dans l'architecture du cardiomyocyte.

Matériel et Méthodes

3. Matériel et méthodes

3.1. Modèle Animal

3.1.1. Génération des souris déficientes en ShcA tissu spécifique

3.1.1.1. Souris ShcA flox/flox

Pour supprimer l'expression de ShcA dans un tissu spécifiquement nous avons utilisé le système Cre-lox. Brièvement, des sites lox sont introduits de part et d'autre de la séquence du gène ou d'une partie de la séquence du gène à supprimer. Ces sites lox d'une trentaine de nucléotides sont reconnus par une enzyme, la Cre-recombinase, qui va exciser la partie se trouvant entre les sites lox et refermer pour ne laisser qu'un seul site lox. Dans le cas de ShcA, des sites lox ont été introduits du côté 5' en amont de l'exon 2 et du côté 3' en aval de l'exon 8.

3.1.1.2. Génération des souris Sm22 ShcA (SmShcA-)

Les souris Sm22 ShcA n'expriment plus ShcA précocément dans le cœur à partir du 7ème jour de développement de l'embryon et dans les cellules musculaires lisses. Pour obtenir les SmShcA-, des souris transgéniques SM22Cre (The Jackson Laboratory, France) sont croisées avec les souris ShcA flox/flox.

3.2. Caractérisation Phénotypique

3.2.1. Génotypage

3.2.1.1. Extraction d'ADN génomique

Pendant le sevrage, des animaux sont identifiés grâce à un système de tatouage sur les phalanges et un bout de queue est récupéré. Le bout de queue est alors digéré toute la nuit au bain marie à 55°C dans 500µl/échantillon d'un tampon de digestion (Tris 50mM ; EDTA pH8,5 5mM, SDS 1% ; NaCl 0,2M, 1,6mg/ml protéinase K). Une fois digéré, on ajoute 500µl

de phénol/chloroforme par échantillon que l'on vortexe pendant 30sec à 1min. Le mélange est centrifugé 5min à 14000rpm pour séparer la phase aqueuse (supérieure) et la phase organique (inférieure). La phase aqueuse est récupérée délicatement dans un nouveau tube Eppendorf 1,5ml sans toucher à la phase organique. L'ADN est précipité en ajoutant 1/10 de volume d'acétate de sodium 3M et 2 volumes d'éthanol 100% froid. Après avoir mélangé 2 à 3 fois délicatement par inversement, l'ADN est culotté au fond du tube par centrifugation, 15min à 14000rpm. Le surnageant est éliminé et le culot d'ADN obtenu est lavé avec de l'éthanol 70% puis centrifugé 5min à 14000rpm. L'éthanol 70% est éliminé et le culot est séché jusqu'à l'obtention d'un culot transparent que l'on resuspend dans 100µl d'eau stérile.

3.2.1.2. PCR

Afin d'identifier le génotype des souris, 3 programmes PCR ont été créés. Un programme permettant d'identifier les sites lox présents sur les 2 allèles, un autre permettant d'identifier la présence de la Cre recombinase et un dernier permettant de confirmer l'excision de la partie du gène *shcA*. Liste des amorces utilisées :

Site Lox	GGGCAGGCCTTTGAGTTGCG GGGCTGTAACTCCACCCTAGG
Gène de la Cre recombinase	GCTGCCACGACCAAGTGACAGCAATG GTAGTTATTCGGATCATCAGCTACAC
Excision de ShcA	GCCCAAGCACATCTGAGGCTTTCTG GGGCTGTAACTCCACCCTAGG

3.2.2. Analyse transcriptionnelle

3.2.2.1. Prélèvement des échantillons

Les souris sont anesthésiées avec une dose de 200µl/30g d'un mélange de kétamine/xylazine (250u/125u dans 1,1ml de PBS). Après vérification de l'anesthésie, l'abdomen de la souris est humidifié avec de l'éthanol pour éviter de contaminer les organes avec des poils qui peuvent être porteurs de RNase et DNase. L'abdomen est ouvert jusqu'à la cage thoracique, qui est ensuite éliminée. La souris est alors perfusée avec du PBS RNase/DNase free. Brièvement, l'oreillette droite est incisée et le PBS est injecté doucement dans le ventricule gauche jusqu'à ce que les organes, principalement le foie et les reins, s'éclaircissent. Pour une extraction immédiate, les morceaux d'organes sont placés dans 500µl de TRI reagent (Sigma) sinon les organes sont mis dans un tube Eppendorf 1,5ml, congelés directement dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C jusqu'à utilisation. Les organes sont broyés dans le trizol à l'aide d'un pilon adapté au tube Eppendorf et relié à un moteur qui permet de faire des rotations à grande vitesse. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'aiguilles 18G, puis incubé 5min à température ambiante. La suspension est conservée à -20°C jusqu'à extraction.

3.2.2.2. Extraction d'ARNm

Après décongélation des échantillons sur glace, 200µl de chloroforme sont ajoutés par échantillons. Le mélange est homogénéisé par inversement 4 à 5 fois avant d'être centrifugé 15min à 12000rpm à 4°C. Après centrifugation on obtient 2 phases. Pour certains tissus comme les tissus riches en gras, il est possible d'obtenir jusqu'à 3 phases. Mais seule la phase aqueuse (supérieure) est récupérée délicatement dans un nouveau tube Eppendorf 1,5ml. L'ARN est précipité en ajoutant 500µl d'isopropanol puis centrifugé 10min à 12000rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec de l'éthanol 75% pour éliminer les traces d'isopropanol puis centrifugé 5min à 12000rpm à 4°C. Le culot est séché à température ambiante et repris dans 10 à 20µl d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC).

3.2.2.3. Reverse transcriptase

Les ARN sont dosés par spectrométrie UV pour préparer des solutions de 2µg d'ARN dans un volume de 50µl. Les ARN extraits sont rétrotranscrits en ADN complémentaire à l'aide du Kit « High Capacity cDNA Archive » (Applied Biosystems) selon les instructions du fabricant.

3.2.2.4. PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative consiste à étudier l'amplification d'un produit basée sur la fluorescence durant la réaction de PCR. Elle mesure le nombre de cycles nécessaires (Ct) pour obtenir une quantité fixée de produits d'amplification. Des gènes de référence sont utilisés pour normaliser les résultats. Le plus souvent, on utilise la GAPDH, la sous-unité 18S du ribosome... Les analyses en qPCR en temps réel sont réalisées en utilisant le fluorochrome intercalant à l'ADN, le SYBR® Green I (1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)). Les amorces sont designées avec Universal ProbeLibrary Assay Design Center (<http://www.roche-applied-science.com>) puis les conformations secondaires sont analysées avec Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com>) et blastées sur (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Pour les gènes déjà décrits dans la littérature, les amorces publiées sont également utilisées. Dans d'autres cas, les amorces déjà testées dans la bibliothèque d'amorces de l'école de médecine d'Harvard ont été utilisées (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>), (en Annexe liste d'amorces utilisées). Le Mix de qPCR est composé de 5µl d'ADNc à 5ng/µl ; 10µl de Mix Sybr Green et 1µl d'amorces sens et anti-sens à 7,5µM pour une concentration finale de 300nM. Les réactions de PCR en temps réel sont réalisées dans un appareil 7900 HT (Applied Biosystems). Chaque échantillon est analysé en duplicata. Le programme d'amplification est constitué de trois étapes : activation de l'enzyme à 95°C 10min, dénaturation à 95°C 15s puis amplification à 65°C 1min. Les étapes de dénaturation-amplification sont répétées pendant 40 cycles.

3.2.3. Analyse Protéique

3.2.3.1. Extraction protéique

Les prélèvements pour l'analyse protéique sont effectués de la même manière que pour l'extraction d'ARN (cf Partie 3.2.2.1.). Sauf que les échantillons sont récupérés dans un tampon de lyse (HEPES 10mM ; Triton-X100 1% ; SDS 0,1% ; NaCl 150mM ; EDTA 2mM ; NaF 50mM ; Na₃VO₄ 2mM ; sodium déoxycholate 0,1% ; Na₂HPO₄ 1,53mM ; pH 7,4 avec du

NaH₂PO₄ 10mM) avec des inhibiteurs de protéases, SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablets (Sigma). Les échantillons sont broyés sur glace dans le tampon de lyse puis centrifugés 30min à 12000rpm à 4°C. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube puis dosé par technique colorimétrique de Bradford (Biorad). La concentration est obtenue par lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595nm et rapportée à une gamme étalon d'albumine sérique bovine.

3.2.3.2. Analyse par western-Blot

Les protéines (20 à 80µg) sont mélangées à un volume équivalent de tampon Laemmli 2x (62,5mM Tris-HCl, pH 6,8 ; 25% glycérol ; 2% SDS ; 0,01% bleu de bromophénol) auquel on ajoute 1/20 de volume de β-mercaptoéthanol. Le mélange est homogénéisé puis les protéines sont dénaturées 5 à 10min à 95°C. Les protéines sont ensuite séparées sur gel d'électrophorèse dénaturant (SDS-PAGE) d'une concentration variable en fonction de la taille de la protéine d'intérêt (15% pour les faibles poids moléculaires, 12% pour les poids intermédiaires et 10% pour les hauts poids moléculaires). La migration est effectuée pendant 2h30 à 130V dans un tampon de migration (Tris-HCl, pH 8,5 à 25mM ; glycine 250mM ; SDS 0,1%). Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose tamponnée au préalable dans un tampon de transfert (Tris-HCl 25mM pH 8,5 ; glycine 250mM ; éthanol 20%). Le transfert est effectué à 4°C à 100V pendant 1h45 à 2h30 en fonction de la taille de la protéine d'intérêt et du maillage du gel d'acrylamide). Après le transfert, la membrane est incubée pendant 1h à température ambiante dans un tampon de blocage composé de Tris Buffered Saline, avec 0,05% de Tween® 20, pH 8,0 (Sigma) (TBST) en présence de 5% de lait s'il s'agit de protéines de cellules ou 5% de BSA s'il s'agit de protéines issues d'organes afin de saturer les sites non spécifiques. Les membranes sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du nouveau tampon de blocage. Après incubation, la membrane est lavée 1 fois 10min et 4 fois 5min avec du TBST puis incubée avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase appropriée dilué dans du TBST en présence de 5% de lait (même si le blocage était réalisé avec de la BSA). Les membranes sont ensuite lavées 5 à 8 fois 5min dans du TBST afin d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire. La révélation est réalisée grâce à une réaction de chimiluminescence en utilisant le système ECL et les membranes sont exposées à un film autoradiographique (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech). Le poids moléculaire des bandes spécifiques obtenues est déterminé grâce à la migration d'un marqueur de poids moléculaires connus

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas). L'intensité relative des bandes est déterminée grâce au logiciel Scion.

3.2.4. Phosphorylation in vitro des domaines Zis1 et Zis5 de titine

3.2.4.1. Clonage des domaines Zis1 et Zis5 de titine

- **PCR**

Les domaines Zis1 et Zis5 de titine sont amplifiés à partir d'ADNc de cœur d'embryons de souris âgées de E18,5. Un tag poly-histidine est intégré aux domaines Zis1 et Zis5 en 5' par PCR. Les amorces utilisées pour le clonage sont les suivantes :

Zis1

Amorce sens :

5'-taaa**gaattc**catcatcaccatcaccactccactgcagaattggtggttcaag-3'

Amorce anti-sens :

5'-taaa**ggatcct**aggtagagcttgcattgtcgtctctc-3'

Zis5

Amorce sens :

5'-taaa**gaattc**catcatcaccatcaccaccattgcaagatgtctggatat-3'

Amorce anti-sens :

5'-taaa**ggatcct**acagtgactgagttccatcttc-3'

Les domaines sont insérés dans le plasmide pASK-IBA3 plus (Cadeau de Maria Zeniou) entre les sites *EcoRI* et *BamHI*. Les PCR sont effectuées en utilisant le kit HotStar HiFidelity Polymerase (Qiagen) suivant le protocole du fournisseur.

Programme PCR :

95°C→5min ; (94°C→15 sec ; 52°C→1min ; 72°C→50 sec)*30 cycles ; 72°C→10min.

Après digestion des produits d'amplification par les enzymes *EcoRI* et *BamHI*, la ligation (Kit Takara) du vecteur et de l'insert est réalisée avec le kit Takara selon les recommandations du fournisseur.

- **Milieu de culture**

Le milieu complet LB (milieu Luria Bertani : bacto-tryptone 1%, extrait de levure 0,5%, NaCl 1%) a été utilisé. Les milieux gélosés (sur boîtes de Pétri) ont été obtenus par addition de 15g

d'agar par litre de milieu LB. De plus, ces milieux ont été supplémentés ou non en antibiotiques (ampicilline à 50mg/L).

- **Préparation des bactéries compétentes DH5α**

Une pré-culture de bactéries est réalisée dans 5ml de milieu LB et incubée une nuit à 37°C sous agitation. Cette pré-culture est ensuite diluée au 1/100 dans 100ml de milieu LB et la culture fraîchement ensemencée est incubée à 37°C sous agitation jusqu'à ce que la DO₆₀₀ soit comprise entre 0,3 et 0,6 max. Les bactéries sont alors placées 15 minutes à 4°C. La culture est ensuite centrifugée à 4°C pendant 20min à 3000rpm. Après élimination du milieu LB, les bactéries sont remises en suspension dans 50ml d'une solution de CaCl₂ 100mM froid puis laissées 20 minutes sur glace afin de perméabiliser les membranes. Les bactéries sont centrifugées 20min à 5000rpm. Le culot est remis en suspension dans 1ml d'une solution de CaCl₂ 100mM froid et incubé 30 minutes sur glace. Les bactéries ainsi préparées sont dites compétentes, c'est-à-dire capables d'incorporer de l'ADN exogène. Les bactéries compétentes peuvent ensuite être conservées à -80°C.

- **Transformation des bactéries DH5α**

Un tube de 50μL de bactéries compétentes (conservées à -80°C) est placé dans la glace. Puis l'ADN plasmidique est mélangé doucement aux bactéries compétentes. Après une incubation d'une demi-heure sur glace, les bactéries fragilisées sont placées pendant 45sec à 42°C. Ce choc thermique crée des pores dans les membranes bactériennes par lesquels l'ADN d'intérêt peut entrer. 500μL de milieu LB sont ajoutés. Une incubation d'une heure à 37°C permet la reprise de la culture bactérienne et l'expression du gène de la résistance à l'ampicilline. Puis chaque transformation est étalée sur milieu LB solide (+ Ampicilline 50mg/ml) de façon stérile. Les boîtes de Pétri sont placées toute la nuit à 37°C.

- **Extraction d'ADN plasmidique Mini Prep (Qiagen)**

Ce kit permet de purifier à partir d'une petite quantité de bactéries, 1-2μg de plasmide d'ADN recombinant, après lyse de la paroi bactérienne, digestion enzymatique des ARNs et précipitation de l'ADN plasmidique (protocole du fournisseur).

- **Digestion par des enzymes de restriction**

Compte tenu de la carte de restriction des plasmides, des sites de restriction spécifiques ont été déterminés afin de vérifier la nature des plasmides utilisés. Le nombre et la taille des fragments d'ADN issus de la digestion enzymatique sont vérifiés par migration électrophorétique du plasmide recombinant sur gel d'agarose 0,7%.

- **Electrophorèse sur gel d'agarose**

Les fragments d'ADN sont analysés selon leur poids moléculaire par migration sur gel d'agarose 0,7% dans du tampon de migration TAE 5X (Tris-HCl 10mM ; EDTA 1 mM ; acide acétique froid ; pH 8). Un marqueur de poids moléculaire (1kb DNA Ladder, Promega) permet de déterminer la taille des fragments analysés. À pH=8 (pH de la solution tampon), l'ADN est chargé négativement et migre vers l'anode. Après migration, les acides nucléiques sont colorés au bromure d'éthidium (BET), un réactif intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice ce qui rend l'ADN fluorescent sous éclairage UV.

- **Purification des plasmides**

Une fois construite, la séquence de ces plasmides a été vérifiée par une carte de restriction puis par séquençage (GATC biotechnologie, Allemagne). Les purifications de plasmides pour les transfections ont été effectuées avec un kit Midiprep (Qiagen).

3.2.4.2. Expression et purification des fragments Zis1 et Zis5 dans la bactérie

- **Expression des fragments Zis1 et Zis5 dans la bactérie**

Les DH5 α sont transformées avec chaque plasmide, une pré-culture est réalisée dans 2ml de LB+ampicilline toute la nuit. 50ml de LB+ampicilline sont ensuite inoculés avec 100 μ l de pré-culture et incubés sous agitation à 37°C jusqu'à ce que la DO₆₀₀ atteigne 0,5. L'expression des fragments Zis1 et Zis5 est induite pendant 5h par ajout d'anhydrotétracycline (2mg/ml dans l'éthanol) (IBA) pour avoir une concentration finale de 200 μ g/L. L'induction de l'expression des fragments est vérifiée par Western Blot suivie d'une coloration au bleu de Coomassie. Après migration, les gels sont fixés dans une solution de fixation (10% v/v d'acide acétique ; 25% d'isopropanol et 65% H₂O) pendant 30min à température ambiante. Les gels sont ensuite incubés 2h dans une solution de Bleu de Coomassie (10% v/v acide acétique ; 0,006% w/v Coomassie brilliant blue G-250 ; 90% H₂O). Les gels sont ensuite décolorés dans une solution d'acide acétique 10% le temps nécessaire. Un Western Blot avec un anticorps anti-poly-histidine a également été réalisé pour vérifier la présence du Tag.

- **Purification des fragments Zis1 et Zis5 sur colonne Nickel**

La purification sur colonne Nickel a été effectuée en utilisant le kit Invitrogene selon les recommandations du fabricant.

3.2.5. Histologie

3.2.5.1. Préparation des échantillons

Les animaux sont anesthésiés avec 200µl/30g d'un mélange de kétamine/xylazine (250u/125u dans 1,1ml de PBS). Après vérification de l'anesthésie, les organes sont prélevés et rincés dans du PBS pour éliminer un maximum de sang avant d'être fixés dans du PFA 4% (pour les immunomarquages) ou dans de la formaline tamponnée (pour les colorations d'histologie) pendant 24h. Après la fixation, les échantillons sont conservés dans de l'éthanol 70% jusqu'à inclusion dans la paraffine.

3.2.5.2. Inclusion en paraffine

L'inclusion en paraffine permet de rigidifier le tissu en l'imprégnant de paraffine. Cela va permettre de réaliser des coupes fines et régulières allant jusqu'à 5µm d'épaisseur. Pour cela les tissus subissent des bains de pourcentage croissant en éthanol allant de 70% jusqu'à 100% puis un bain d'histosol afin d'éliminer l'eau et l'éthanol qui ne sont pas miscibles à la paraffine. Une fois fixés, les tissus sont orientés dans un moule rempli de paraffine afin de réaliser des sections dans les plans désirés. Le bloc de paraffine obtenu est placé sur un microtome afin de réaliser des coupes de 5µm. Les coupes sont récupérées sur des lames en verre superfrost plus (VWR, France) et maintenues avec une solution de gélatine.

3.2.5.3. Colorations Histologiques

- Coloration Hématoxyline et Eosine

Les colorations sont effectuées à l'IGBMC avec un automate. La coloration Hématoxyline/Eosine (H/E) met en évidence les noyaux en bleu, violet foncé à noir et le cytoplasme, le collagène et la kératine en rouge. Brièvement, les lames sont réhydratées dans des bains de pourcentage décroissant en éthanol puis dans l'eau. Les lames sont ensuite plongées dans une solution d'hématoxyline de Harris pendant 3min puis rincées à l'eau du robinet pendant 3min et décolorées dans une solution d'alcool acide (1ml HCl 37% dans 70% éthanol) pendant 2sec. Après lavage à l'eau du robinet pendant 3min les lames sont plongées dans une solution d'éosine 0,1% pH 4-5 pendant 30sec et rincées à l'eau. Les échantillons sont alors déshydratés dans des bains d'éthanol et montés entre lame et lamelle avec de l'Eukitt (Labonord).

- Coloration Trichrome de Masson

Cette coloration met en évidence les noyaux en bleus, les cytoplasmes en rose/rouge/violet et les fibres de collagène en vert. Les lames préparées sont colorées par l'hématoxyline de Harris pendant 3min, rincées à l'eau courante et colorées à la fuchsine ponceau (1 vol de fuchsine acide 1% avec 2 volumes de ponceau de xylidine 1% dilué dans l'acide acétique 1%). Après lavage à l'eau courante, les échantillons sont plongés pendant 3min dans une solution d'acide phosphomolybdique à 5mg/ml dilué dans l'eau distillée. Après une décoloration rapide à l'eau acétifiée les lames sont colorées par une solution de vert lumière pendant 3 min (10mg/ml dans de l'eau acétifiée 1%). Les échantillons sont à nouveau décolorés dans une solution d'eau acétifiée 1%. Ils sont ensuite déshydratés par des bains successifs d'éthanol puis montés entre lame et lamelle avec de l'Eukitt.

3.2.6. Microscopie électronique

Les échantillons et les observations au microscope électronique sont effectuées à l'IGBMC dans le service de microscopie électronique par le Dr. Messadeck. Brièvement, les échantillons sont fixés par immersion dans 2,5% de glutaraldéhyde et 2,5% de Para-formaldéhyde dans un tampon Cacodylate (0,1M, pH 7,4), puis post-fixés dans 1% de tétroxyde d'osmium dans 0,1M de tampon cacodylate pendant 1h à 4°C. Les échantillons sont ensuite déshydratés par un gradient d'alcool (50,70, 90,100%) puis immergés dans de l'oxyde de propylène pendant 30min. Les échantillons sont ensuite inclus dans de l'Epon 812. Des coupes semi-fines de 2µm sont effectuées à l'aide d'un ultra-microtome (Leica Ultracut UCT) et colorées au bleu de Toluidine puis analysées par microscopie photonique. Des coupes ultra-fines de 70nm sont réalisées et contrastées avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb. Ces coupes sont observées à 70kv avec un microscope électronique Morgagni 268D. Les captures d'image sont réalisées par une camera mega view III (Soft imaging System).

3.2.7. Immunomarquage

- Immunohistochimie sur coupes transversales d'aortes de souris fixées dans le para-formaldéhyde incluses dans la paraffine

Les coupes transversales d'aorte incluses dans la paraffine sont déparaffinées par de l'Histosol (shandon) et hydratées avec des bains successifs d'éthanol (100%, 95%) puis dans

l'eau. Une étape de démasquage des épitopes est réalisée, les coupes d'aortes sont immergées dans un bain d'acide citrique 0,01M pH 6 puis bouillies au micro-onde 4min à 900W. Une fois la solution refroidie pendant 15min à température ambiante, les lames sont immergées dans un bain de TBST 0,05% pendant 3min. Les coupes d'aortes sont délimitées à l'aide d'un stylo hydrophobe. Les sites non spécifiques sont bloqués pendant 1h à température ambiante avec un sérum de chèvre 2% dans du TBST dans une chambre humide afin d'éviter que les coupes sèchent. Les coupes sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire polyclonal anti-ShcA (# 06-203, Upstate) dilué au 1/100 dans la solution de blocage toute la nuit à 4°C dans une chambre humide. Puis elles sont lavées 2 fois 5min dans du TBST 0,05% avant d'être incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (Rhodamine Red-X-affinipure anti-IgG de lapin, # 111-296 047 ; Jackson Immunoresearch) dilué au 1/500 dans une solution de TBST 0,05% contenant 2% de sérum de chèvre. Les coupes sont lavées 2 fois 5min dans du TBST 0,05% puis une fois à l'eau distillée pendant 5min. Elles sont ensuite montées entre lame et lamelle avec quelques gouttes d'une solution de Vectashield contenant du DAPI 1/10000 puis scellées avec du vernis à ongle. Les lames sont observées sur un microscope à fluorescence (Leica DMRX).

3.2.8. Mesure des paramètres hémodynamiques de la souris

3.2.8.1. Mesure de la pression artérielle systolique chez la souris

Le principe de fonctionnement du dispositif est basé sur la méthode non-invasive (la pléthysmographie), ce qui a pour avantage de préserver les animaux lors de l'expérience. La mesure de la pression se fait selon le même principe que pour la mesure de la pression artérielle chez l'homme. Une pression contrôlée est appliquée sur l'artère de la queue du rongeur par le gonflement d'un ballonnet et simultanément le rythme cardiaque est mesuré par un détecteur. La pression induite par le ballonnet augmente jusqu'à la disparition du signal du rythme cardiaque. La pression est alors relâchée. Lorsque le signal du rythme cardiaque est de nouveau perçu, la valeur de pression correspond à la pression systolique. La pression artérielle est mesurée tous les jours sur une période de 15 jours. La méthode de mesure indirecte nécessite l'utilisation d'une plaque chauffante afin de permettre la vasodilatation de l'artère, afin d'augmenter la qualité du signal.

3.2.8.2. Echographie

Les échographies transthoraciques sont réalisées sur des souris de 2, 3 et 9 mois par le Pr. Monassier à l'aide d'un Sonos 5500 échocardiographe et un transducteur linéaire de 15 MHz (Philips). Les souris sont anesthésiées par voie gazeuse avec de l'isoflurane (2% dans de l'O₂), la température des animaux est maintenue à 37°C, et une partie du thorax est épilé. La sonde à ultrasons est fixée sur un socle de support et orientée manuellement dans une position parasternale petit axe. Le mouvement et l'épaisseur de la paroi ventriculaire gauche antérieure et postérieure, ainsi que des diamètres ventriculaires sont évalués à partir d'au moins trois images acquises en 2D classique guidé en mode M (200mm/s). La fraction de raccourcissement (FC) est calculée selon la formule de Teichholz (Jakobsen et al., 2006).

$$FC = \frac{(\text{Diamètre du ventricule gauche en diastole} - \text{Diamètre du ventricule gauche en systole})}{\text{Diamètre ventricule gauche en diastole}} \times 100$$

3.2.8.3. Réactivité vasculaire

Les mesures de réactivité vasculaire ont été effectuées avec le système de myographe à microvaisseaux (DMT620M Multi Chamber Myograph w/Touch Screen ; ADInstruments) en utilisant des aortes de souris. Immédiatement après le sacrifice de la souris, l'aorte est prélevée et isolée du tissu adipeux puis coupée en segments de 1,5 à 2mm avant d'être immergée dans un tampon Krebs (118mM NaCl ; 4,65mM KCl ; 25mM NaHCO₃ ; 2,5mM CaCl₂ ; 1,18mM MgSO₄ ; 1,18mM KH₂PO₄ ; 5,5mM glucose) et oxygéné (95% O₂, 5% CO₂ pour maintenir un pH 7,4). Les extrémités des fils sont attachées sur les supports du myographe à microvaisseaux. Un des supports est relié à un transducteur de force et l'autre à un micromètre gradué. Les étirements sont enregistrés sous forme de tension par un ordinateur en utilisant un système d'acquisition de données par le logiciel LabChart (ADInstrument). Le segment d'aorte est baigné dans 5 ml de solution de Krebs oxygénée. La solution est changée toutes les 15min environ. Le vaisseau est d'abord étiré durant une période de 10min puis laissé au repos sans tension 10min. Cette opération est répétée trois fois consécutives afin d'éviter les phénomènes d'hystérèse. Nous effectuons ensuite des étirements cumulatifs de 50µm avec une période de stabilisation (~ 3min) entre chaque étirement. Nous distendons le vaisseau jusqu'à atteindre ~ 2 à 3mN/mm (1mN = 102mg) dépendamment du diamètre du segment vasculaire. Ceci nous permet de tracer une courbe longueur-tension passive spécifique au vaisseau. La longueur d'étirement nécessaire est

déterminée de façon à obtenir une circonférence équivalente à une tension passive de 60mmHg sur le vaisseau suivant la loi de Laplace. Après une équilibration du vaisseau pendant 30min, la réactivité du segment vasculaire est évaluée par l'application de 80mM de KCl. Une fois le plateau de réponse atteint, nous vérifions si l'endothélium est encore présent en ajoutant 10^{-5} M d'acétylcholine, un agoniste cholinergique vasodilatateur endothélium dépendant. La solution de Krebs est ensuite changée plusieurs fois avant de laisser le vaisseau au repos 60min. À ce moment, on effectue une gamme croissante de phényléphrine (10^{-9} ; $3 \cdot 10^{-9}$; 10^{-8} ; $3 \cdot 10^{-8}$; ..., jusqu'à l'effet Max).

Résultats

4. Résultats

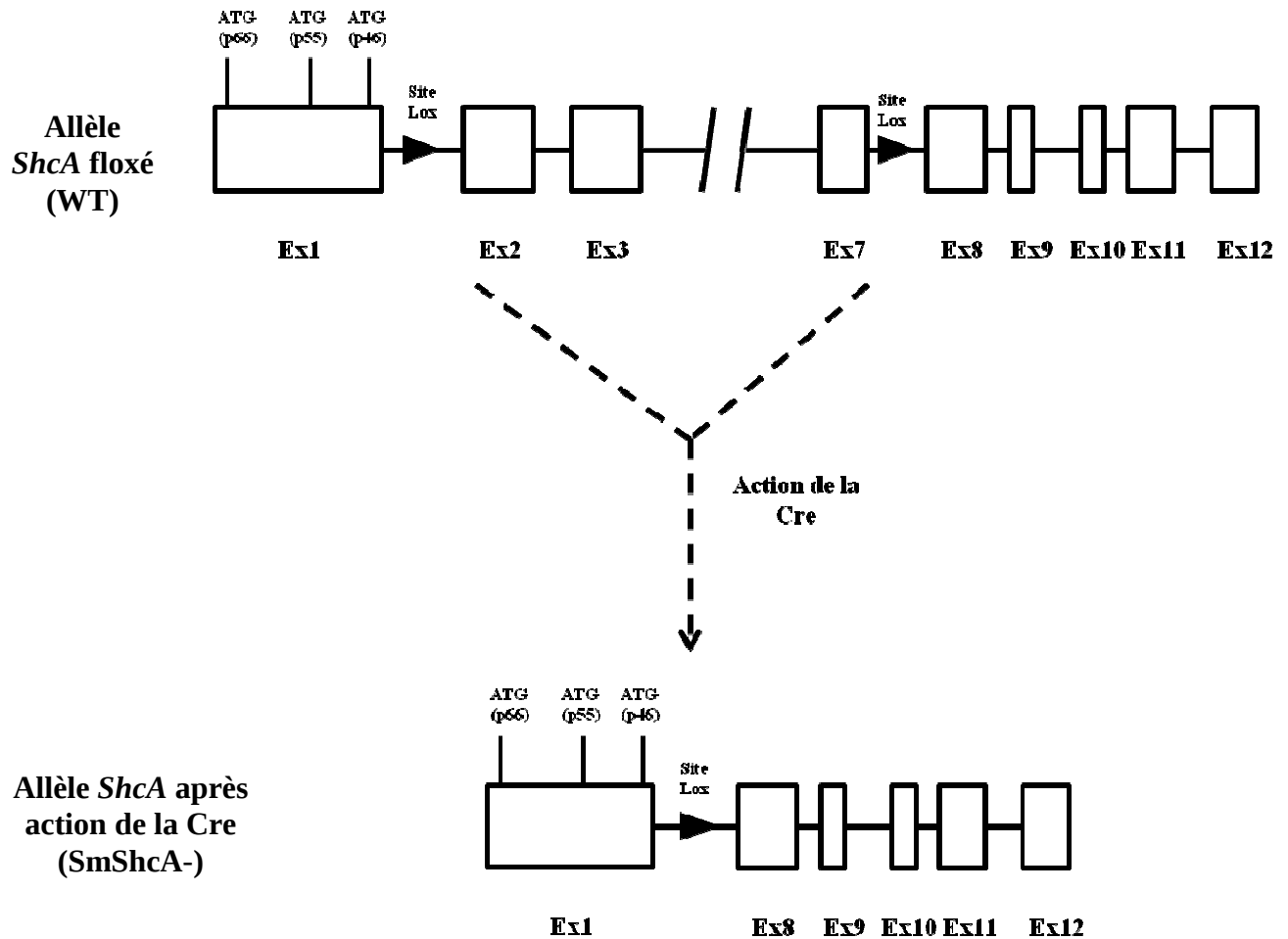
4.1. Caractérisation phénotypique des souris déficientes en ShcA dans le cœur

Afin d'étudier le rôle de ShcA dans le cœur nous avons utilisé le promoteur Sm22 qui est activé très tôt durant l'embryogénèse dans le cœur à E7,5 (Li et al., 1996) ;(Yang et al., 2010).

4.1.1. Génération des souris déficientes en ShcA dans le cœur

Les souris ShcA floxées ont été réalisées dans notre laboratoire par le Dr Matz. Le gène *ShcA* comporte 12 exons. Afin d'exciser ce gène, des sites lox ont été insérés entre l'exon 1 et 2 et entre les exons 7 et 8 ce qui correspond au domaine PTB de ShcA. Après action de la Cre recombinase (Cre), les exons 2 à 7 seront excisés ce qui induira l'expression d'une protéine ShcA tronquée sans domaine PTB (que nous appellerons ici p34) (figure 14 (A)). Pour invalider spécifiquement le gène *ShcA* dans le système cardiovasculaire nous avons fait exprimer le gène de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur Sm22. La vérification de la présence de la Cre recombinase et de l'excision de *ShcA* est réalisée par PCR sur de l'ADN génomique de souris (Figure 14 (B)). Ces PCR permettent d'identifier la présence des sites lox sur les deux allèles, celle du gène de la Cre recombinase avec un contrôle interne d'amplification et l'excision des exons 2 à 7. Dernièrement, le promoteur Sm22 a été couramment utilisé pour invalider l'expression des gènes dans le système cardiovasculaire (Langlois et al., 2010; Malhowski et al., 2011).

A



B

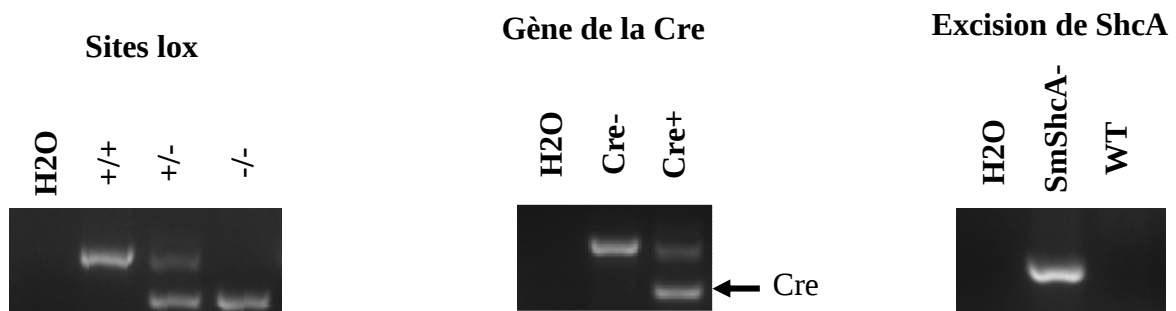


Figure 14 : Détermination du génotype des souris SmShcA⁻. **(A)** Représentation des allèles des souris ShcA floxées (WT) et des souris ShcA floxées après action de la Cre recombinase (SmShcA⁻). Ex1 : Exon1 **(B)** Analyse par PCR de la présence des sites lox sur les 2 allèles de la souris (+/+ : lox/lox ; +/- : lox/sauvage ; -/- : sauvage/sauvage), du gène de la Cre recombinase (Cre) et du gène tronqué de ShcA dans le génome de la souris, H₂O : contrôle négatif.

4.1.1.1. Expression de ShcA dans le cœur

Les précédentes études sur le rôle de ShcA dans l'embryogenèse n'ont pas mis en avant d'anomalie cardiaque avant E11,5 (Lai and Pawson, 2000). Nous avons donc choisi deux points de cinétique à E14,5 et à E18,5 pour vérifier l'excision de ShcA. Le 14ème jour de développement (E14,5) correspond à la fin de la compaction des ventricules et à la fin de la séparation des deux oreillettes (Savolainen et al., 2009). E18,5 correspond à la fin du développement des poumons de la souris ce qui rend les embryons viables hors de l'utérus. Nous avons donc vérifié par Western Blot l'excision de ShcA à E14,5, E18,5 et à l'âge adulte. Pour cela les cœurs des souris sont récupérés et préparés pour un Western Blot (figure 15).

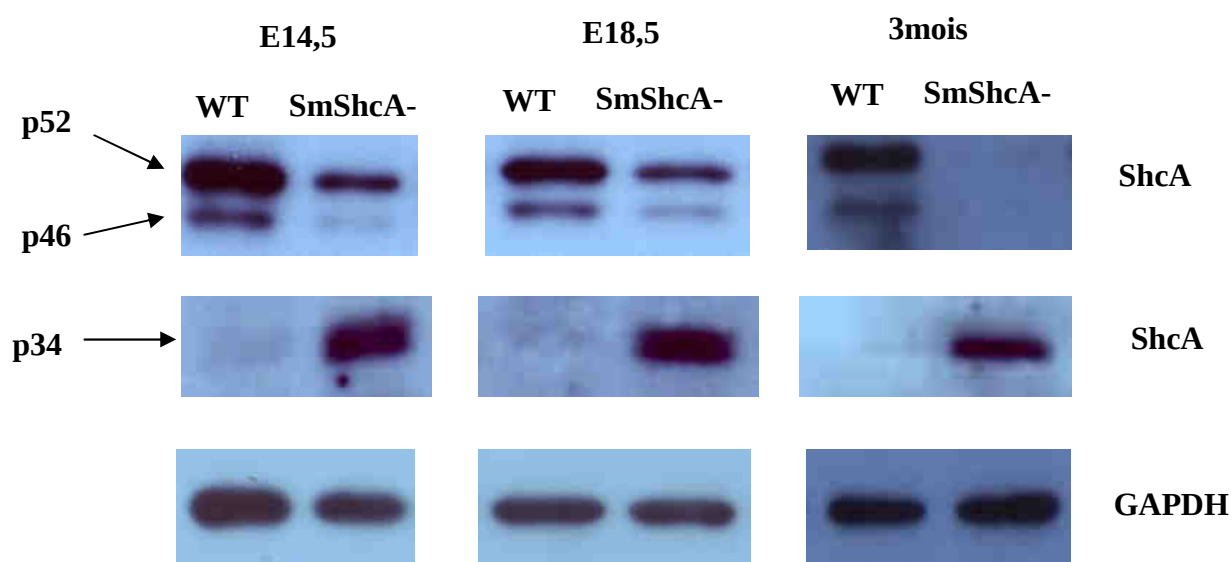


Figure 15 : Excision de ShcA dans le cœur à E14,5, E18,5 et 3 mois. Analyse par Western blot de l'excision de ShcA dans le cœur des souris Sm22ShcA-. WT= souris contrôle ; SmShcA- = souris qui exprime la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur Sm22.

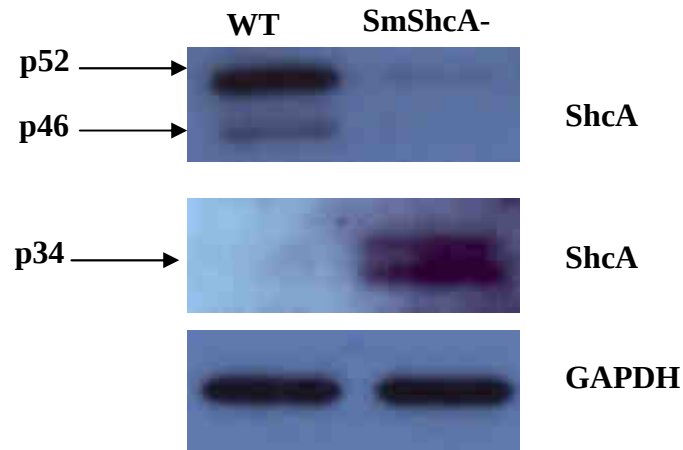
Une légère expression de ShcA est observée chez les souris SmShcA- mais cela provient de l'expression dans les autres cellules qui composent le myocarde (fibroblastes, cellules endothéliales,...). De plus, la présence de la protéine ShcA tronquée (p34) nous confirme l'action de la Cre recombinase dans le lysat de cœur des souris SmShcA- à E14,5, E18,5 et à 3 mois. Ces résultats valident le modèle Sm22ShcA- comme étant le modèle où le

domaine PTB de ShcA est supprimé dans le cœur. La souris SmShcA- est le premier modèle de souris viable qui n'exprime plus le domaine PTB de ShcA dans le cœur à partir de E7,5.

4.1.1.2. Expression de ShcA dans les cellules musculaires lisses vasculaires

Le promoteur Sm22ShcA est également exprimé dans les cellules musculaires lisses vasculaires dans l'aorte dorsale à partir de E9,5 (Li et al., 1996); (Yang et al., 2010) donc les souris SmShcA- n'expriment également plus ShcA dans les cellules musculaires lisses des parois vasculaires. Un western blot réalisé sur des aortes entières de souris de 3 mois SmSchA- et contrôle (WT) nous montre bien une diminution de l'expression de ShcA et la présence de la protéine tronquée ShcA. La résolution de ce western blot nous permet de dire qu'il y a bien 2 isoformes tronquées de ShcA correspondant aux l'isoformes p52 et p46 tronquées (Figure 16 (A)). L'immunohistochimie réalisée sur des coupes transversales d'aortes de souris âgées de 3 mois, montre bien qu'il n'y a pas de marquage au niveau de la media, alors que le marquage au niveau de l'endothélium est toujours présent. Cela nous confirme l'excision spécifique de ShcA dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Cependant, l'anticorps utilisé pour identifier la protéine tronquée de ShcA semble peu ou pas spécifique en immunohistochimie (Figure 16 (B)).

A



B

WT

SmShcA-

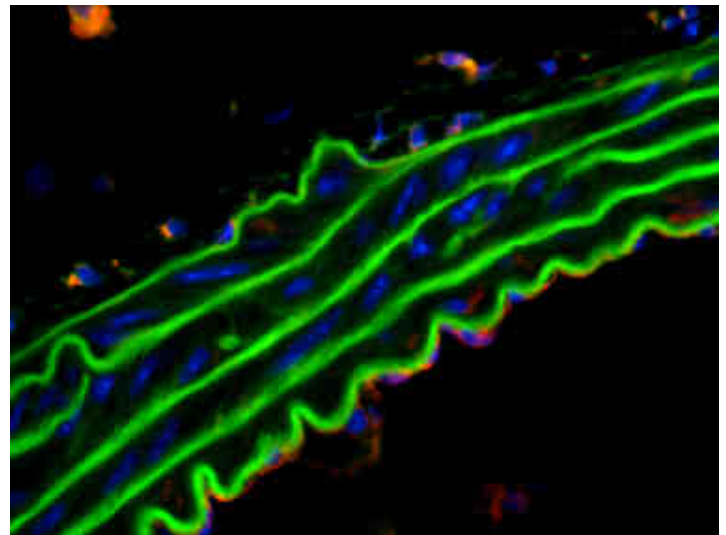
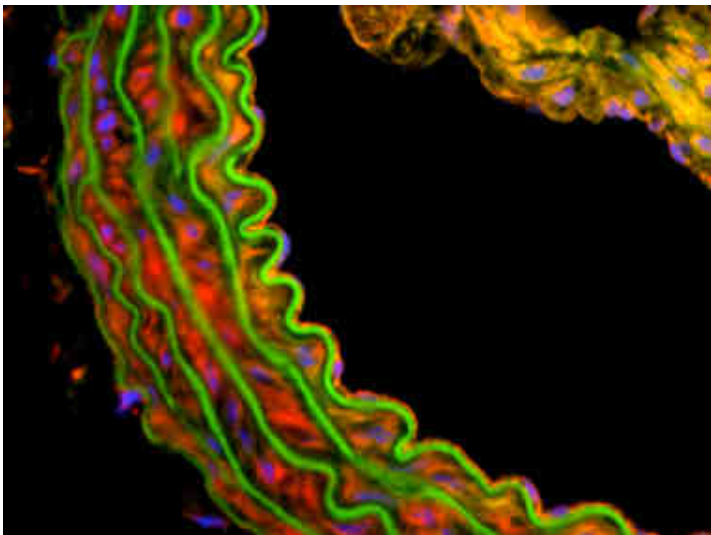


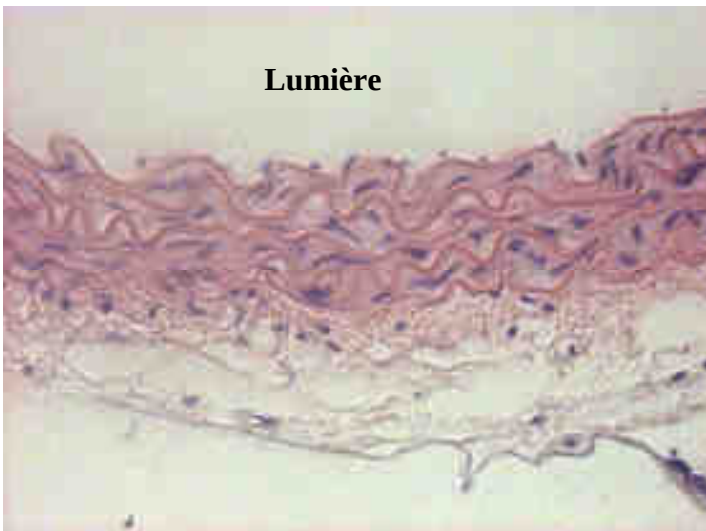
Figure 16 : Expression de ShcA dans les cellules musculaires lisses vasculaires. **(A)** Analyse par Western blot de l'excision de ShcA dans l'aorte des souris Sm22ShcA-. WT= souris contrôle ; SmShcA- = souris qui exprime la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur Sm22 **(B)** Immunomarquage de ShcA dans les aortes de souris SmShcA-. WT= souris contrôle ; SmShcA- = souris qui exprime la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur Sm22. En rouge marquage de ShcA, Bleu Noyau, Vert : lames élastiques. Grossissement x32.

4.1.2. Caractérisation phénotypique vasculaire des souris SmShcA-

4.1.2.1. Absence d'anomalie histologique des aortes de souris SmShcA-

Les observations microscopiques des coupes histologiques d'aorte de souris SmShcA- n'ont pas mis en évidence de différences structurales (figure 17). Aucune anomalie n'a été observée, ni au niveau de l'épaisseur des aortes de souris SmShcA-, ni au niveau de l'organisation des fibres élastiques.

WT



SmShcA-



Figure 17 : Histologie des aortes de souris SmShcA-. Coloration H/E de coupe transversales d'aortes de souris contrôle (WT) et SmShcA- âgées de 3 mois. Photo prise au microscope. Grossissement x22.

4.1.2.2. Réactivité vasculaire

L'étude de la réactivité vasculaire a été effectuée sur des aortes isolées de souris contrôle (WT) et de souris SmShcA- (figure 18). L'absence de ShcA dans les cellules musculaires lisses vasculaires n'induit pas de différence dans la réponse à la phényléphrine, un agoniste sélectif $\alpha 1$ -adrénergique qui à un effet vasoconstricteur.

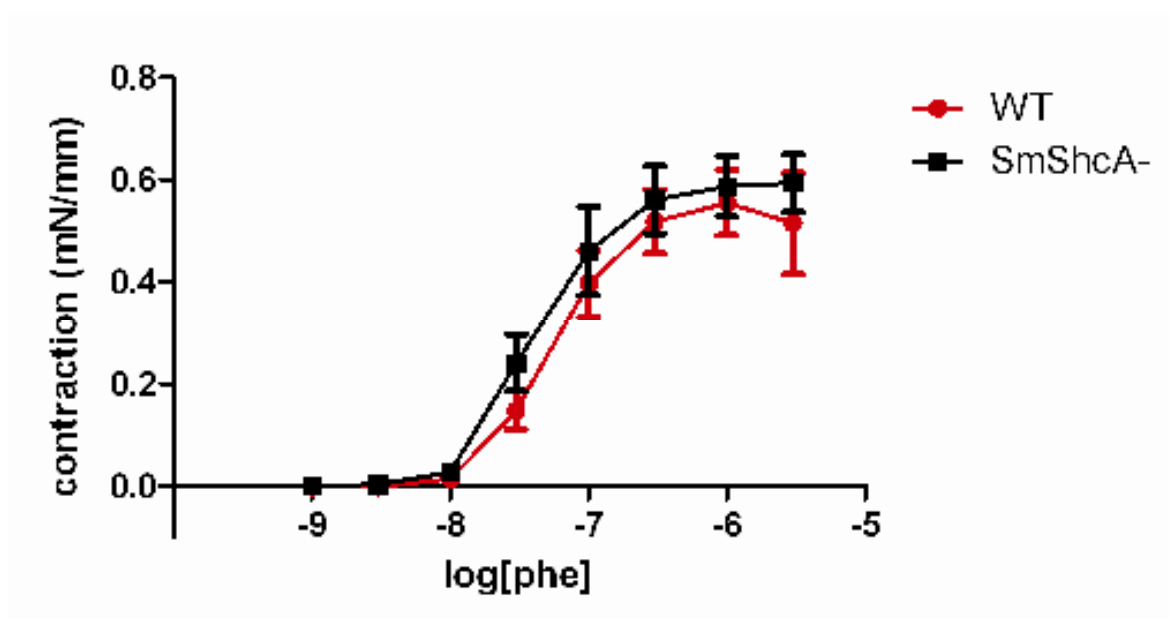


Figure 18 : Réactivité vasculaire des souris SmSchA-. Cumulative de phényléphrine sur préparation d'aorte de souris de souris contrôle (WT) et de souris Sm22ShcA- âgées de 3 mois (n=4 par groupe)

4.1.3. Caractérisation phénotypique cardiaque des souris SmShcA-

4.1.3.1. L'absence de ShcA est associée à une augmentation de la mortalité et au développement d'une pathologie œdémateuse

Les souris Sm22Shc- ne présentent aucune différence morphologique à la naissance, le rapport mendélien au sevrage (15 jours) est respecté avec 47% de souris SmShcA- et 53% de souris WT (Figure 19 (A)). Cependant, avec l'âge on observe une augmentation de 15% de la mortalité chez les souris SmShcA- indépendamment du sexe (Figure 19 (B)). Certaines souris présentent également des œdèmes aux pattes (Figure 19 (C)).

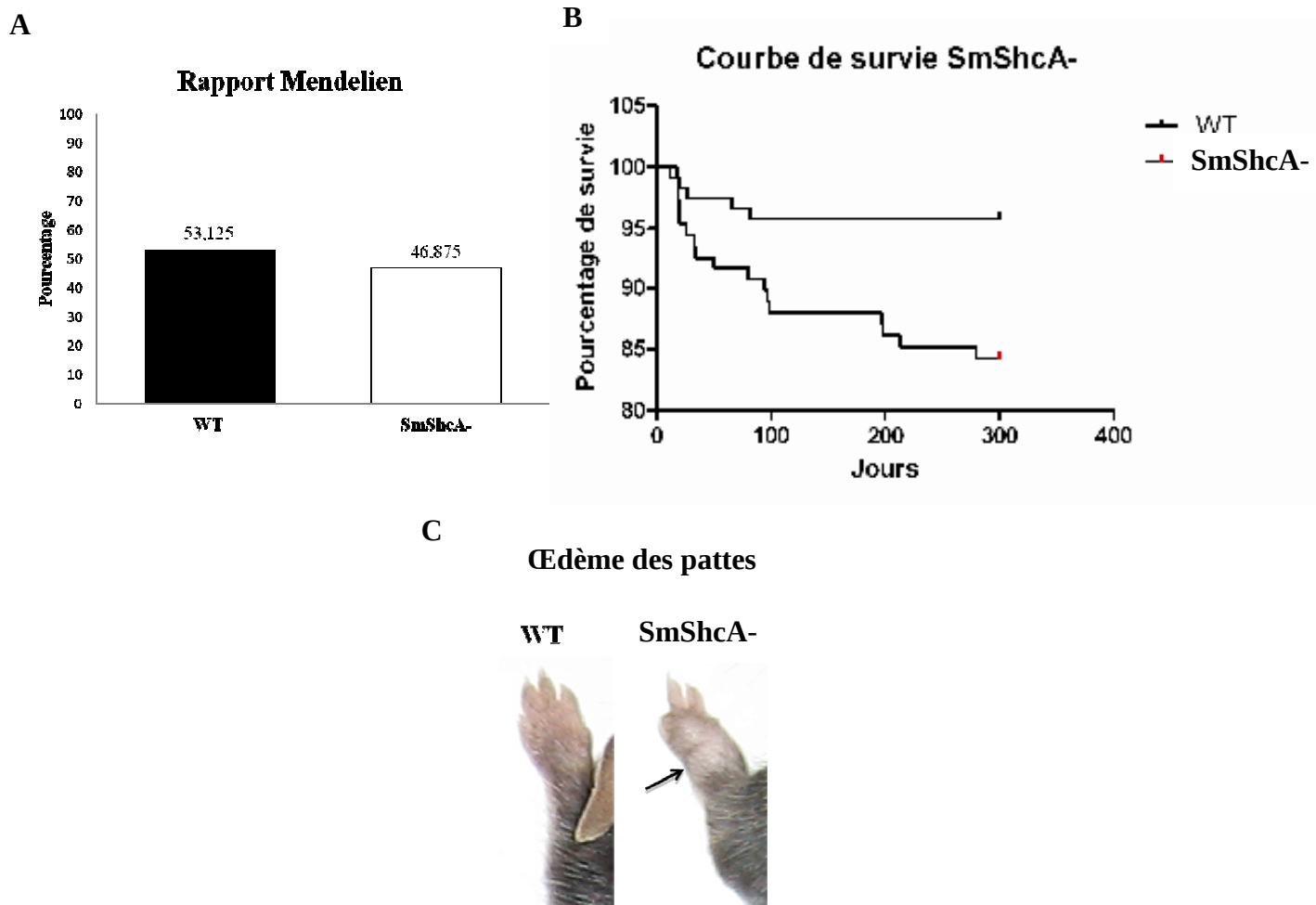


Figure 19 : Manifestation de l'insuffisance cardiaque chez les souris SmShcA-. (A) Rapport mendélien de la lignée de souris SmShcA- effectué sur 160 animaux. (B) Courbe de régression de Kaplan-Meier de la lignée SmShcA- (n=100 souris/groupe). (C) Photographie de la patte gauche antérieure de souris âgées de 9 mois. Flèche : œdème.

4.1.3.2. L'absence de ShcA induit une cardiomégalie

Les souris SmShcA- âgées de 9 mois présentent une cardiomégalie sévère (figure 20(A)). Le rapport poids du cœur sur poids de la souris nous montre une augmentation significative du poids des cœurs des souris SmShcA- pouvant atteindre le double du poids de cœur d'une souris normale (Figure 20 (B)).

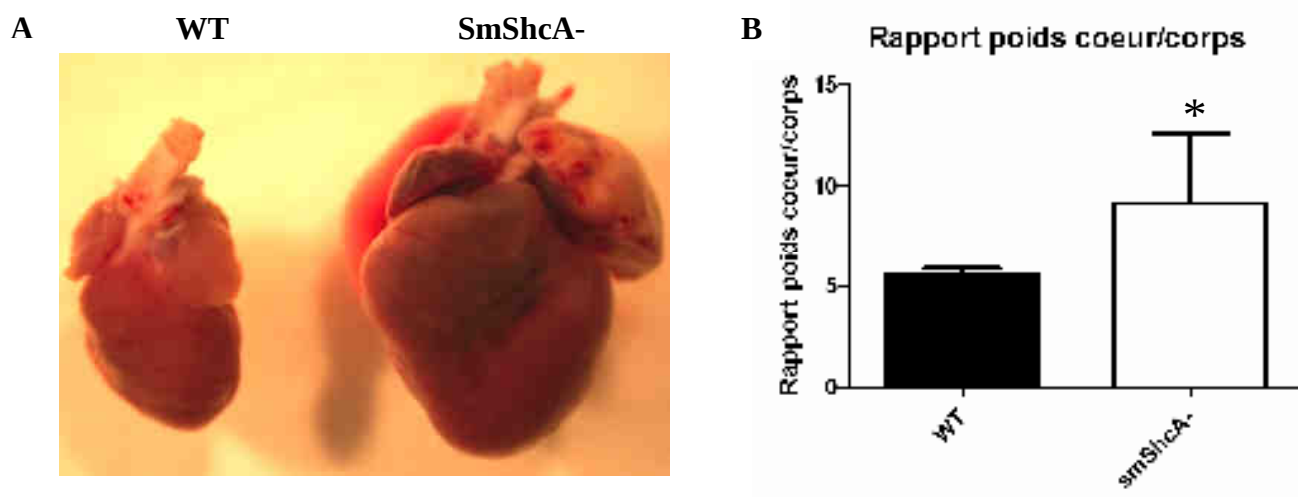


Figure 20 : Cardiomégalie des souris de 9 mois SmShcA-. (A) Photographie de cœurs de souris contrôle (WT) et SmShcA- âgées de 9 mois. (B) Rapport poids du cœur sur poids des souris (en mg/g) (n=6-7), animaux âgés de 9 mois. Moyenne $\pm$ SD; * $P < 0.05$.

L'étude des cœurs de souris a révélé que la cardiomégalie se développe rapidement dès l'âge de 3 mois (figure 21).

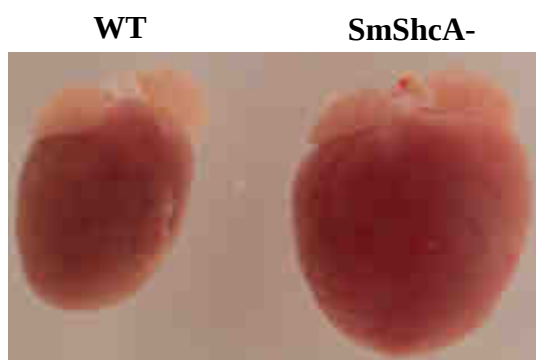


Figure 21 : Cœurs des souris de 3 mois SmShcA- et contrôle (WT). Photographie représentative des cœurs de souris SmShcA- et contrôle (WT) âgées de 3 mois (n=4).

L'absence de ShcA dans le cœur entraîne donc une cardiomégalie qui s'accompagne d'un taux de mortalité plus élevé. Afin de caractériser au mieux le phénotype de ces souris, nous avons réalisé une analyse des paramètres hémodynamiques.

4.1.4. Caractérisation des paramètres hémodynamiques

4.1.4.1. Augmentation de la pression artérielle des souris SmShcA-

Afin de vérifier l'origine du phénotype cardiaque des souris SmShcA-, nous avons effectué des mesures de pression artérielle chez l'animal vigile par pléthysmographie. Les résultats nous montrent que les souris SmShcA- âgées de 3 et 9 mois présentent une augmentation de la pression artérielle systolique (PAS) par rapport aux souris contrôles, 101 ± 2 vs 88 ± 2 mmHg et $101,3 \pm 1,75$ vs $88,43 \pm 1,641$ mmHg (Figure 22). L'analyse de la fréquence cardiaque chez l'animal vigile n'a pas révélé de différence entre les souris SmShcA- et les souris contrôles $556,3 \pm 15,78$ vs $555,0 \pm 15,78$ mmHg.

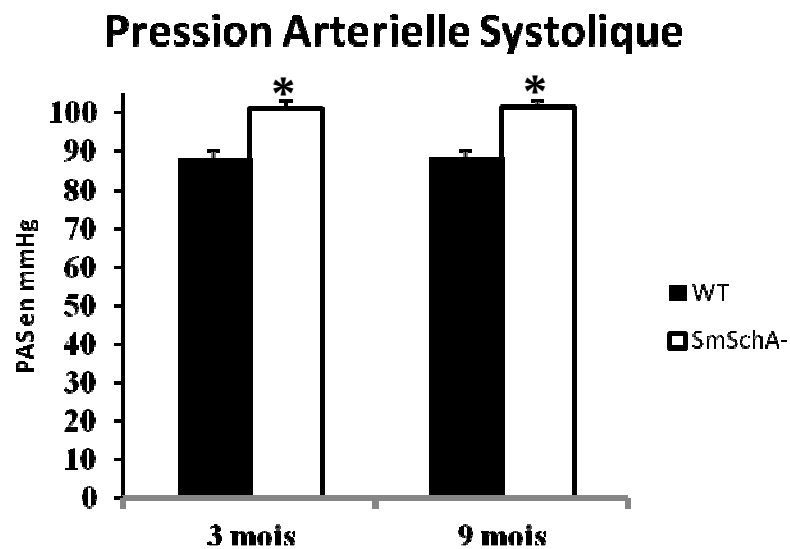


Figure 22 : Pression artérielle systolique des souris Sm22ShcA-. Mesure de la pression artérielle systolique (mmHg) par pléthysmographie au niveau de la queue des souris contrôles (WT) ou déficientes en ShcA dans le cœur (SmShcA-) âgées de 3 mois et 9 mois, n=10 souris/groupe.

4.1.4.2. Perte de la contractilité et dilatation ventriculaire des souris SmShcA-

Pour étudier la fonction cardiaque, nous avons effectué des échographies sur des souris âgées de 3 et 9 mois. Les images d'échographie cardiaque nous montrent une dilatation du ventricule gauche chez les souris SmShcA- dès l'âge de 3 mois (figure 23). Une perte de la contractilité chez les souris SmShcA- a également été observée avec une diminution de la

fraction de raccourcissement du ventricule gauche (Figure 24). Certaines souris présentent également des zones hypokinétiques.

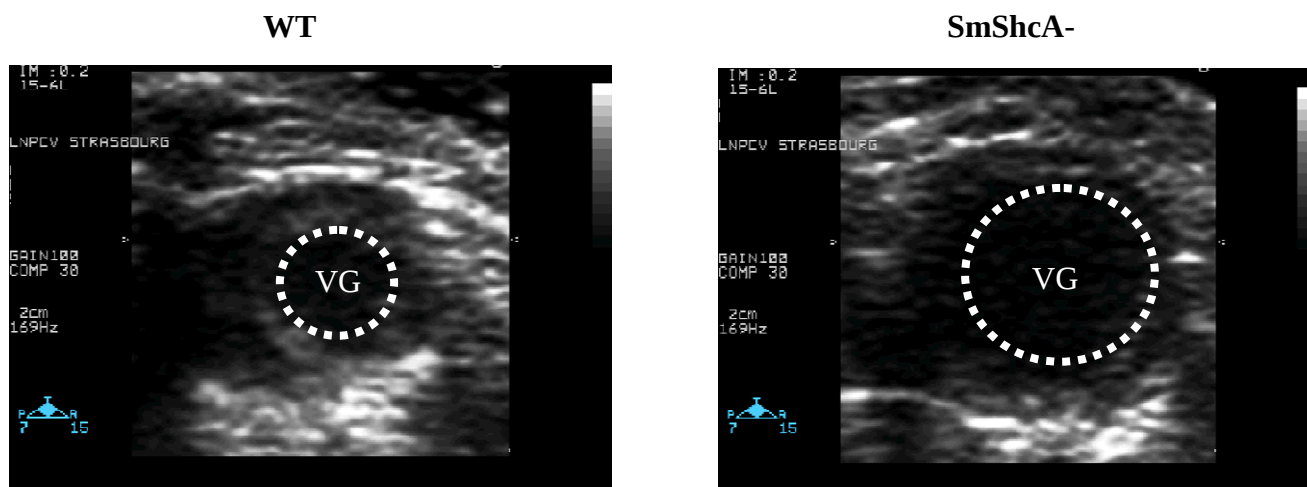


Figure 23 : Dilatation des ventricules des souris SmShcA- . Echographie transthoracique de cœur de souris âgées de 9 mois. Représentation échographique en mode 2D d'une coupe transversale de cœur de souris contrôle (WT) et SmShcA-. VG : Ventricule gauche.

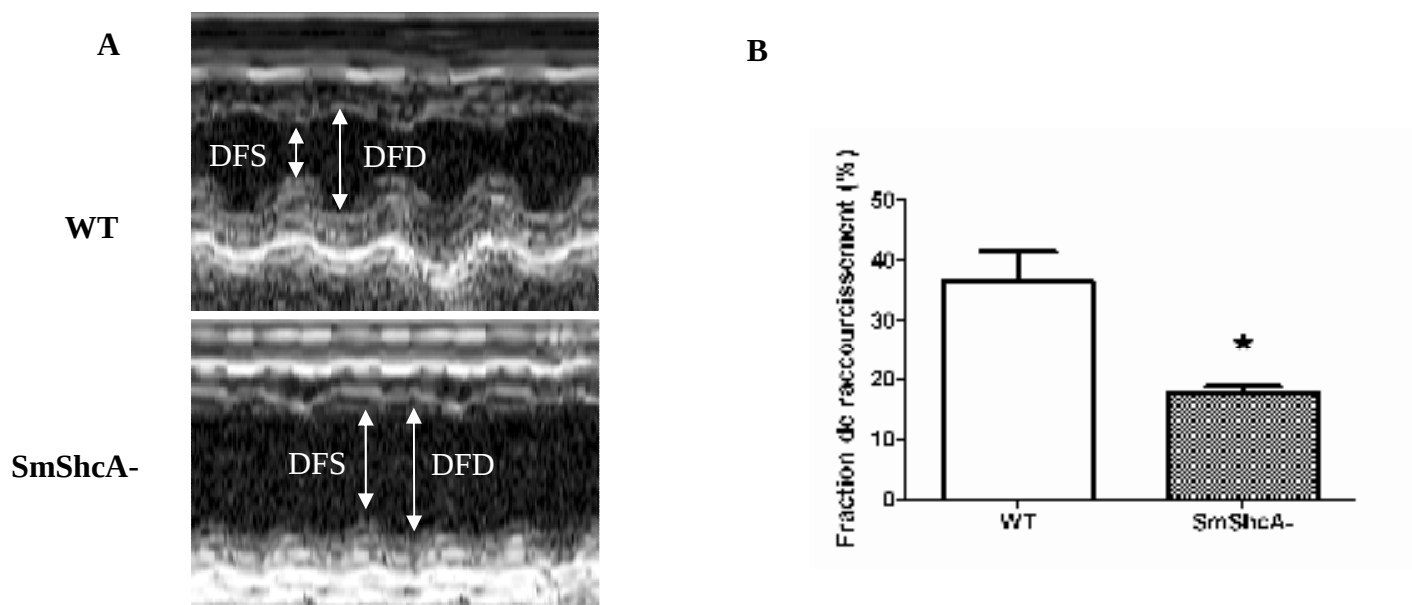


Figure 24 : Perte de la contractilité des souris SmShcA-. (A) Représentation échographique M-mode du ventricule gauche de souris de contrôle (WT) et SmShcA- âgée de 9 mois. DFS : diamètre ventriculaire en fin de systole ; DFD : diamètre ventriculaire en fin de diastole. (B) Fraction de raccourcissement du ventricule gauche des souris contrôle (WT) et des souris SmShcA-. n= 6-7 souris par groupe. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ esm; * $P < 0.05$.

L'absence de ShcA dans le cœur induit une dilatation des ventricules gauches avec une perte de contractilité caractéristique d'une cardiomyopathie dilatée.

4.1.5. Histologie des cœurs de souris SmShcA-

4.1.5.1. Dilatation des ventricules droit et gauche

L'histologie des cœurs des souris a été effectuée sur des souris de 3 mois. Nous avons réalisé des coupes sur le plan transversal et sur le plan frontal qui ont été colorées par hématoxyline/éosine (Figure 25). On observe chez les souris SmShcA- une dilatation des ventricules gauches. La dilatation du ventricule gauche est l'un des remodelages cardiaques qui intervient lors de l'insuffisance cardiaque, c'est un mécanisme de compensation qui permet d'augmenter le volume d'éjection afin de maintenir un débit cardiaque constant.

- Macroscopie

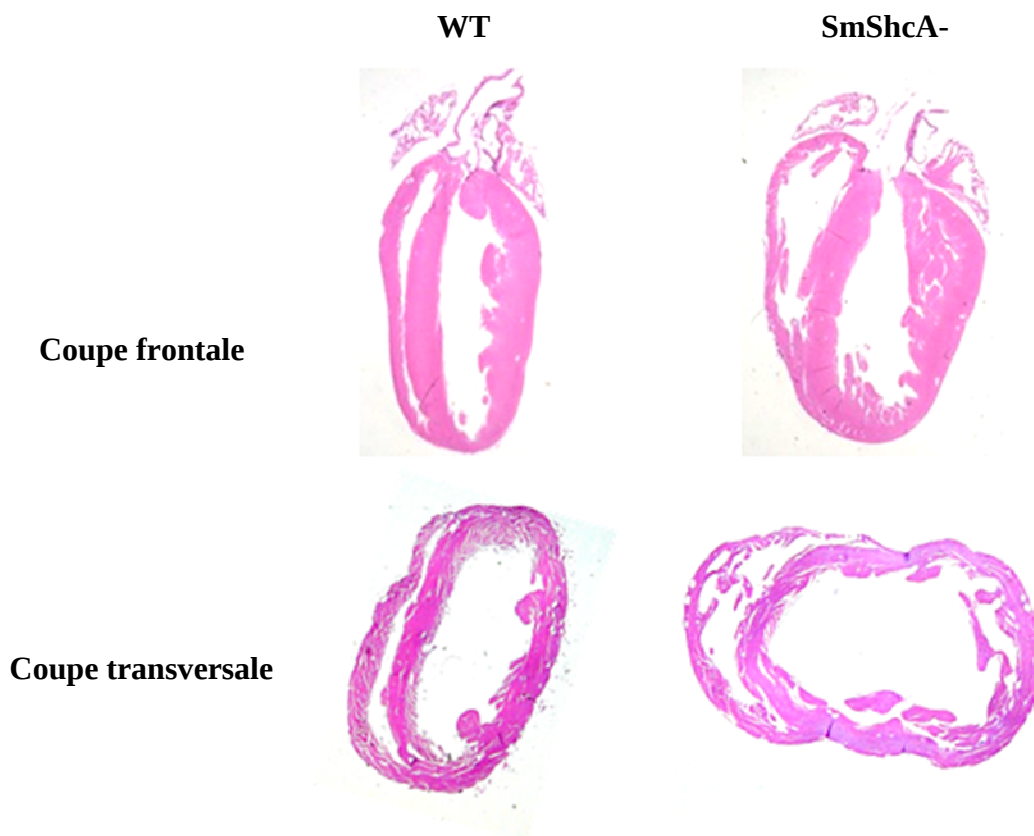


Figure 25: Dilatation ventriculaire. Coupes histologiques colorées à l'hématoxyline éosine de cœur de souris contrôle (WT) et SmShcA- âgées de 3 mois. Photos prises au microscope, coupes frontales : grossissement x2.5 ; coupes transversales : grossissement x3.

- Microscope

L'analyse des coupes des cœurs de souris au microscope n'a pas révélé d'anomalie visible au niveau du myocarde. Cependant, au plus fort grossissement on remarque certaines zones de dégénérescence du myocarde (figure 26).

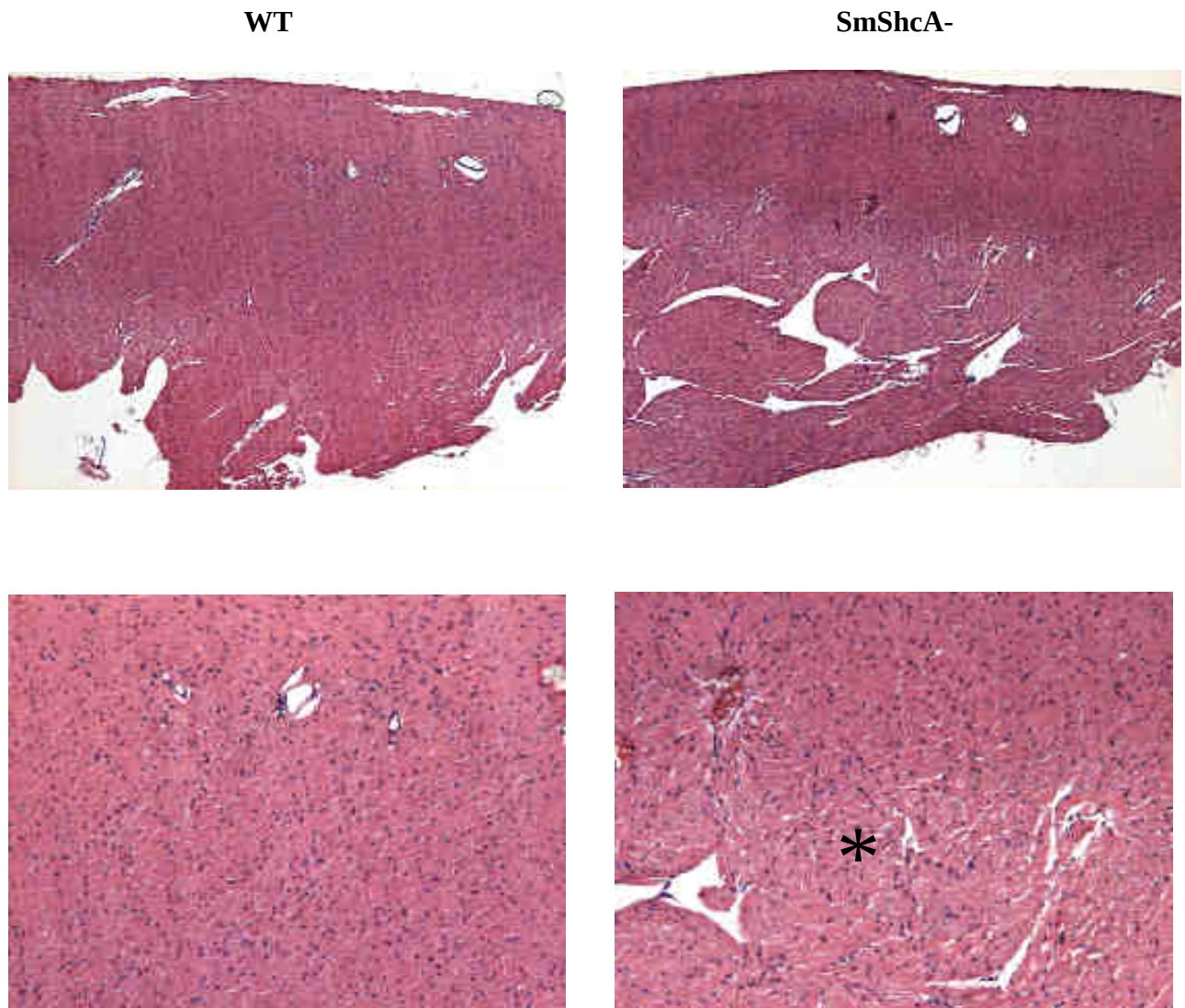


Figure 26 : Organisation du myocarde ventriculaire. Observation au microscope de coupes colorées en H/E de myocarde ventriculaire des souris contrôle (WT) et SmShcA- âgées de 3 mois. Grossissement x5 pour les photos du haut, x8 pour les photos du bas. * dégénérescence du myocarde.

4.1.5.2. Absence de fibrose au sein du myocarde des souris SmShcA-

Les colorations au trichrome de Masson qui colore les fibres de collagène en vert, n'ont pas révélé la présence de fibrose au niveau du myocarde des souris SmShcA- (Figure 27).

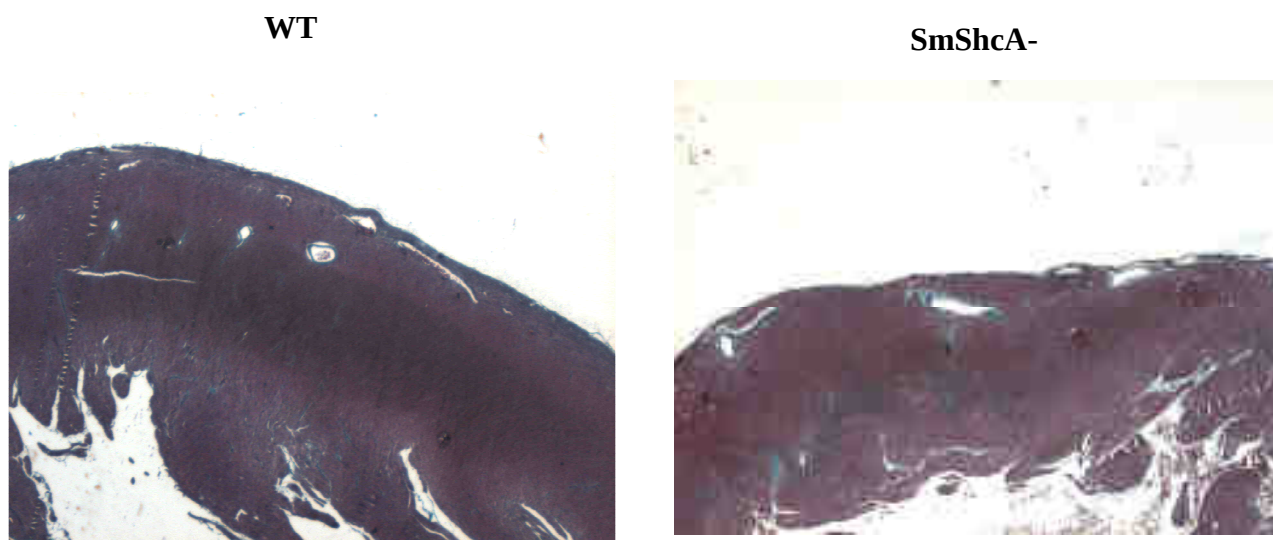


Figure 27 : Absence de fibrose chez les souris SmShcA-. Observation au microscope de coupes colorées au trichrome de Masson de myocarde ventriculaire des souris contrôle (WT) et SmShcA- âgées de 3 mois.

L'analyse histologique des coupes de cœur de souris SmShcA- nous a révélé que l'absence de ShcA au niveau cardiaque induisait une cardiomyopathie dilatée. En effet, lorsque ShcA est absente dans le cœur, les souris développent une dilatation ventriculaire gauche afin de compenser la perte de contractilité. L'analyse histologique du myocarde des souris SmShcA- a mis en avant une dégénérescence du myocarde. Cependant les colorations au trichrome de Masson n'ont pas révélé la présence de fibrose qui est pourtant une des conséquences d'une insuffisance cardiaque. Nous avons effectué des observations au microscope électronique des cardiomyocytes au niveau de ces zones (Figure 28).

4.1.5.3. Hypertrophie et désorganisation au sein des cardiomyocytes des souris SmShcA-

La microscopie électronique nous permet d'observer l'ultrastructure du myocarde. Contrairement à l'histologie classique les coupes utilisées sont ultrafines ce qui nous permet d'observer en détail l'organisation cellulaire. Nous passons de l'échelle tissulaire à l'échelle cellulaire. L'analyse des coupes de cœur des souris SmSchA- nous a confirmé la dégénérescence du myocarde, observée sur les coupes histologiques en H/E. En effet, on observe sur les sections transversales, des cardiomyocytes hypertrophiques chez la souris SmShcA- comparée à la souris contrôle. (Figure 28). Sur les coupes longitudinales des cardiomyocytes on observe une perte de l'organisation de la fibre cardiaque, avec l'absence d'une organisation des mitochondries normalement alignées entre les sarcomères (Figure 28).

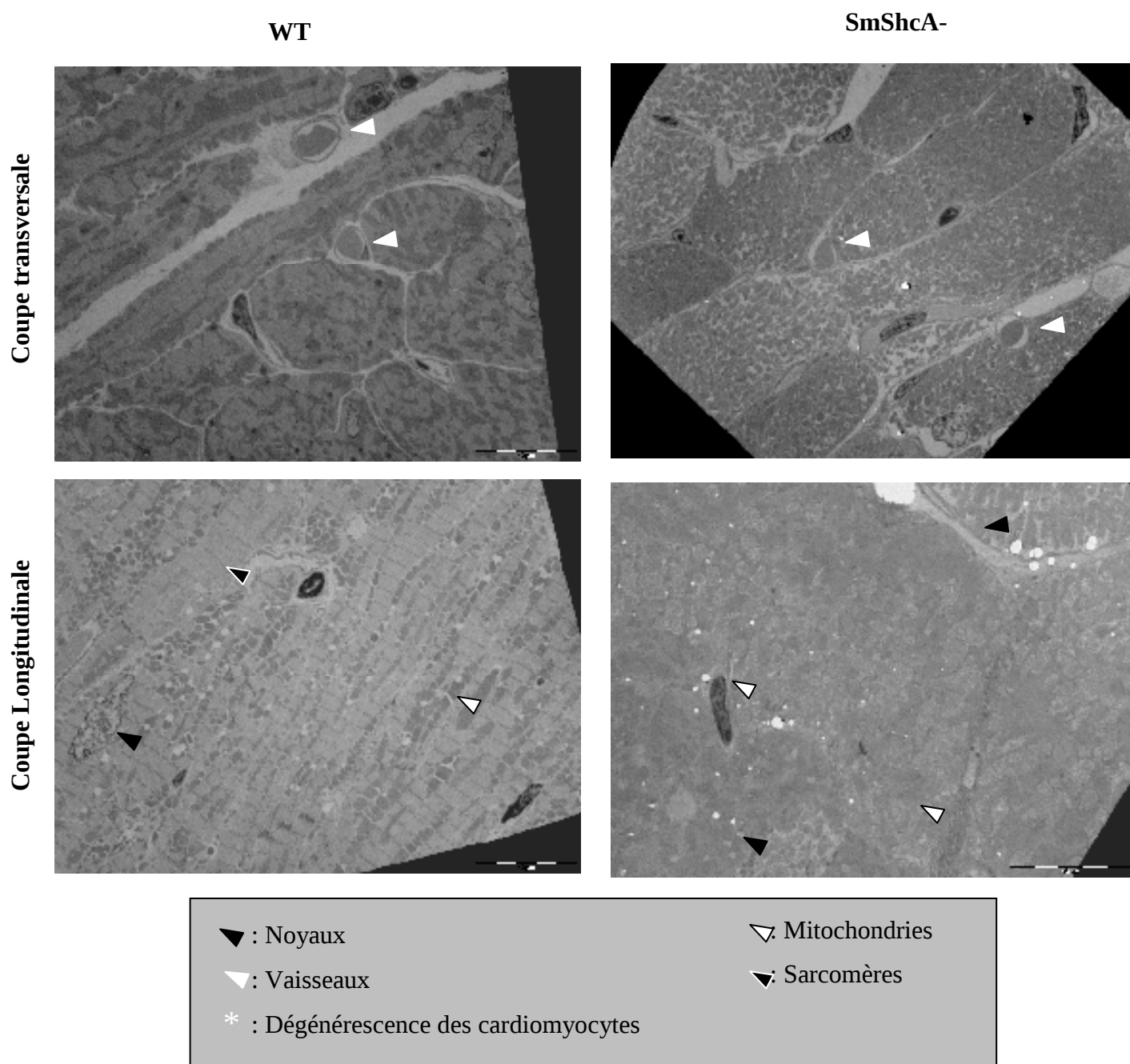


Figure 28 : Hypertrophie et désorganisation des cardiomyocytes des souris SmShcA-. Observation au microscope électronique du myocarde des souris contrôles (WT) et des souris SmShcA- âgées de 3 mois en vue transversale (en haut) et longitudinale (en bas). Echelle=10µm.

4.1.5.4. Dilatation des mitochondries et désorganisation des sarcomères des souris SmShcA-

Les observations au microscope électronique au plus fort grossissement mettent en évidence la présence de nombreuses mitochondries dilatées et arrondies (Figure 29). Ceci est une des caractéristiques connue de l'insuffisance cardiaque.

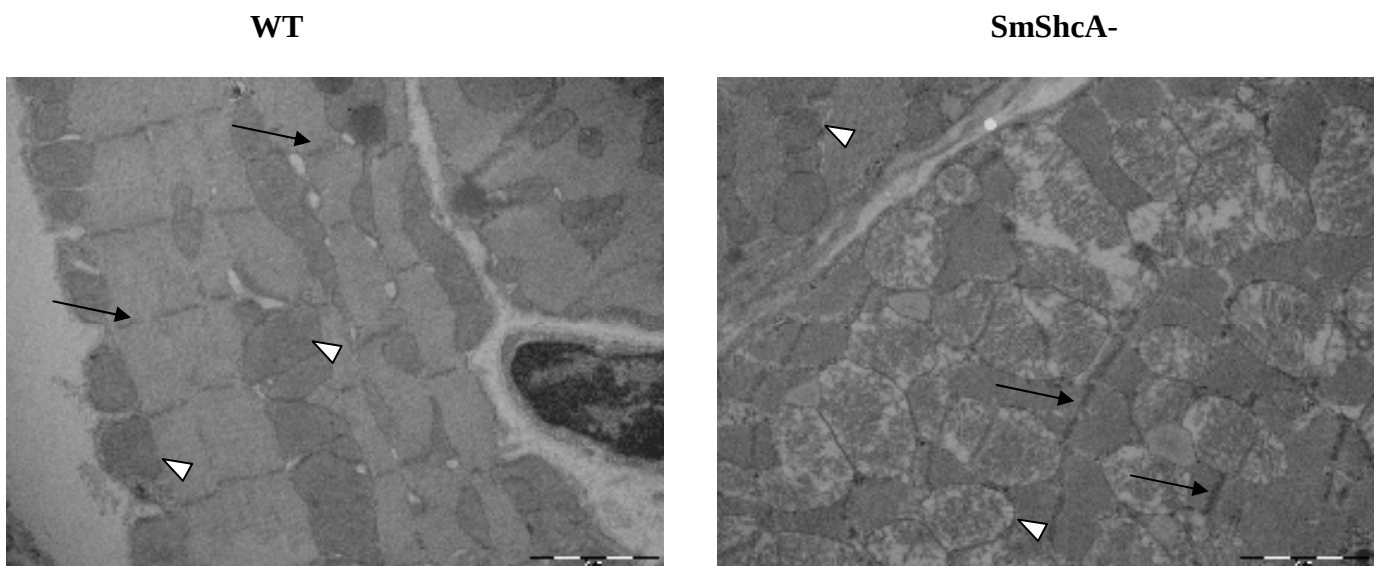


Figure 29 : Dilatation des mitochondries dans le cœur des souris SmShcA-. Observation au microscope électronique du myocarde des souris contrôles (WT) et des souris SmShcA-. Triangle blanc : mitochondries ; flèche noire : bande Z des sarcomères. Echelle=2µm.

Les observations au microscope électronique ont également mis en évidence une désorganisation des sarcomères. Avec la perte de la bande I et un épaissement de la bande Z (figure 30).

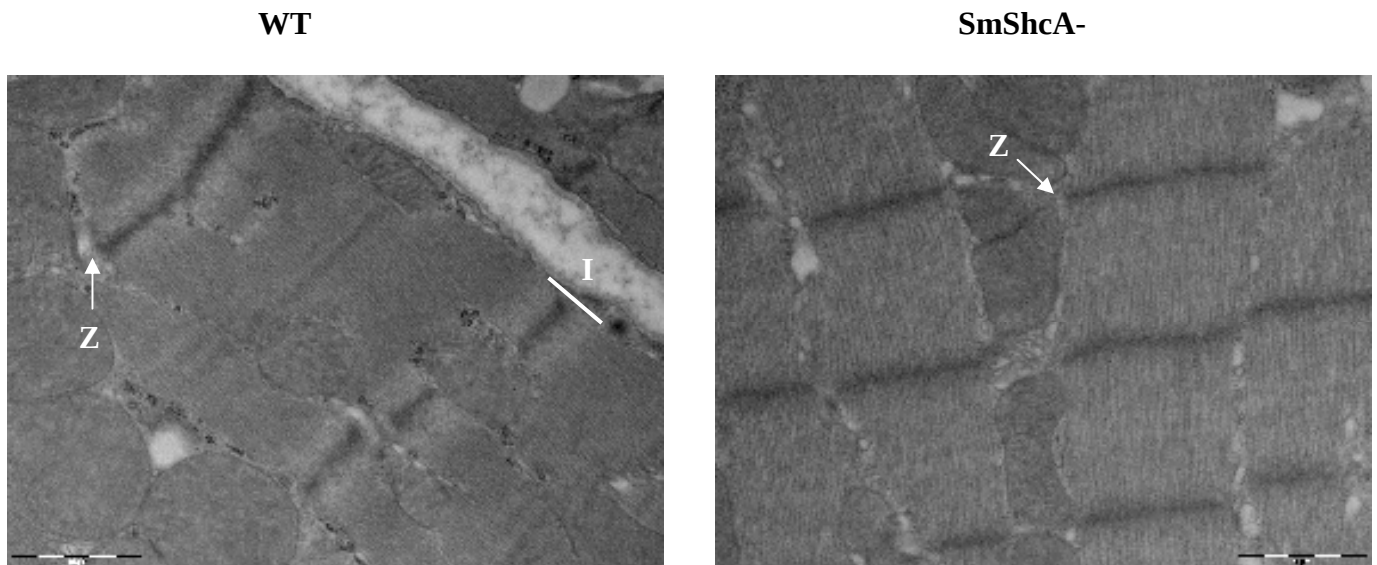


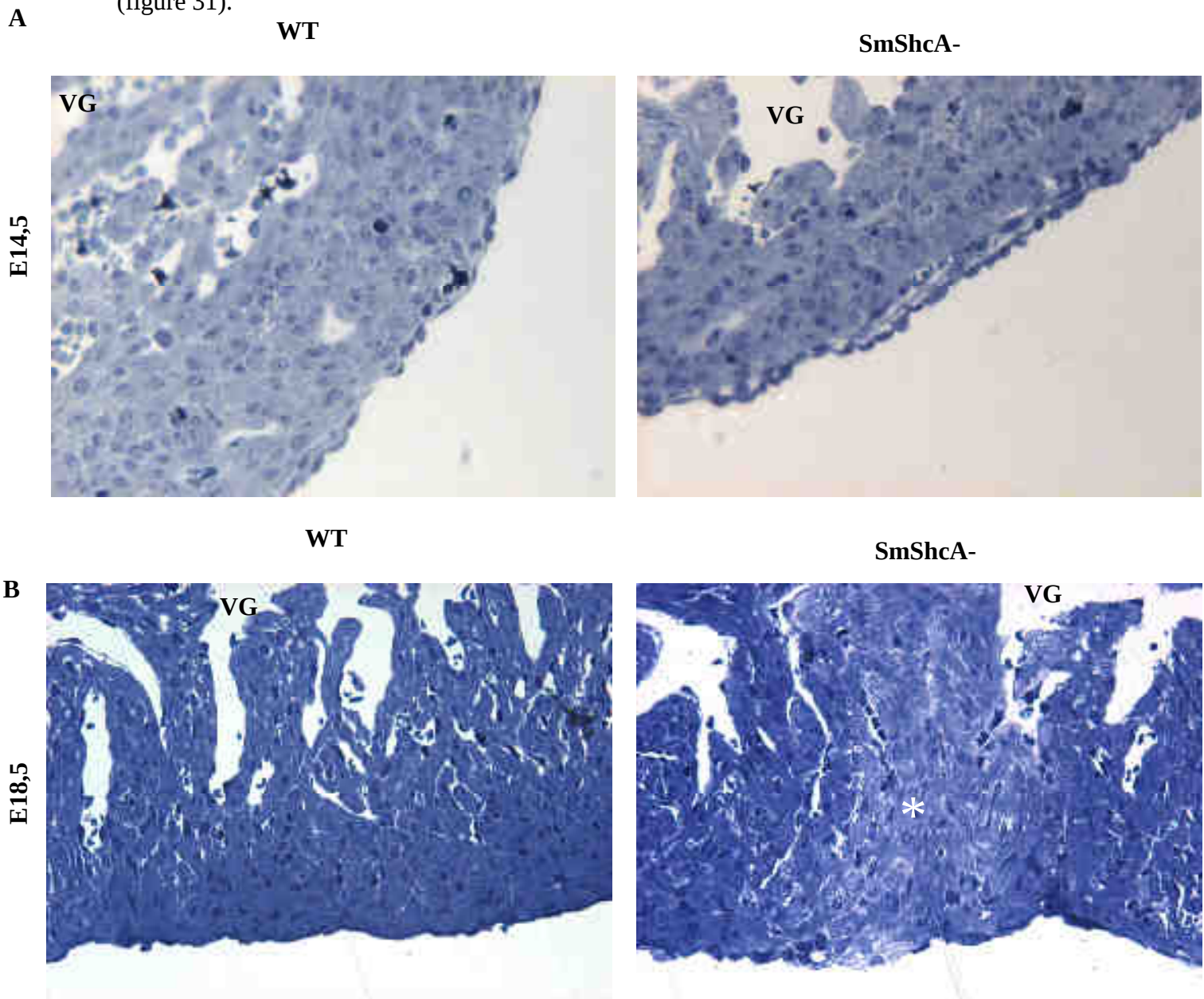
Figure 30 : Désorganisation des sarcomères dans les cardiomyocytes des souris SmShcA-. Observation au microscope électronique des sarcomères des souris contrôles (WT) et des souris SmShcA- âgées de 3 mois. Z : bande Z ; I : bande I. Echelle : 2 μ m.

Les souris SmShcA- présentent une désorganisation des sarcomères avec un épaissement de la bande Z et la disparition de la bande I. Cette désorganisation peut expliquer la perte de contractilité observée à l'échographie. Le sarcomère est l'unité de contraction du muscle. Afin de vérifier que la désorganisation des sarcomères est bien la cause de l'insuffisance cardiaque, nous avons étudié l'organisation des sarcomères pendant l'embryogenèse à E14,5 et E18,5, avant que l'insuffisance cardiaque ne se développe.

4.1.6. Histologie des cœurs d'embryon de souris SmShcA-

4.1.6.1. Observation du myocarde des embryons de souris

L'observation microscopique des coupes de myocardes des embryons à E14,5 et à E18,5 colorées au bleu de Toluidine (colorant basophile, grande affinité avec les acides nucléiques) nous montre l'apparition d'une dégénérescence du myocarde uniquement à partir d'E18,5 (figure 31).



4.1.6.2. Désorganisation des sarcomères observé à partir de E14,5

L'organisation des sarcomères observée par microscopie électronique nous montre que les cœurs embryonnaires des souris SmShcA- présentent une désorganisation précoce à partir de E14,5 (figure 32). Les filaments fins et les filaments épais ne sont pas encore polymérisés et assemblés à E14,5 chez la souris SmShcA-. Cette désorganisation se poursuit à E18,5 avec un épaissement de la bande Z et la perte de la bande I et de la bande H.

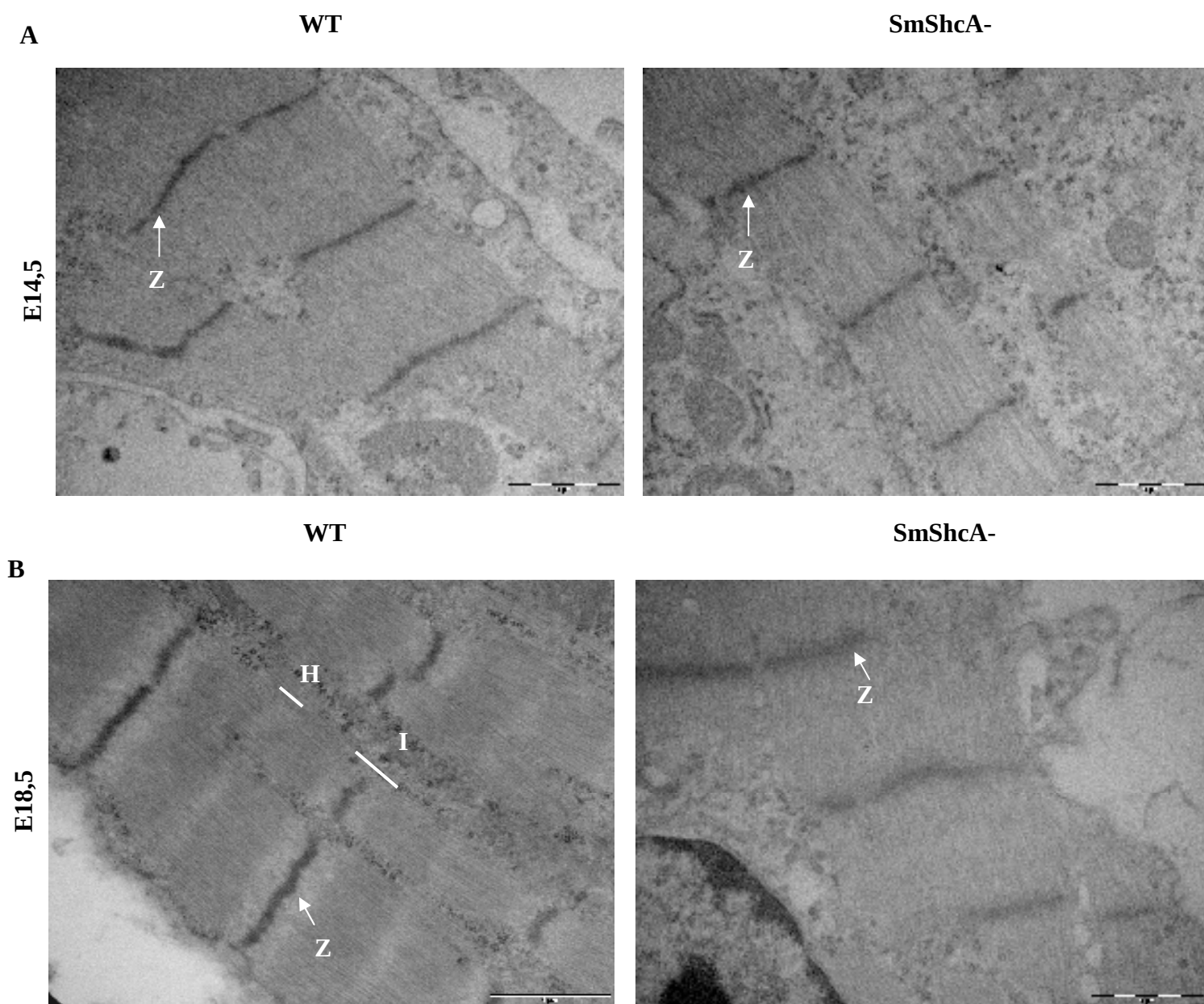


Figure 32 : Désorganisation précoce des sarcomères dans les cardiomyocytes des souris SmShcA-. Observation au microscope électronique des sarcomères du cœur des embryons de souris contrôles (WT) et SmShcA- à E14,5 et E18,5. Z : bande Z ; I : bande I H : bande H. Echelle=2μm.

4.2. Voies de signalisation de ShcA dans le cœur

4.2.1. Voies de signalisation des MAPkinase et AKT/mTOR dans le cœur des souris SmShcA-

L'analyse des principales voies de signalisation mises en jeu par ShcA, la voie des MAPK et d'AKT/mTOR, dans le cœur des souris SmShcA- n'a pas révélé de différence entre les souris SmShcA- et les souris contrôles (figure 33).

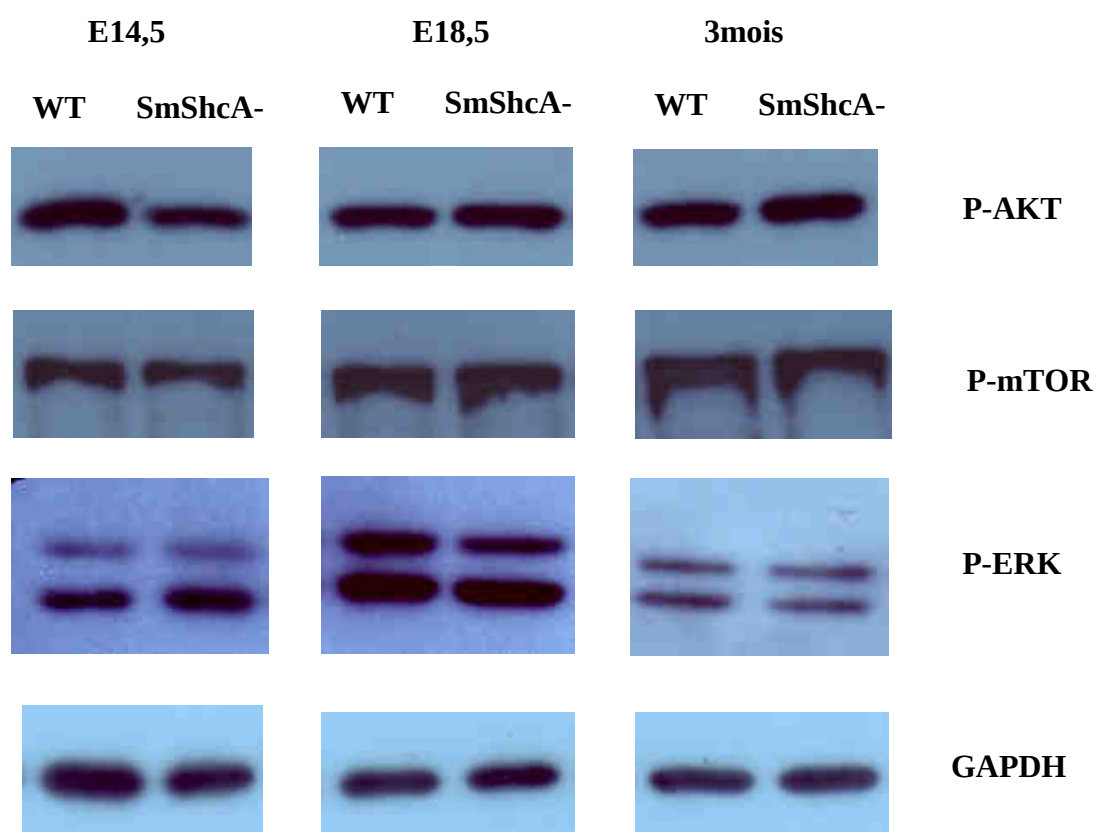


Figure 33 : Voies de signalisation mises en jeu par ShcA dans le cœur. Western blot représentatif des phosphorylations de mTOR, AKT et ERK sur lysats totaux de cœurs de souris à E14,5, E18,5 et 3 mois. Rapporté à la GAPDH. n= 3 par groupe.

L'absence de ShcA dans le cœur n'induit pas de différence au niveau des principales voies de signalisation impliquant ShcA, comme la voie des MAPkinase et la voie d'AKT/mTOR. Ces résultats sont en accord avec le KO total de ShcA où aucune différence n'est observée (Lai and Pawson, 2000). Les auteurs ont justifié cette absence de différence par l'hétérogénéité cellulaire présente au sein du myocarde.

4.2.2. Rôle de ShcA dans l'expression des protéines du sarcomère

Titine est une protéine géante impliquée dans l'organisation et l'élasticité du sarcomère. Elle est présente sous 2 isoformes : N2BA, la forme embryonnaire, et N2B, la forme mature. A la naissance, il s'opère un switch entre les isoformes N2BA et N2B pour adapter la réponse aux forces exercées par le cœur. L'absence de titine chez la souris KO cause des désorganisations des sarcomères. L'absence de certaines régions de titine induit une désorganisation des sarcomères, une dysfonction diastolique et une atrophie cardiaque (Radke et al., 2007). De plus titine est phosphorylée en sérine/thréonine par les MAPKinases au niveau de deux régions situées dans la bande Z appelé Zis1 et Zis5 (Gautel et al., 1996; Sebestyen et al., 1995). L'absence de ShcA dans le cœur n'induit pas de différence d'expression des différentes isoformes de titine (figure 34).

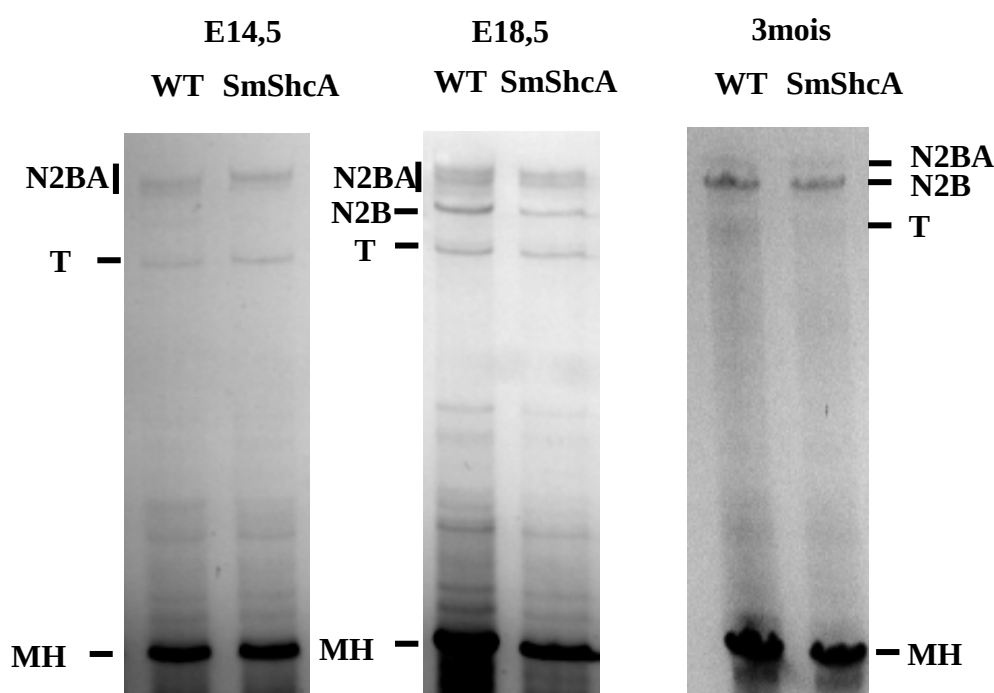


Figure 34: Pas de différence d'expression de titine dans les lysats de cœur de souris SmShcA^{-/-}. N2BA : isoforme embryonnaire de titine ; N2B : isoforme mature de titine ; T= produit de dégradation de titine ; MHC : Myosin Heavy Chain : contrôle de la quantité de dépôt.

Nous avons également regardé la phosphorylation des domaines Zis1 et Zis5 *in vitro* (Figure 35). La phosphorylation *in vitro* des domaines de titine Zis1 et Zis5 par les enzymes présentes dans le lysat de cœur des souris SmShcA^{-/-} à E18,5 et 3 mois n'a pas mis en évidence de différence de phosphorylation.

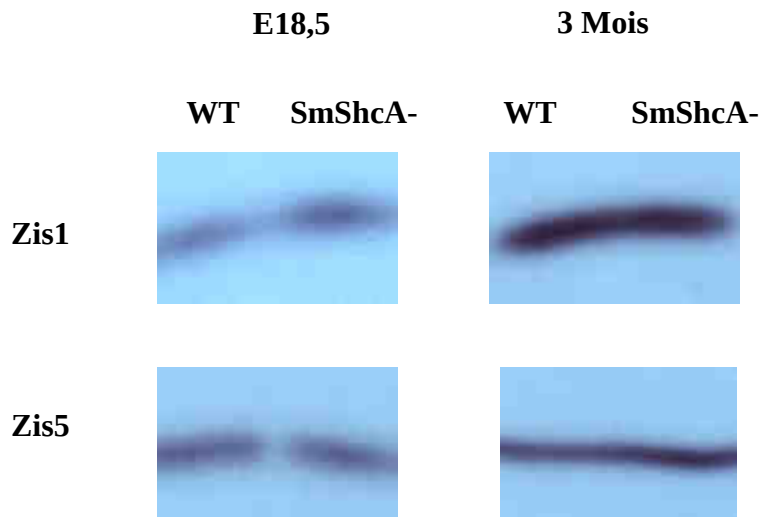


Figure 35: Absence de différence de phosphorylation des domaines Zis1 et Zis5 de titine. Phosphorylation *in vitro* au P32 des domaines clonés de Zis1 et Zis5 en présence de lysats de cœurs de souris sauvages (WT) et SmShcA- à E18,5 et 3 mois.

- Téléthonine

La téléthonine est une protéine qui permet l'ancrage de titine à la bande Z. Nous avons effectué un western blot sur les cœurs de souris SmShcA- âgées de E14,5, E18,5 et 3 mois (figure 36). L'absence de ShcA dans le cœur induit une augmentation de l'expression de la téléthonine dès E14,5 et de façon plus importante à E18,5 et à 3 mois. Le rôle de la téléthonine dans le sarcomère a déjà été étudié chez le poisson zèbre dans le muscle squelettique. En effet, la délétion de la téléthonine induit une désorganisation des sarcomères via l'absence de formation de costamères (Zhang et al., 2009). ShcA pourrait alors être impliquée dans l'organisation des jonctions cellulaires essentielles à la contraction du cardiomyocyte comme le disque intercalaire et le costamère.

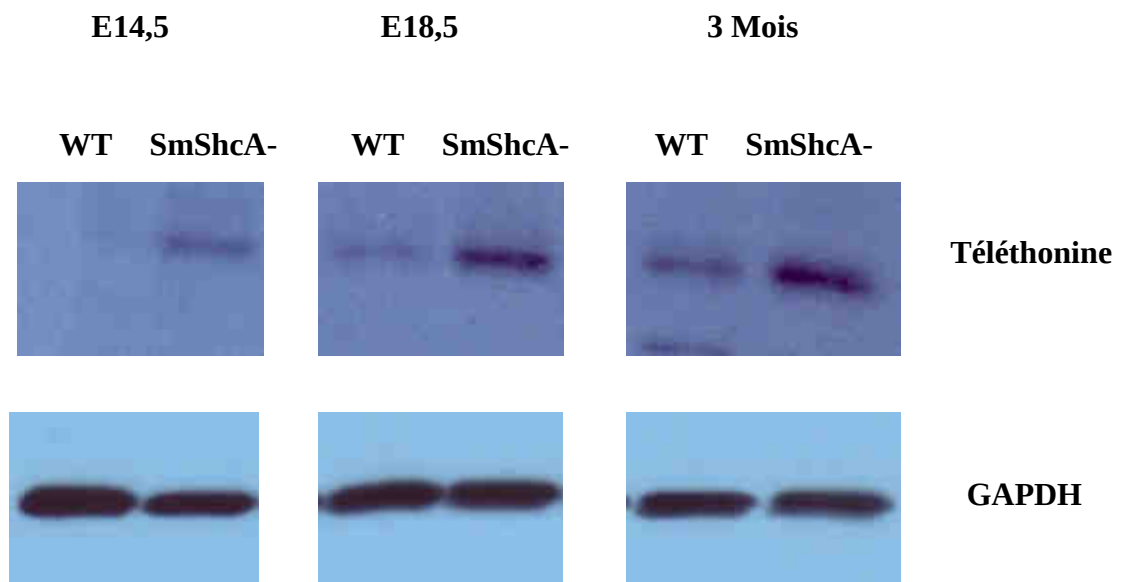


Figure 36 : Augmentation de l'expression de la téléthonine dans le cœur des Souris SmShcA-. Western blot représentatif de la téléthonine sur lysat total de cœur de souris à E14,5, E18,5 et 3 mois. Normalisé avec un anticorps dirigé contre la GAPDH. n=3 par groupe.

4.2.3. Implication de ShcA dans les jonctions cellulaires

4.2.3.1. Le disque intercalaire

Le disque intercalaire est une structure essentielle à l'étirement et à la propagation du potentiel d'action d'une cellule à une autre. Le disque intercalaire fait intervenir plusieurs types de jonctions : les jonctions adhérentes, les jonctions gaps et les desmosomes. L'absence de ShcA dans le cœur semble ne pas altérer l'organisation du disque intercalaire dans le cœur (Figure37).

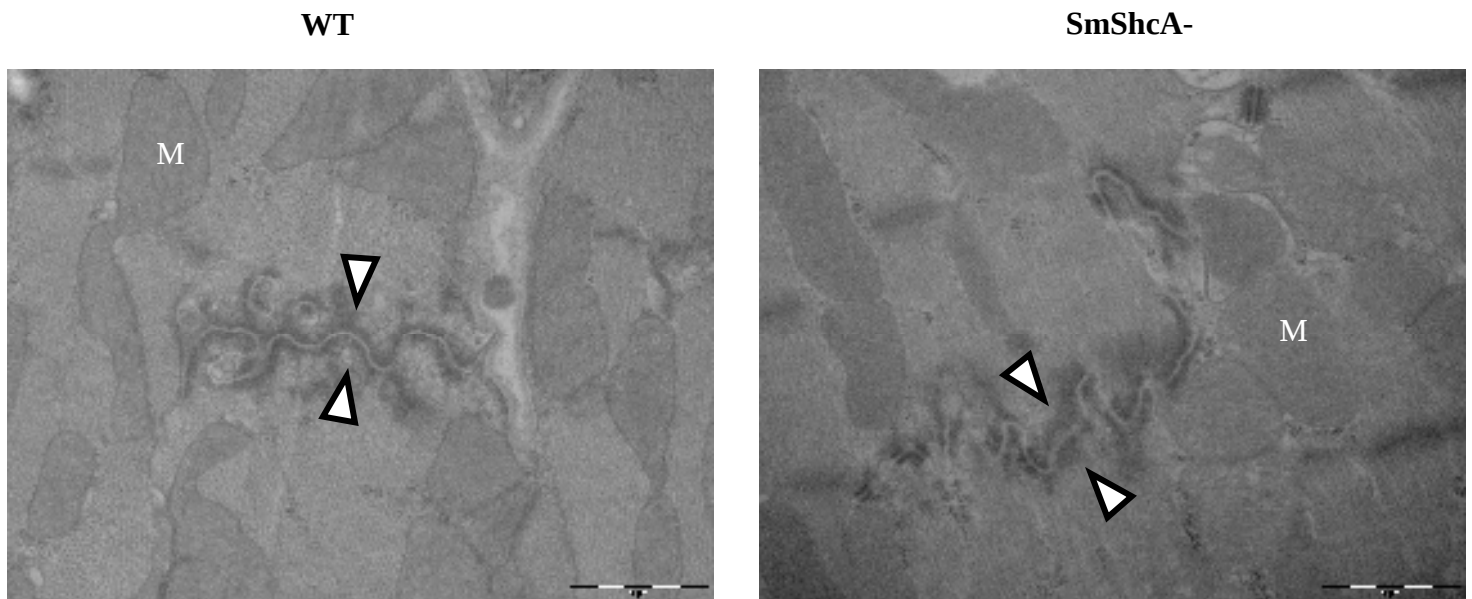


Figure 37 : Organisation du disque intercalaire des souris SmShcA-. Observation au microscopique électronique du disque intercalaire des cardiomyocytes de souris contrôle (WT) et SmShcA- âgées de 3 mois. Triangle : disque intercalaire ; M : mitochondrie. Echelle=2 μ m

4.2.3.2. Les costamères

Le costamère est constitué d'un complexe protéique qui permet l'ancrage du sarcomère à la matrice extracellulaire via les intégrines et les complexes protéines sarcoglycan-dystroglycan-dystrophine. Il joue un rôle dans l'organisation de l'architecture du cytosquelette du cardiomyocyte mais également dans l'interaction entre la matrice extracellulaire et les cellules avoisinantes. Chez les souris SmSchA- on observe une désorganisation de ces structures dès E18,5 (figure 38) avec une augmentation de la distance séparant la membrane plasmique de la bande Z.

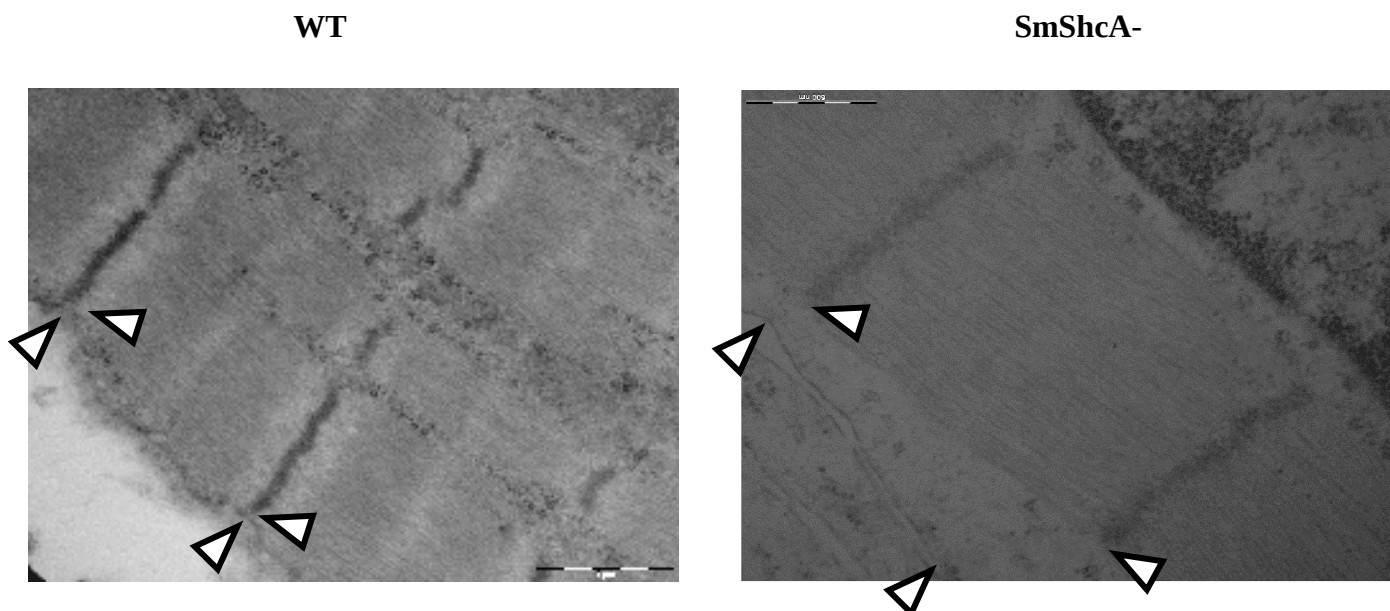


Figure 38 : Désorganisation des costamères chez les embryons de souris à E18,5. Photographie en microscopie électronique du myocarde des souris contrôle (WT) et SmShcA-. Triangle blanc : costamère. Echelle = 1μm.

Le costamère est également localisé au niveau de la membrane latérale des cardiomyocytes

4.2.3.3. Anomalie de la membrane latérale des cardiomyocytes des souris SmSchA-

La membrane latérale du cardiomyocyte joue un rôle de maintien et de cohésion au sein du tissu. Elle fait intervenir les mêmes complexes protéiques retrouvés dans le costamère. L'absence de ShcA dans le cœur induit une importante désorganisation de la membrane latérale des cardiomyocytes chez l'embryon à E18,5 mais également à 3 mois (figure 39). L'absence de ShcA dans le cardiomyocyte induit une irrégularité du sarcolème et d'importants espaces intercellulaires. On retrouve le même type d'anomalie au niveau du sarcolème dans les cardiomyocytes chez les souris qui n'expriment pas la dystrophine (MDX) ou l'utrophine, un homologue protéique de la dystrophine (Sanford et al., 2005). La dystrophine est protéine impliquée dans l'organisation du cytosquelette. Elle intervient au niveau du costamère afin de relier le complexe protéique du costamère (intégrine et dystroglycan) aux filaments d'actine. Chez l'homme, des mutations sur ce gène causent

différent types de myopathies dont la myopathie de Duchenne, une myopathie qui touche essentiellement le muscle squelettique.

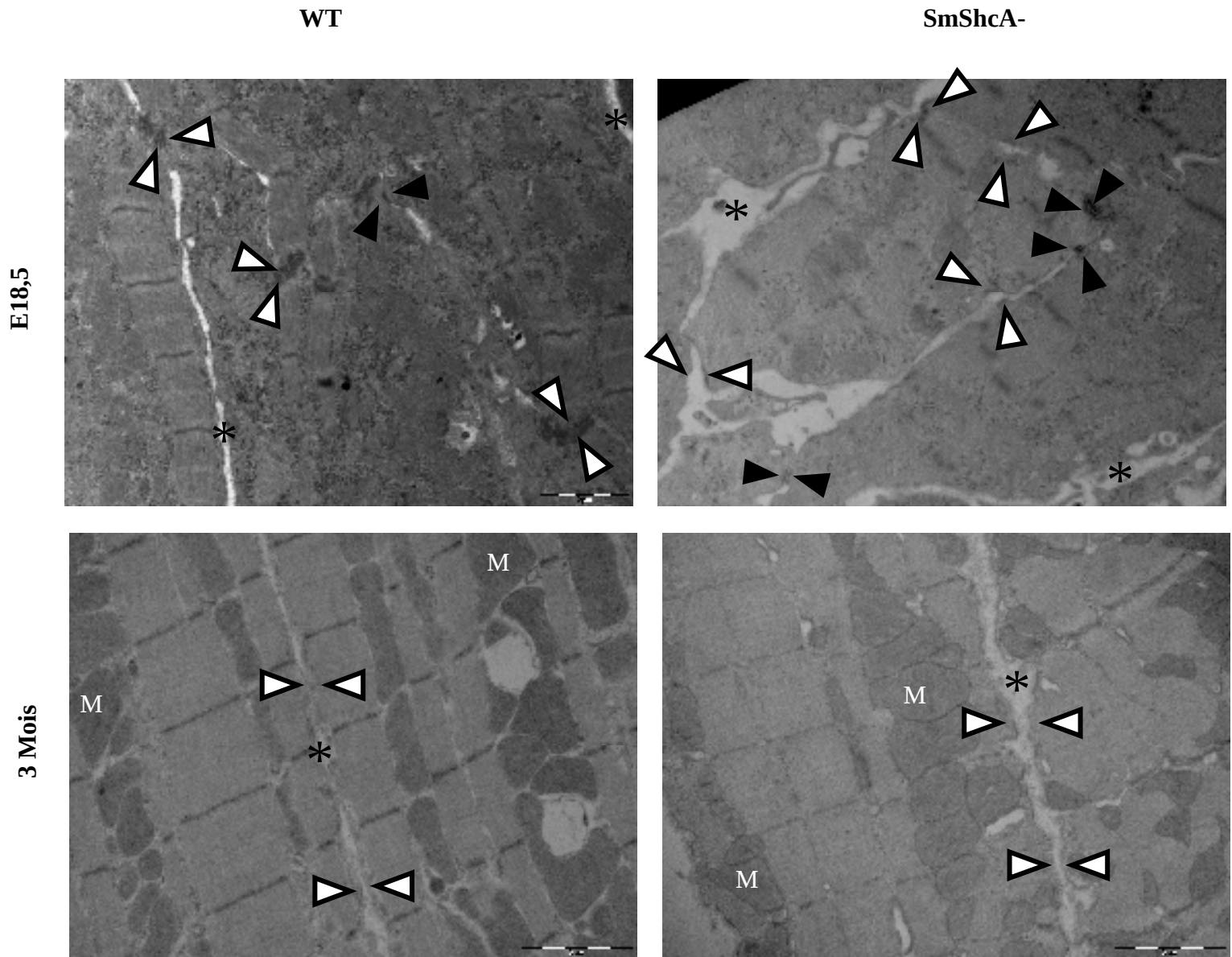


Figure 39 : Membrane latérale des cardiomyocytes des souris SmShcA-. Observation au microscope électronique de la membrane latérale des cœurs de souris contrôle (WT) et des souris SmShcA- à E18,5 et 3 mois. Triangle blanc : sarcolème ; triangle noir : jonction adhérente, étoile : espace intercellulaire. Echelle=2 μ m.

Les souris SmShcA- développent une anomalie de la membrane latérale des cardiomyocytes semblable à celle observée dans les modèles murins de dystrophie musculaire (Sanford et al., 2005). L'absence de ShcA au niveau des cardiomyocytes entraîne une désorganisation des sarcomères associée à une anomalie de la membrane latérale des cardiomyocytes. Ces

malformations se manifestent chez la souris SmShcA- par une dégénérescence du myocarde qui se traduit alors par une insuffisance cardiaque.

4.3. Hypothèses mécanistiques

Le costamère est une structure qui fait intervenir deux types de complexes : le complexe sarcoglycane-dystroglycane-dystrophine et le complexe intégrine-taline-vinculine.

Hypothèse 1 : ShcA peut se lier via son domaine SH2 à la sous-unité bêta du dystroglycane lorsque celle-ci est phosphorylée (Sotgia et al., 2001). ShcA pourrait donc être nécessaire à la liaison de la dystrophine avec son complexe membranaire (Figure 40).

Hypothèse 2 : Shc A peut être recrutée à la membrane directement ou indirectement par les intégrines (Wary et al., 1999), (Wary et al., 1998). La présence de ShcA pourrait être nécessaire dans le maintien du complexe intégrine-taline-vinculine (Figure 40).

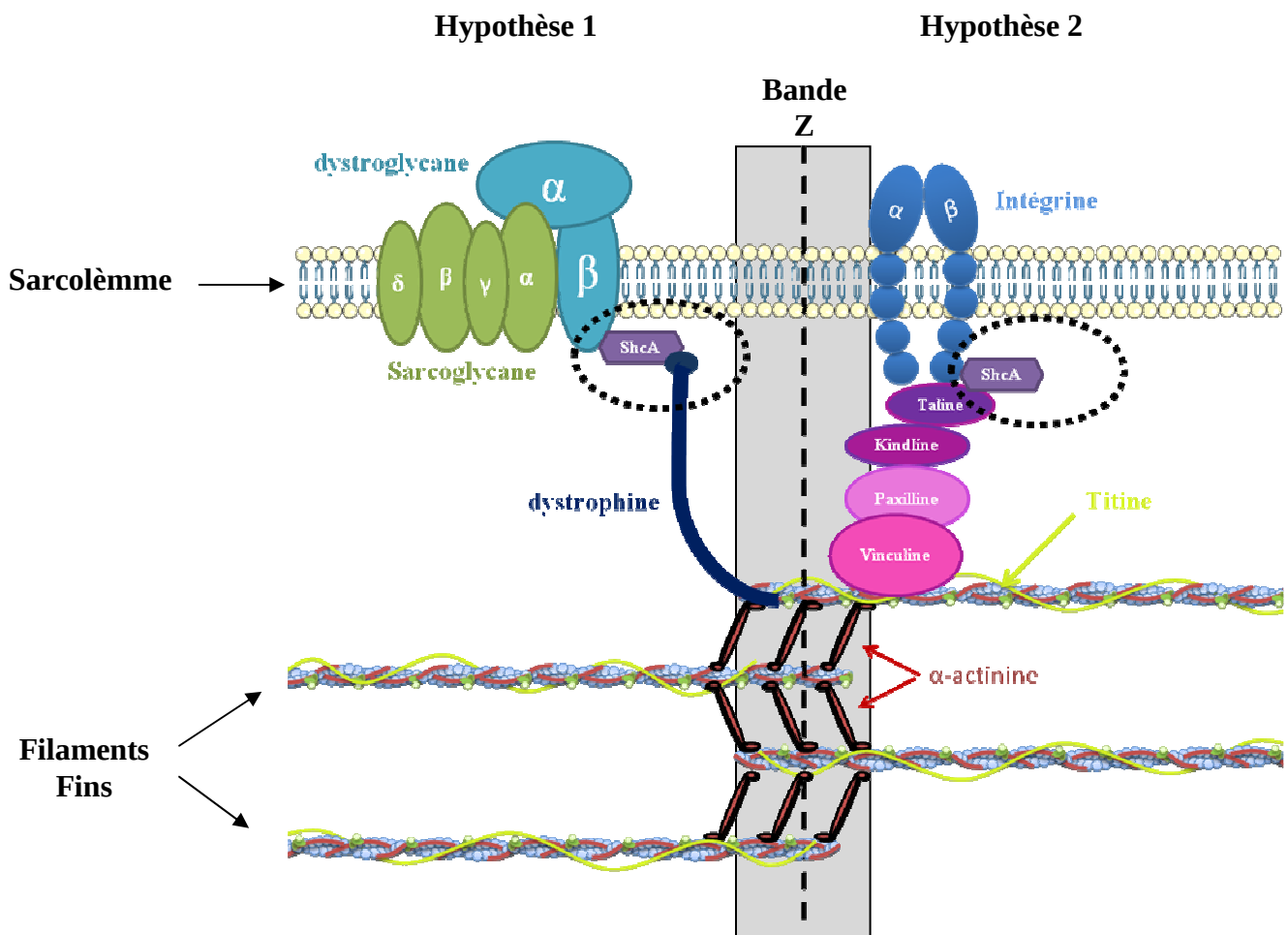


Figure 40 : Implication de ShcA dans l'organisation du costamère.

Discussion et Perspectives

5. Discussion et Perspectives

Notre sujet s'inscrit dans le cadre de l'étude du rôle de ShcA dans la fonction cardiaque. La première étude à ce sujet est celle du KO total de ShcA qui a permis d'identifier le rôle fondamental de ShcA dans la formation du cœur durant l'embryogenèse. En effet, le KO de ShcA et plus précisément la délétion partielle du domaine PTB de ShcA chez la souris, est létal durant l'embryogénèse à E11,5 (Lai and Pawson, 2000). Notre modèle de souris transgénique consiste en l'insertion par recombinaison homologue du gène de la Cre recombinase associé au promoteur du gène *Sm22* dans le génome de la souris (Holtwick et al., 2002). *Sm22alpha* (smooth muscle 22 alpha) est un marqueur spécifique des cellules musculaires lisses chez l'adulte et est également exprimé pendant l'embryogenèse entre E7,5 et E13.5 dans le cœur (Langlois et al., 2010; Malhowski et al., 2011; Yang et al., 2010). L'autre modèle de souris n'exprimant pas ShcA spécifiquement dans le cœur, généré par l'équipe du Professeur Pawson (Vanderlaan et al., 2011), utilise le promoteur de la chaîne légère de la myosine (*MLC2v*) associé à la Cre recombinase (Chen et al., 1998). Cependant, contrairement à notre modèle, le gène de la Cre est associé directement au promoteur endogène de la chaîne légère de myosine. L'usage de ces souris Knock-in a pour avantage d'avoir une expression plus spécifique du gène de la Cre recombinase, c'est-à-dire uniquement dans les cardiomyocytes. Cependant, dans ce modèle de souris KI, la délétion du gène de la chaîne légère de la myosine, une protéine impliquée dans la contraction spécifiquement dans le cœur, sur un allèle pourrait induire un biais non négligeable dans l'interprétation des résultats.

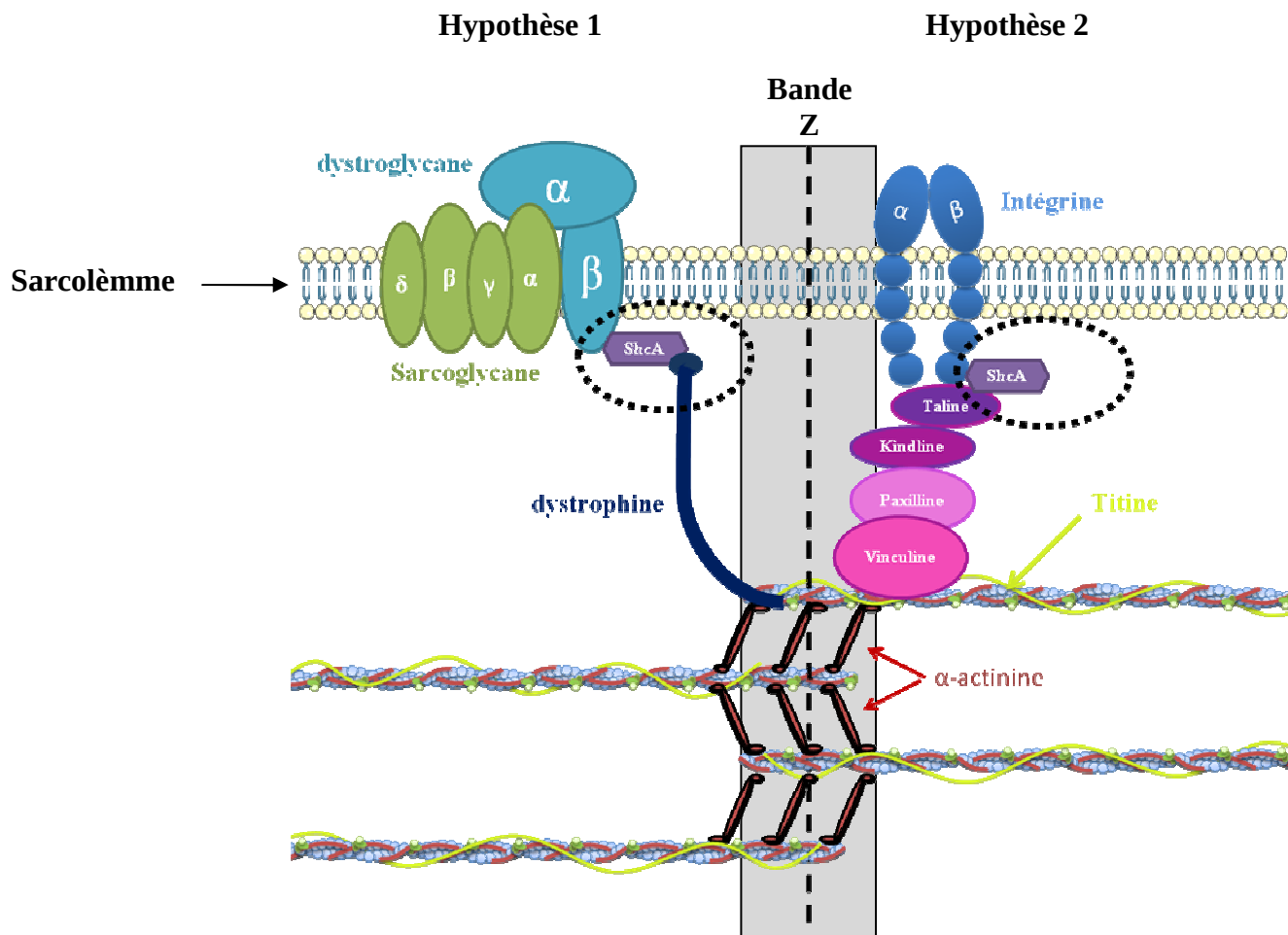
Dans notre modèle, la délétion du gène de ShcA se fait entre l'exon 2 et 7 ce qui correspond à une délétion de 88% du domaine PTB alors que dans leur modèle seuls les exons 2 et 3 sont excisés soit 45% du domaine PTB (Lai and Pawson, 2000). On peut donc s'interroger sur le rôle de la protéine tronquée qui reste néanmoins exprimée. Dans le modèle KO de ShcA publié en 2000 une protéine d'environ 40kDa reste exprimée, correspondant à une partie du domaine PTB de ShcA et des domaines CH1 et SH2. Dans notre modèle, une protéine tronquée d'environ 34kDa est exprimée correspondant aux domaines CH1 et SH2 de ShcA. Dans l'étude effectuée en 2007, l'équipe du Professeur Pawson (Hardy et al., 2007) a

vérifié que l'inactivation spécifique de l'un ou l'autre domaine de ShcA (PTB ou CH1 ou SH2) par mutation n'induisait pas une inactivation des autres domaines restés présents. Ainsi, l'inactivation du domaine PTB par mutation sur l'arginine 175 de ShcA empêche la liaison de ShcA au niveau des motifs phosphorylés de la partie intracellulaire du récepteur à l'EGF, mais n'empêche pas le recrutement de Grb2 au niveau des motifs tyrosines phosphorylés du domaine CH1 (Hardy et al., 2007). Ainsi, la protéine ShcA tronquée que nous détectons dans notre modèle et qui est constituée des domaines CH1 et SH2 uniquement pourrait potentiellement avoir une fonction dans l'induction des voies de signalisation comme la voie des MAPKinases. Ceci pourrait expliquer l'absence de différence de phosphorylation d'AKT/mTOR, ERK et indirectement de la titine. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de contrôler la fonctionnalité de cette protéine tronquée sur des fibroblastes embryonnaires de souris ShcA floxées traitées par un adénovirus exprimant la Cre recombinase (AdenoCre) ou par un siARN ShcA. Le traitement par l'adenoCre nous permettrait d'avoir l'expression de ShcA sans le domaine PTB alors que le traitement par le siARN ShcA éteindrait totalement l'expression de la protéine totale.

Notre modèle de souris SmShcA- nous permet de dire que la mort des embryons ShcA KO observée dans l'étude de Pawson en 2000, c'est-à-dire sur les souris où le domaine PTB est tronqué de 45%, ne peut pas être entièrement imputée à l'absence du domaine PTB de ShcA dans le cœur. En effet, notre modèle n'exprime plus théoriquement ShcA à partir de E7,5 spécifiquement dans le cœur. Pourtant il est viable, avec un rapport mendélien respecté à la naissance, ce qui laisse penser que ShcA joue un rôle vital pour l'embryon à un autre niveau que dans les cellules cardiaques.

Cependant, cette étude rejoint la notre concernant le rôle de ShcA au niveau de complexes protéiques impliqués dans l'adhésion cellulaire. En effet, une étude a montré (Lai and Pawson, 2000) que l'absence de ShcA dans les fibroblastes embryonnaires de souris induit une désorganisation du cytosquelette des fibroblastes, essentiellement au niveau de la polymérisation de l'actine, avec une désorganisation des points focaux lors de l'adhésion sur la fibronectine. Par homologie, les points focaux ont une fonction similaire à celle des costamères. Ils permettent l'ancrage du cytosquelette de la cellule à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire des intégrines. De plus, l'absence de ShcA conduit à une augmentation de l'expression de la téléthonine, déjà identifiée comme étant impliquée dans l'organisation des costamères chez le poisson zèbre (Zhang et al., 2009). Les observations au microscope électronique de la structure des cardiomyocytes des souris SmShcA- nous montrent bien une

désorganisation de costamères au niveau de l'ancrage de la bande Z au sarcolème avec des irrégularités dans la structure de la membrane latérale du cardiomyocyte. Le costamère est composé de deux complexes principaux, l'un d'eux fait intervenir les intégrines : le complexe intégrine-taline-vinculine et l'autre le complexe de sarcoglycane-dystroglycane-dystrophine (Stromer, 1998).



ShcA a déjà été identifié *in vitro* comme pouvant interagir directement ou indirectement avec la sous-unité intracellulaire des intégrines beta1 et alpha1 (Wary et al., 1996). L'interaction indirecte fait intervenir la cavéoline qui se lie à la partie intracellulaire de la sous-unité alpha1 ou alphaV des intégrines et qui va recruter des tyrosines kinases cytosoliques tel que Fyn (lié grâce à son domaine SH3). Fyn va phosphoryler les motifs tyrosine du domaine CH1 de ShcA qui permet alors de recruter Grb2 (Wary et al., 1996; Wary et al., 1998). Dans le cœur on retrouve essentiellement les intégrines alpha7/beta1, alpha5/beta1 et alpha6/ beta1 (Stromer, 1998). Ce type d'interaction pourrait également avoir

lieu au sein du costamère dans le cœur et l'absence de ShcA pourrait déstabiliser le complexe intégrine-taline-vinculine. Nous pourrions réaliser des immunoprécipitations des intégrines afin de vérifier l'intégrité du complexe. L'immunomarquage des protéines du complexe dans le cardiomyocyte des souris SmShcA- nous permettrait de vérifier également la localisation membranaire de ces protéines.

Le deuxième complexe de glycoprotéine-dystrophine est un complexe multiprotéique faisant intervenir différentes protéines : les dystroglycanes, les sarcoglycanes et la dystrophine (Stromer, 1998). Les dystroglycanes sont constitués d'une sous-unité alpha extracellulaire et d'une sous-unité beta transmembranaire. La sous-unité beta du dystroglycane permet l'ancrage de la dystrophine à la membrane plasmique. La dystrophine permet de faire le lien entre les protéines du sarcomère et la membrane plasmique. La sous-unité beta du dystroglycane présente un domaine WW qui, lorsqu'il est phosphorylé, peut recruter ShcA (Sotgia et al., 2001). ShcA pourrait faire le lien entre la sous-unité beta du dystroglycane et le sarcomère. Nous pourrions vérifier la localisation membranaire de la dystrophine par immunomarquage ou réaliser une immunoprecipitation de la sous-unité beta du dystroglycane dans des cardiomyocytes de souris SmShcA-.

L'implication de ShcA dans l'insuffisance cardiaque a également été étudiée dans une étude récente parue en 2011 (Vanderlaan et al., 2011). Les auteurs ont utilisé un autre modèle de souris transgénique qui n'exprime plus ShcA dans le cœur à l'âge de 2 semaines et de façon plus prononcée à 12 semaines. Dans ce modèle tardif d'inactivation de ShcA dans le cœur, les souris développent les premiers signes d'une insuffisance cardiaque à l'âge de 3 mois avec une dilatation ventriculaire et une perte de la contractilité observée à partir d'un an. Le phénotype est semblable à notre modèle si ce n'est que dans notre modèle, l'insuffisance cardiaque des souris SmShcA- se développe de façon plus précoce et le cœur subit déjà un remodelage dès 3 mois. Cela peut être expliqué par la délétion précoce de ShcA dans le cœur. Cependant dans les deux modèles, l'insuffisance cardiaque ne s'accompagne pas d'une fibrose au niveau du myocarde, pourtant c'est un phénomène bien identifié dans l'insuffisance cardiaque. De plus le taux de mortalité dans notre modèle semble peu élevé même s'il demeure significatif alors que les auteurs de l'étude parue en 2011 n'ont pas noté d'augmentation de la mortalité. Nous pouvons voir ici un effet bénéfique de l'absence de ShcA dans le cœur. Une des isoformes de ShcA, la p66, est impliquée dans la mort cellulaire. En effet l'absence de p66 chez la souris prolonge l'espérance de vie de 30% (Migliaccio et al., 1999) et son rôle dans différentes pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose ou

l'insuffisance cardiaque à déjà été identifié (Graiani et al., 2005; Napoli et al., 2003). En microscopie électronique, les noyaux des cardiomyocytes présents dans les zones de dégénérescence ne présentent aucun signe de nécrose ou d'apoptose. Seules quelques souris possèdent des cardiomyocytes en autophagie caractérisé par un enroulement membranaire et la présence de vésicules autophagiques. Ceci pourrait être un des effets bénéfiques de l'absence de l'isoforme p66 dans le cœur.

La souris SmShcA- se démarque des autres modèles par son phénotype cardiaque plus sévère avec une augmentation de la mortalité, une cardiomégalie, une diminution de la contractilité et une hypertension. L'absence de ShcA dans les cellules musculaires lisses vasculaires des souris SmShcA- n'entraîne pas d'anomalie dans la structure de l'aorte ni de problème de réactivité vasculaire. Cependant, cela n'exclut pas un potentiel rôle de ShcA au niveau vasculaire. Afin d'élucider avec plus de précision le rôle de ShcA au niveau vasculaire, il serait intéressant de travailler sur des vaisseaux de résistance plutôt qu'avec l'aorte qui est un vaisseau de conductance. De plus, la dernière étude réalisée sur ShcA dans le cœur a montré que ShcA induisait dans les cardiomyocytes une hypersensibilité au calcium (Vanderlaan et al., 2011). Si elle prend également place dans les cellules musculaires lisses vasculaires, cette hypersensibilité au calcium pourrait induire une hyper-contractilité des vaisseaux et conduire à une rigidité des microvaisseaux et induire une hypertension. De plus, l'absence de ShcA au niveau vasculaire pourrait conduire à une dysfonction de la vascularisation du cœur et induire une hypoperfusion cardiaque. Cela pourrait être un facteur aggravant l'insuffisance cardiaque observée chez les souris SmShcA-.

Notre étude montre un rôle protecteur de la protéine adaptatrice ShcA dans le développement de l'insuffisance cardiaque. Nos résultats nous permettent de proposer que le rôle essentiel de ShcA dans la fonction cardiaque se situe au niveau du maintien de la fonctionnalité du sarcomère. Plus précisément Shc A pourrait être une protéine indispensable dans la formation des complexes costamériques permettant la continuité de la communication entre les signaux extracellulaires et le sarcomère (tels que la matrice extracellulaire, le calcium,...)

Deuxième partie : Rôle de LRP1 dans la calcification vasculaire

6. L'athérosclérose et ses complications

Le système vasculaire est constitué des vaisseaux qui permettent l'acheminement du sang dans tout l'organisme. Les artères transportent le sang riche en oxygène du cœur vers les organes et les veines le sang pauvre en oxygène des organes vers le cœur. Ceci est vrai pour la circulation systémique, par contre on observe l'inverse dans la circulation pulmonaire. En effet, le sang pauvre en oxygène quitte le cœur par l'artère pulmonaire vers les poumons et revient enrichi en oxygène des poumons vers le cœur par la veine pulmonaire.

L'athérosclérose se caractérise par une atteinte chronique de la paroi vasculaire des artères de moyen et de gros calibre, due à l'accumulation de lipides. L'athérosclérose peut causer des ischémies entraînant des infarctus, des accidents vasculaires cérébraux, des artériopathies des membres inférieurs.

6.2. Physiologie de la paroi vasculaire

Les artères sont constituées de trois couches distinctes : l'intima, la média et l'adventice. L'intima est la couche la plus interne, elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales qui reposent sur la lame basale. Cette couche est très fine et également constituée de matrice extracellulaire comprenant du collagène et des protéoglycanes. La média, comme son nom l'indique, est la couche centrale de la paroi vasculaire. Elle est essentiellement constituée de cellules musculaires entourées de fibres élastiques. L'adventice est la couche externe de l'artère, elle est constituée de tissu conjonctif, de fibroblastes et de terminaisons nerveuses. Elle est contenue également des vasa vasorum qui irriguent la partie externe de la média des vaisseaux de gros calibres (Figure 41) (Lusis, 2000).

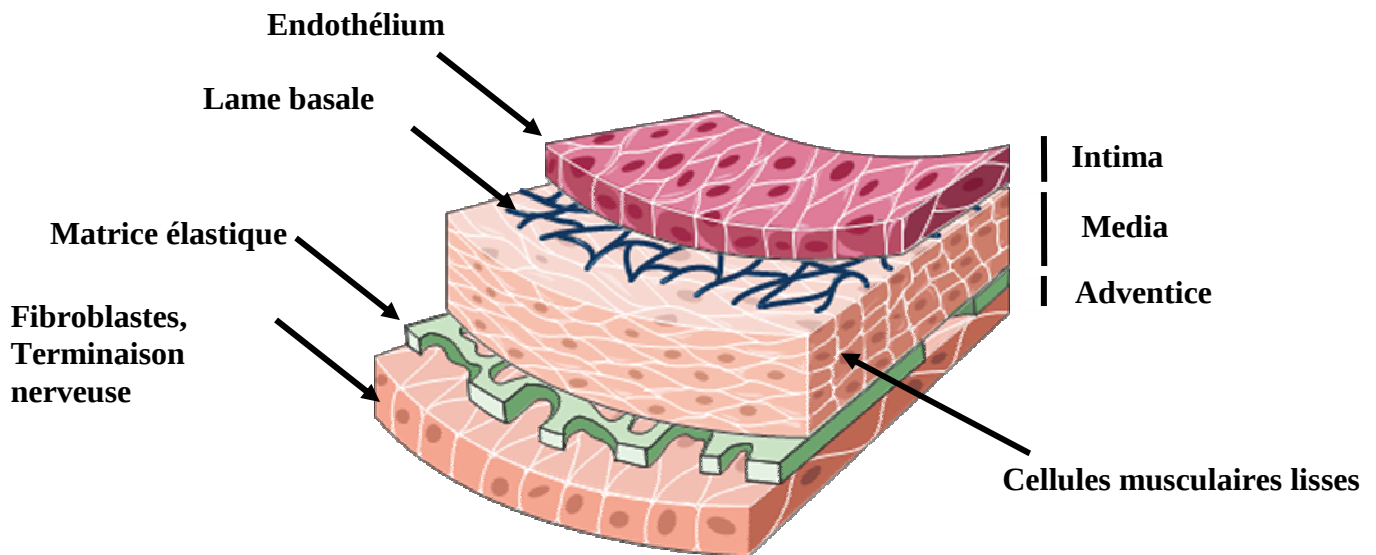


Figure 41 : Structure des artères de large calibre (image Servier Medical Art).

6.3. Physiopathologie de l'athérosclérose.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'athérosclérose est définie comme *"une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre, consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires, le tout s'accompagnant de modifications de la média"*. L'athérosclérose a été classée en 3 stades évolutifs d'après (Sary et al., 1995) et en fonction de l'histologie de la plaque, 6 types de lésions ont été identifiés (Tableau 2) : un stade précoce allant de I à IV correspondant à une accumulation de macrophages et de cellules musculaires lisses chargées de cholestérol, on parle alors de strie lipidique. Ces stries lipidiques sont en général asymptomatiques mais peuvent conduire à un stade plus avancé correspondant aux lésions fibrolipidiques (stade V de Sary). Les lésions fibrolipidiques sont considérées comme l'un des stades avancés de l'athérosclérose car elles induisent une désorganisation importante de l'intima. En effet, à ce stade, la plaque présente une accumulation de collagène qui va former une chape fibreuse entourant le noyau lipidique et s'accompagne souvent d'une calcification qui fragilise la paroi vasculaire. Le stade V conduit bien souvent au stade de la lésion compliquée, à ce stade les taux de morbidité et de mortalité dus à l'athérosclérose sont à leur maximum. Une rupture de plaque peut alors conduire à la formation de thrombose qui risque d'obstruer le vaisseau et ainsi causer des infarctus ou des AVC (figure 42).

Type de lesion	Dénomination	Description
Type I	Initial	Présence de macrophages spumeux
Type II	Strie Lipidique	Accumulation de lipides intracellulaires par les CMLv
Type III	Intermédiaire	Type II associé à de petites gouttelettes lipidiques extracellulaires
Type IV	Athérome	Type II associé à de multiples gouttelettes lipidiques extracellulaires
Type V	Fibroathérome	Chape fibreuse entourant le noyau lipidique (V-a) avec présence de calcification (V-b)
Type VI	Compiqué	Rupture de la chape fibreuse, hémorragie intra-plaque, thrombose.

Tableau 2 : Classification des lésions athéroscléreuse selon (Stary et al., 1995)

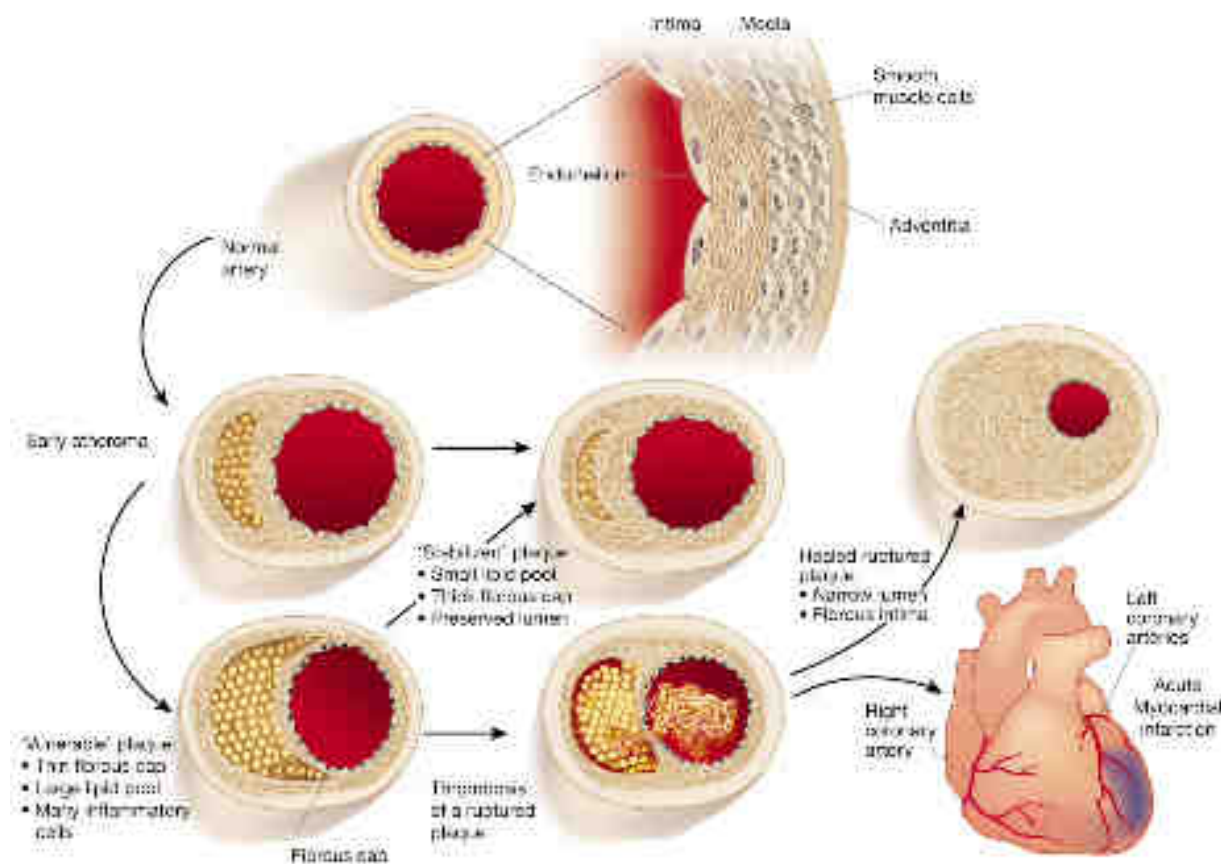


Figure 42 : Genèse de la formation de la plaque d'athérome (Libby, 2002)

6.4. La calcification vasculaire

La calcification vasculaire est une complication fréquente de l'athérosclérose. Elle fait intervenir des processus complexes de minéralisation qui interviennent également dans l'ostéogenèse. Les mécanismes physiopathologiques de la calcification vasculaire sont encore aujourd'hui mal connus. Au sein de la zone de calcification, on retrouve des cellules de type ostéo-chondrocytaire. L'origine de ces cellules fait encore débat, certaines hypothèses reposent sur la trans-différenciation de cellules musculaires lisses vasculaires ou de péricytes en cellules de type ostéo-chondrocytaire. D'autres hypothèses parlent de cellules ostéoprogénitrices circulantes qui viennent s'infiltrer dans les tissus pour former des calcifications (Johnson et al., 2006). Les calcifications vasculaires ont été classées en quatre groupes différents qui comprennent : les calcifications des plaques d'athérome, les calcifications de la media des artères de grand et moyen calibre, les calcifications des valves cardiaques et les calciphylaxis qui sont des dépôts de phosphate de calcium dans le tissu sans l'intervention de cellules de type ostéo-chondrocytaire (Vattikuti and Towler, 2004).

6.4.1. Mécanismes impliqués dans la calcification des plaques d'athérome

6.4.1.1. La chondrogenèse

La calcification vasculaire fait intervenir des facteurs de transcription également impliqués lors de l'ossification endochondrale et membranaire comme Sox9 et Cart1. La chondrogenèse est un processus organisé en plusieurs étapes. La première étape est la prolifération et la condensation des cellules mésenchymateuses avec la production de collagène de type IIa. Cette première étape fait intervenir plusieurs facteurs de croissance, tels que le TGF- β , et les protéines de la famille des Wnts telles que Wnt-5a, Wnt-3a et Wnt-7a (Chun et al., 2008). Cette phase fait également intervenir des facteurs de transcription comme SRY (sex determining region Y)-box 9 (Sox9) et cartilage homeoprotein 1 (Cart1/Alx1) (Zhao et al., 1993). Puis dans une deuxième phase, les cellules mésenchymateuses se différencient en chondroprogéniteurs et commencent à produire du collagène de type IIB, IX, XI et de l'aggrécane. Pendant cette dernière étape, Sox9 continue à être exprimé et d'autres facteurs de croissance sont produits comme l'IGF1, FGF-2, BMP-2/4/7/14. La chondrogenèse se termine par la maturation et l'hypertrophie des chondrocytes (DeLise et al., 2000), qui s'accompagne à la fin de l'expression de Sox9 et le début de l'expression des gènes de l'ostéogenèse comme Indian hedgehog (Ihh), Runt-related transcription factor 2 (Runx2) et

Collagène X. Ce processus est principalement régulé par l'expression de Sox9 (figure 43). Une des voies de régulation de Sox9 est la voie canonique des Wnt/ β -caténine.

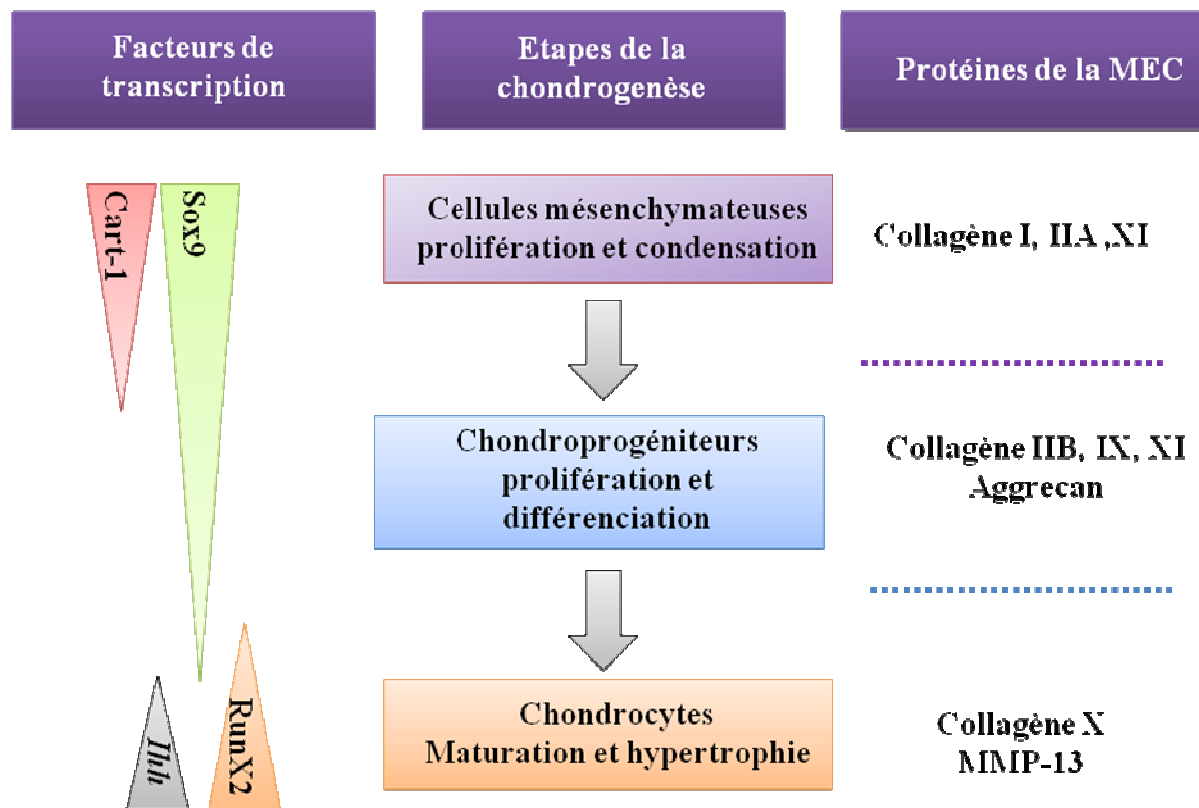


Figure 43: Etapes de la chondrogenèse.

6.4.1.2. La voie canonique des Wnt/ β -caténine

La voie Wnt/ β -caténine passe par la liaison d'une protéine de la famille des Wnt sur le récepteur membranaire Frizzled et sur son co-récepteur le low density related protein 5/6 (LRP5/6). La transduction du signal se traduit par l'activation de la protéine cytoplasmique Dishevelled (Dsh) qui inhibe alors la Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3). L'inhibition de la GSK-3 conduit à l'accumulation de β -caténine dans le cytoplasme. Par la suite, la β -caténine est transportée dans le noyau et active les gènes cibles des protéines Wnts en se fixant sur le « T cell Factor » et le « lymphoid enhancer factor » (TCF/LEF) qui sont des facteurs de transcription (Logan and Nusse, 2004). Cette voie de signalisation est essentielle à la différenciation chondrocytaire.

Il existe deux types de protéines sécrétées capables de réguler la voie des Wnt/ β -caténine en bloquant l'interaction des Wnts avec leur récepteur frizzled. La première classe de

protéines est composée de certains membres de la famille Dickkopf (Dkk) qui se fixent à une des sous-unités intracellulaires du co-récepteur des Wnt (Kawano and Kypta, 2003). La deuxième classe fait intervenir la famille des secreted Frizzled-related protein (sFRP), Wnt inhibitory factor-1 (WIF) et Cerberus qui se fixent directement aux protéines Wnts sécrétées et les empêchent de se lier à leurs récepteurs. Actuellement, 8 membres de la famille des sFRP ont été identifiés. Mais tous les sFRP ne sont pas capables de bloquer la voie des Wnts. Seules sFRP1, sFRP2 et sFRP3 ont été identifiés comme se liant aux Wnts et bloquant leur activité (Kawano and Kypta, 2003).

Récemment, nous avons identifié le low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) comme étant un récepteur impliqué dans la régulation de l'expression de Wnt5-a, une protéine de la famille des Wnts (Terrand et al., 2009).

6.4.2. LRP1 dans l'athérosclérose

LRP1, également connu comme CD91, alpha-2-macroglobuline et TGF α -V, a été découvert par l'équipe du Professeur Joachim Herz en 1988. LRP1 est un récepteur membranaire ubiquitaire qui appartient à la famille des récepteurs LDL (LDLr) (Lillis et al., 2008) (figure 44). Il est composé d'une partie extracellulaire (chaîne α) de 515 kDa attachée de façon non covalente à une partie cytoplasmique (chaîne β) de 85 kDa (figure 44). Sur sa partie extracellulaire, LRP1 peut fixer une quarantaine de ligands différents tels que des lipoprotéines, des facteurs de croissance et des protéines de la matrice extracellulaire. En plus de son rôle d'endocytose, LRP1 intervient dans différents processus biologiques comme le métabolisme des lipides, la migration cellulaire ou la protection vasculaire. Il a également été montré que LRP-1 était impliqué dans le métabolisme du cholestérol par la régulation de la voie Wnt/ β -caténine, par l'intermédiaire de Wnt-5a (Terrand et al., 2009).

En 2003, LRP1 a été identifié comme jouant un rôle protecteur dans l'athérosclérose au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. En effet, les souris déficientes en LRP1 au niveau des cellules musculaires lisses soumises à un régime athérogène développent moins de plaques d'athérome que les souris contrôles (Boucher et al., 2003). Le mécanisme impliqué dans ce processus fait intervenir la voie du PDGFBB. En effet, en l'absence de LRP1, il a été observé une sur-activation de la voie du PDGFBB avec une hyper-phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$ (Extracellular Signal-Regulated Kinase $\frac{1}{2}$). Cette activation de la voie du PDGFBB se

manifeste par une prolifération non-controlée des cellules musculaires lisses vasculaires qui contribue à la croissance de la plaque d'athérome.

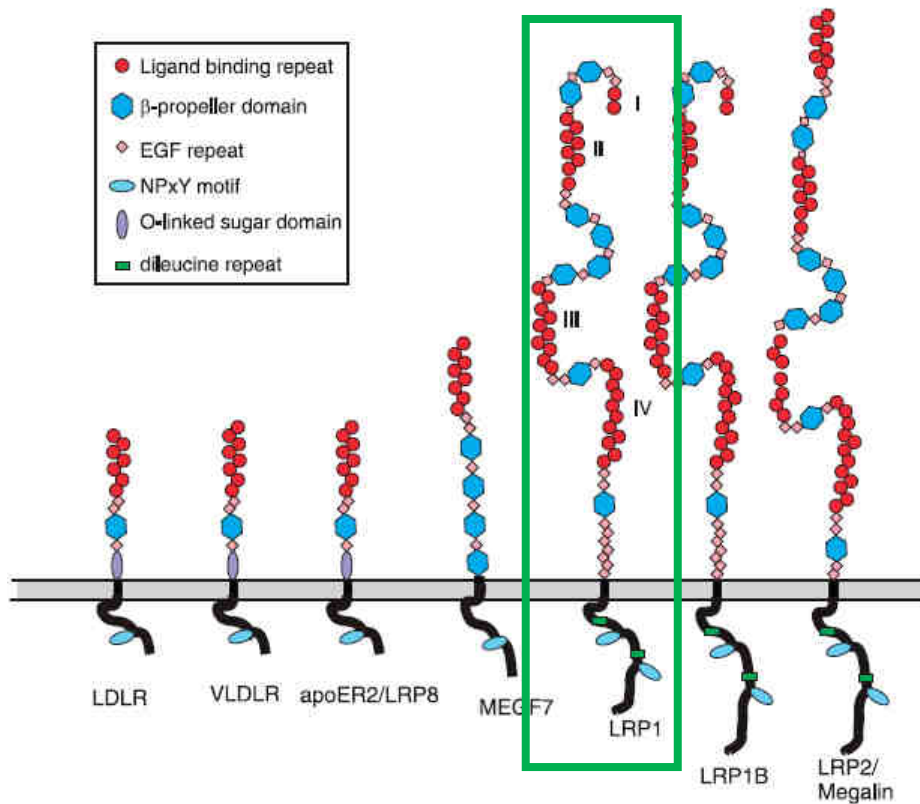


Figure 44 : La famille des récepteurs LDL d'après (Lillis et al., 2008)

De plus le traitement des souris déficientes en LRP1 au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires avec la rosiglitazone, un agoniste du récepteur nucléaire PPAR gamma, réduit la formation de lésions athéroscléreuses et de cellules spumeuses (Boucher et al., 2007).

6.4.3. PPAR gamma dans l'athérosclérose

Les peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) sont des facteurs de transcription nucléaires constitués de 3 isoformes : α , β/δ , γ impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires comme le métabolisme des lipides, l'oxydation des acides gras, le métabolisme du glucose, l'adipogenèse et la différenciation cellulaire. Chaque isoforme est codée par un gène différent dans des tissus différents. PPAR α est exprimé dans des tissus où le catabolisme des acides gras est important comme le tissu adipeux, le foie, le cœur, le rein et les intestins. PPAR β/δ joue un rôle important dans la peau, l'intestin, le placenta et les muscles cardiaque et squelettique, le tissu adipeux et le cerveau. PPAR γ est présent sous deux isoformes

PPAR γ 1 et PPAR γ 2. L'isoforme la plus petite PPAR γ 1 est exprimée principalement dans les intestins, le cerveau, dans la paroi vasculaire, dans les cellules de l'immunité et de l'inflammation alors que PPAR γ 2 est principalement exprimée dans le tissu adipeux (Wahli and Michalik, 2012).

Le mécanisme d'action des PPARs fait intervenir le RXR (Retinoid X receptor) un autre récepteur nucléaire qui forme un hétéro-dimère avec PPAR. Ce dimère active la transcription des gènes cibles en se liant au niveau des régions régulatrices sur une séquence spécifique appelée PPRE (PPAR responsive element).

Dans la paroi vasculaire PPAR γ est exprimé dans tous les types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose : les cellules endothéliales, les macrophages et les cellules musculaires lisses. Chez la souris, l'absence de PPAR γ dans les cellules musculaires lisses vasculaires ou dans les macrophages entraîne respectivement une augmentation de la susceptibilité à développer des plaques d'athérosclérose (Hamblin et al., 2011) ou de l'hypercholestérolémie (Babaev et al., 2005). L'absence de PPAR γ dans les cellules endothéliales cause une dysfonction endothéliale lorsque les souris sont soumises à un régime riche en cholestérol (Qu et al., 2012). PPAR gamma est également impliqué dans la différenciation cellulaire. Il est le principal régulateur de la différenciation adipocytaire (Tontonoz and Spiegelman, 2008). Il est également impliqué dans l'ostéogenèse où il joue un rôle inhibiteur. En effet, les cellules embryonnaires déficientes en PPARgamma ne peuvent pas se différencier en adipocytes et se différencient spontanément en ostéoblastes. De plus les souris déficientes en PPAR γ (hétérozygote) ont une densité osseuse plus importante que les souris contrôles (Akune et al., 2004; Cock et al., 2004).

Objectifs

La calcification des plaques d'athérome est une complication fréquente associée à des risques élevés d'infarctus. Elle est stimulée par des facteurs de transcription présents également dans la différenciation ostéo-chondrocytaire comme la famille des Wnts. Récemment nous avons identifié LRP1 un récepteur transmembranaire comme étant un régulateur de la voie canonique de Wnt5a. Notre hypothèse est que, LRP1 en stimulant la voie des Wnts, et PPAR gamma en contrôlant la différenciation cellulaire, jouent un rôle pour contrôler la calcification des plaques d'athérome.

Pour tester cette hypothèse nous avons généré au laboratoire des souris déficientes en PPAR γ , LRP1 et PPAR γ +LRP1 spécifiquement dans les cellules musculaires lisses vasculaires.

-Caractérisation phénotypique des souris déficientes en PPAR γ , LRP1 et PPAR γ +LRP1 spécifiquement dans les cellules musculaires lisses vasculaires.

- Identification des mécanismes impliqués dans la calcification vasculaire.

Article

ARTICLE

Received 14 Mar 2012 | Accepted 23 Aug 2012 | Published 25 Sep 2012

DOI: 10.1038/ncomms2087

The nuclear hormone receptor PPAR γ counteracts vascular calcification by inhibiting Wnt5a signalling in vascular smooth muscle cells

Estelle Woldt¹, Jérôme Terrand¹, Mohamed Mlih¹, Rachel L. Matz¹, Véronique Bruban¹, Fanny Coudane¹, Sophie Foppolo¹, Zeina El Asmar¹, Maria Eugenia Chollet², Ewa Ninio², Audrey Bednarczyk³, Danièle Thiersé³, Christine Schaeffer³, Alain Van Dorsselaer³, Christian Boudier¹, Walter Wahli⁴, Pierre Chambon⁵, Daniel Metzger⁵, Joachim Herz⁶ & Philippe Boucher¹

Vascular calcification is a hallmark of advanced atherosclerosis. Here we show that deletion of the nuclear receptor PPAR γ in vascular smooth muscle cells of low density lipoprotein receptor (LDLr)-deficient mice fed an atherogenic diet high in cholesterol, accelerates vascular calcification with chondrogenic metaplasia within the lesions. Vascular calcification in the absence of PPAR γ requires expression of the transmembrane receptor LDLr-related protein-1 in vascular smooth muscle cells. LDLr-related protein-1 promotes a previously unknown Wnt5a-dependent prochondrogenic pathway. We show that PPAR γ protects against vascular calcification by inducing the expression of secreted frizzled-related protein-2, which functions as a Wnt5a antagonist. Targeting this signalling pathway may have clinical implications in the context of common complications of atherosclerosis, including coronary artery calcification and valvular sclerosis.

¹ CNRS, UMR 7213, University of Strasbourg, 67401 Illkirch, France. ² INSERM UMR5937, University of Paris, Paris, France. ³ CNRS, UMR 7178, University of Strasbourg, 67087 Strasbourg, France. ⁴ Center for Integrative Genomics, University of Lausanne, Lausanne, Switzerland. ⁵ IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Inserm 964/CNRS UMR 7104, University of Strasbourg, Illkirch, France. ⁶ Department of Molecular Genetics, and Center for Alzheimer's and Neurodegenerative Disease, UT Southwestern Medical Center, Dallas, Texas, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.B. (email: philippe.boucher@unistra.fr).

Vascular calcification is a frequent complication of atherosclerosis that positively correlates with a high risk of myocardial infarction, hypertension and ischemic episodes in peripheral vascular disease^{1,2}. In the Framingham Heart Study, patients with cardiovascular disease had a prevalence of vascular calcification of 68% in men and 57% in women at a mean age of 61 years³. Despite its clinical importance, the mechanisms leading to vascular calcifications are not known. Data have converged to indicate that vascular calcification is an actively regulated process similar to the membranous and endochondral bone formation, leading to increased expression of osteogenic and chondrogenic factors, tissue biomineralization and accumulation of cartilage-like cells in the vessel wall⁴. This calcification process is stimulated by bone/vascular morphogens, as well as by autocrine and paracrine Wnt signals^{5–7}. The Wnt protein family consists of 22 cysteine-rich secreted glycoproteins, which are involved in many differentiation processes⁸. Inactivation of Wnt-5a in mice or in the chick impairs chondrogenic differentiation and results in abnormal skeletogenesis^{9,10}.

Recently, we reported that the low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1), a multifunctional protein that binds numerous ligands and controls multiple signalling pathways, regulates a canonical Wnt5a signalling pathway in fibroblasts^{11,12}. LRP1, by inducing the expression of Wnt5a, protects against cholesterol intracellular accumulation¹³. *In vivo*, LRP1 protects against atherosclerosis¹⁴. LRP1 negatively controls TGF β and PDGF signalling^{15,16} in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and disruption of this regulatory mechanism decreases cellular cholesterol export, and leads to foam cell accumulation when mice are fed an atherogenic high cholesterol diet (Paigen diet)^{17,18}. Interestingly, treatment of mice in which LRP1 has been selectively ablated in VSMCs (smLRP1^{-/-}) with rosiglitazone, an agonist of the nuclear receptor PPAR γ , normalizes TGF β signalling and reduces atherosclerotic lesion formation and foam cell accumulation¹⁵, suggesting a genetic interaction between LRP1 and PPAR γ in the vascular wall. PPAR γ is involved in a number of differentiation processes. It is a potent activator of adipogenesis¹⁹ and an inhibitor of osteoblast differentiation^{20,21}. Thus, we hypothesized that LRP1 by stimulating Wnt signalling, and PPAR γ by controlling cell differentiation, might jointly control chondrogenesis and vascular calcification.

To test this hypothesis, we generated mice that lack PPAR γ selectively in VSMCs. We found that these mice, when bred on a low density lipoprotein receptor (LDLR)^{-/-} background to increase atherosclerosis susceptibility, exhibit enhanced Wnt5a expression in the vascular wall and are susceptible to vascular calcification when fed an atherogenic diet. Interestingly, the lack of both PPAR γ and LRP1 in VSMCs prevented calcifications. We show that PPAR γ counteracts the LRP1/Wnt5a pro-chondrogenic pathway by stimulating the expression of secreted frizzled-related protein 2 (sFRP2).

Results

Lack of PPAR γ in VSMCs accelerates vascular calcification. We generated SM22Cre+/PPAR $\gamma^{loxP/loxP}$ mice, in which PPAR γ is selectively ablated in smooth muscles, by crossing SM22Cre transgenic mice²² with floxed PPAR γ animals (PPAR $\gamma^{loxP/loxP}$)²³. To increase atherosclerosis susceptibility, SM22Cre+/PPAR $\gamma^{loxP/loxP}$ animals were maintained on a LDL receptor-deficient background (LDLR^{-/-})²⁴, and are hereafter referred to as smPPAR γ ^{-/-}. Whereas no lesions were seen in smPPAR γ ^{-/-} mice fed a regular chow diet, when they were fed an atherogenic diet for 20 weeks, they developed twofold larger atherosclerotic lesions in their aortas than age-matched controls (Fig. 1a–c). This is in agreement with a previous report showing that following angiotensin II (angII) perfusion, mice deleted for PPAR γ in VSMCs have increased atherosclerosis and aneurysms²⁵. Histological analysis of the arterial wall in large vessels such as the aortas and smaller vessels such as the iliac arteries revealed an accumulation of chondrocyte-like cells within the

core of the atherosclerotic plaques, whereas reduced macrophage Mac-2-positive and CD68-positive foam cells accumulated (Fig. 1d,e). The atherosclerotic lesion size, as well as the accumulation of chondrocyte-like cells in aortas, was similar in male and female mice (Fig. 1a,c; Supplementary Fig. S1a–c). Von Kossa staining for mineral deposits (Fig. 1d,e) showed prominent calcification of the lesions, characteristic of advanced atherosclerosis undergoing vascular mineralization^{3,22}. In agreement with these results, we found that calcium deposits accumulated in smPPAR γ ^{-/-} aortas (Fig. 1f). As expected, control mice (smPPAR γ ^{+/+}) accumulated Mac2 and CD68-positive foam cells in atherosclerotic plaques (Fig. 1d), whereas almost no chondrocyte-like cells were seen (Supplementary Fig. S1d).

mRNA levels encoding chondrocyte-specific proteins, such as the Pbx-related AP1 transcription factor *Runx2*, *Col10a1*, osteocalcin, alkaline phosphatase (ALP), *Runx2* and *Col2a*, which promote mineralization²⁶, were significantly increased in aortas of male and female smPPAR γ ^{-/-} mice (Fig. 2a; Supplementary Fig. S1e). Moreover, high transcript levels of the transcription factor sex-determining region Y (SRY)-box 9 (*Sox9*), a master regulator of chondrogenesis²⁷, and of the transcription factor cartilage homeoprotein 1 (*Cart1*)²⁸, which has been reported to stimulate chondrogenesis in bone and in the vascular wall^{29–31} were found in the core of the lesions (Fig. 2b). To test whether PPAR γ ^{-/-} VSMCs can differentiate into chondrocyte-like cells *in vitro*, VSMCs isolated from aortas of 1- to 4-month-old smPPAR γ ^{-/-} mice were treated with a chondrogenic cocktail for 15 days. Alizarin red and Alcian blue staining revealed that VSMCs PPAR γ ^{-/-} accumulated mineral deposits (Fig. 2c). Transcript levels of the chondrogenic markers *Sox9* and *Cart1* were increased compared with controls (Fig. 2d). Similar results were obtained in primary cultured PPAR γ ^{-/-} skin fibroblasts treated with a chondrogenic cocktail (Supplementary Fig. S2a,b). Thus, the expression of PPAR γ in VSMCs inhibits the expression of chondrogenic and osteogenic markers, and protects against the accumulation of chondrocyte-like cells in the arterial wall. Interestingly, mRNA levels of the vascular smooth muscle cell markers myosin heavy chain (SM α HC) and smooth muscle Actin (sm Actin) were reduced in aortas from SM22Cre+/PPAR $\gamma^{loxP/loxP}$ LDLR^{-/-} (smPPAR γ ^{-/-}) mice (Fig. 2e), suggesting that PPAR γ -deficient cells had partly lost their smooth muscle phenotype, and had differentiated towards a chondrocytic lineage.

Molecular mechanisms leading to increased calcification. As Wnt5a has been shown to initiate differentiation of chondrocytes *in vitro* and *in vivo*³², we tested whether it might also be involved in the phenotype observed in smPPAR γ ^{-/-} mice. Wnt5a transcripts levels in aortas from these mice were twofold increased compared with controls (Fig. 3a). Interestingly, we found an intense Wnt5a immunoreactivity in atherosclerotic lesions from human carotid arteries (Fig. 3b) and a marked increase in Wnt5a mRNA levels (Fig. 3c) in calcified regions. To determine whether Wnt5a can activate the chondrogenic program, we used LRP1^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) that do not express endogenous Wnt5a³³. We show that recombinant Wnt5a strongly stimulates luciferase expression driven by the *Cart1* and *Sox9* promoters (Fig. 3d; Supplementary Fig. S2c). Thus, Wnt5a can activate essential components of the chondrogenic program, and its increased expression in arteries is associated with chondrogenic metaplasia in mice, as well as in humans.

As recent genetic experiments have shown that sFRP2, a Wnt antagonist member of the sFRP family, is a potent inhibitor of chondrogenesis³⁴, we tested whether PPAR γ stimulates the expression of sFRP2 in VSMCs. sFRP2 transcripts were reduced to almost undetectable levels in aortas from smPPAR γ ^{-/-} mice (Fig. 4a), whereas transcripts of other sFRPs such as sFRP1 remained unchanged (Supplementary Fig. S2d), suggesting that sFRP2 is a PPAR γ target.

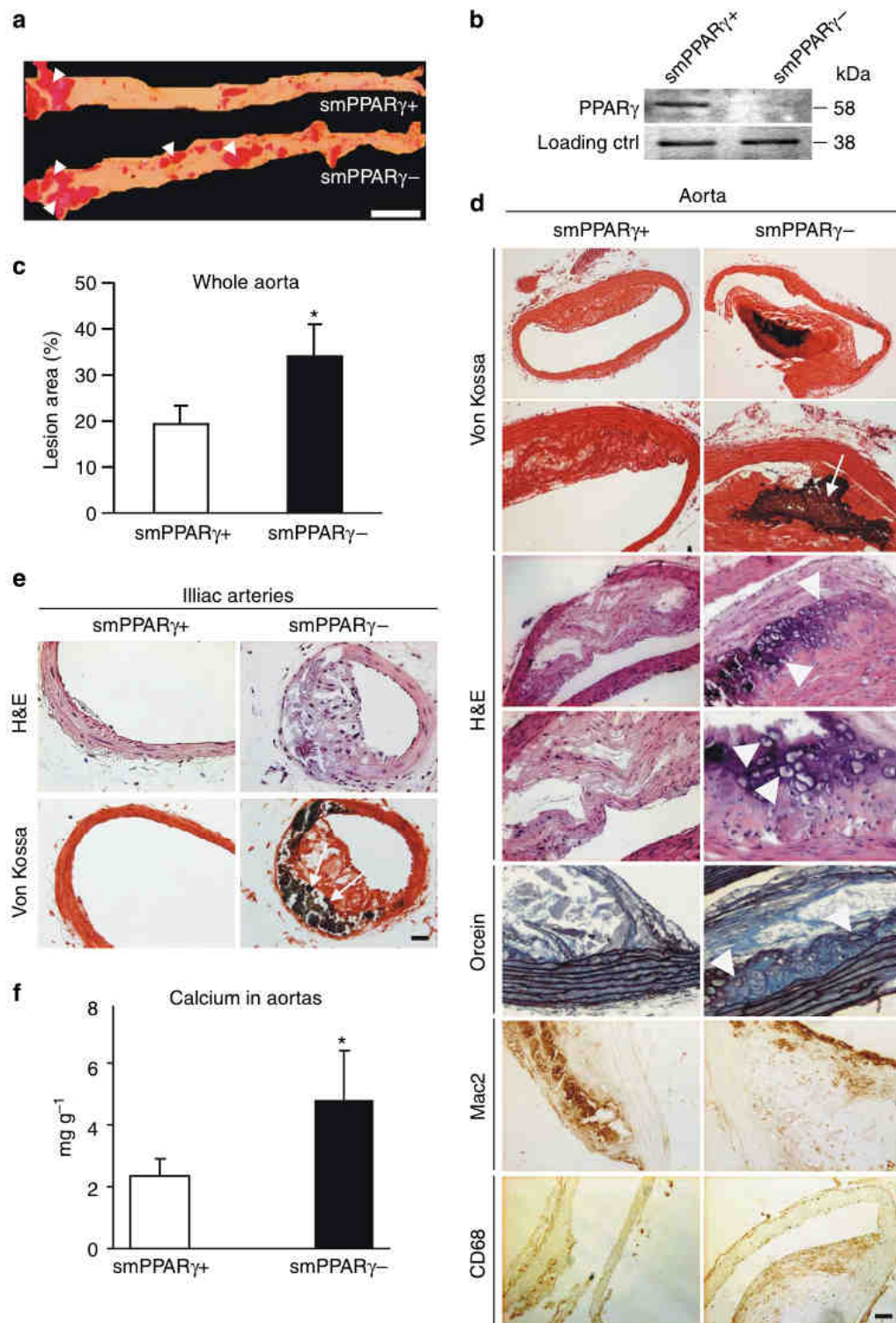


Figure 1 | Vascular calcification in mice lacking PPAR γ in VSMCs and fed a cholesterol-rich diet. (a) Opened and Sudan IV-stained aortas from smPPAR γ ⁻ male mice and controls (smPPAR γ ⁺). Arrowheads show lipid-laden (Sudan-positive) atherosclerotic lesions. Scale bar, 0.5 cm. **(b)** PPAR γ western blotting in aortas. **(c)** Atherosclerotic lesion size in aortas from smPPAR γ ⁻ male ($n=3$) and control ($n=4$) mice. Error bars, s.d. * $P<0.05$. **(d)** Staining of the lesions in aortas. Arrows show calcified lesions and arrowheads show chondrocyte-like cells. Scale bar, VK, 100 μ m (top), 50 μ m (bottom); Hematoxylin and eosin (H&E), 50 μ m (top), 20 μ m, (bottom); Orcein (Or), Mac2, and CD68, 20 μ m. **(e)** Staining of the lesions in iliac arteries. Scale bar, 50 μ m. **(f)** Calcium deposits accumulation in aortas from smPPAR γ ⁻ ($n=6$) and control ($n=7$) mice. Error bars, s.e.m. * $P<0.05$.

gene. We also found a putative PPAR γ response element (PPRE)^{27,28} located between nucleotides -897 and -884 of the *sFRP2* promoter (Supplementary Fig. S3a). Chromatin immunoprecipitation experiments showed that PPAR γ binds to the *sFRP2* promoter

region encompassing this PPRE in MEFs treated with an adipogenic cocktail containing rosiglitazone to induce PPAR γ expression and activity (Fig. 4b). These data demonstrate that PPAR γ controls expression of the Wnt antagonist *sFRP2* at the transcriptional level.

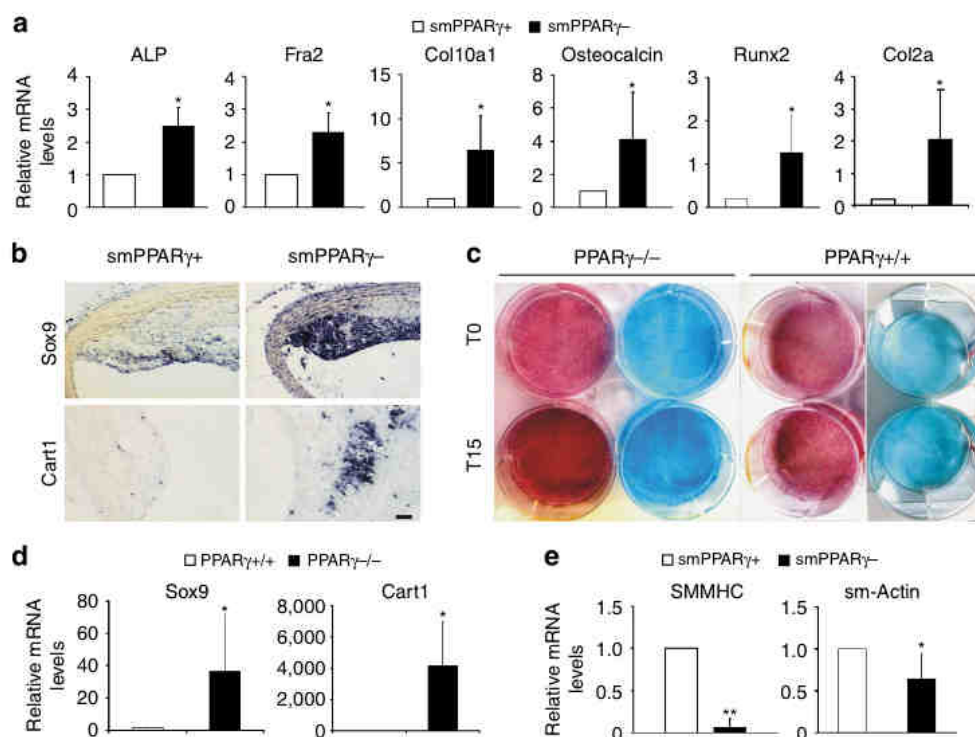


Figure 2 | Expression of functional markers in aortas from smPPAR γ ⁻ mice. (a) RT-PCR analysis and (b) *in situ* hybridization of the indicated genes in aortas from smPPAR γ ⁻ ($n=5$) and control mice ($n=5$) fed an atherogenic diet. Scale bar, 50 μ m. (c) Alizarin red (left panels of each genotype) and alcian blue (right panels of each genotype) staining of VSMCs isolated from smPPAR γ ⁻ and control mice aortas and treated (T15) or not (T0) with a chondrogenic cocktail for 15 days. (d) RT-PCR analysis of the indicated genes of VSMCs isolated from smPPAR γ mice aortas treated 15 days for chondrogenesis (each genotype $n=5$). (e) RT-PCR analysis of VSMC-selective markers in aortas from smPPAR γ ⁻ mice ($n=5$) and controls ($n=5$). Error bars, s.d. * $P<0.05$; ** $P<0.01$.

To test whether sFRP2 can inhibit the chondrogenic program in VSMCs, we treated wild-type human VSMCs (HUVSMCs) for 24 h with recombinant sFRP2 or with the PPAR γ agonist rosiglitazone. Both treatments decreased Cart1 mRNA levels (Fig. 4c). Treatment for 15 days of PPAR γ ^{-/-} VSMCs isolated from aortas of smPPAR γ ⁻ mice with a chondrogenic cocktail containing recombinant sFRP2 greatly decreased Sox9 and Cart1 mRNA levels (Fig. 4d,e) and inhibited mineralization (Fig. 4f). However, treatment of these cells for 15 days with 10 μ M rosiglitazone did not inhibit chondrogenesis (Fig. 4g). Similarly, treatment of smPPAR γ ⁻ mice with rosiglitazone for 2 months did not reduce vascular calcification (Fig. 4h, Supplementary Fig. S2e,f). Thus, PPAR γ by positively controlling sFRP2 expression inhibits chondrogenesis in VSMCs.

To test whether sFRP2 is a Wnt5a antagonist, an expression vector encoding a Wnt5a-myc tagged protein was transfected into Human Embryonic Kidney HEK 293 cells that express high sFRP2 levels. Immunoprecipitation of the Wnt5a-myc protein from the extracellular medium using anti-myc antibodies revealed a physical interaction between sFRP2 and Wnt5a (Fig. 4i). Moreover, recombinant sFRP2 strongly antagonized Wnt5a-induced activation of the Cart1 promoter in LRP1^{-/-} MEFs (Fig. 4j). Taken together, these data strongly suggest that PPAR γ prevents vascular calcification by stimulating the expression of sFRP2, an antagonist of the Wnt5a prochondrogenic pathway.

LRP1 in VSMCs is required for vascular calcification. We previously reported that LDLr^{-/-} mice lacking LRP1 in VSMCs (smLRP1⁻) develop atherosclerotic lesions¹³ with accumulation of foam cells in their vascular wall²⁹. Interestingly, no vascular calcification was described in these mice, suggesting that LRP1 might

be required for vascular calcification. To test this, we measured the expression of chondrogenic markers in aortas from smLRP1⁻ mice and found that Sox9 and Cart1 (Fig. 5a), as well as ALP mRNA levels (Supplementary Fig. S3b) were unchanged compared with controls. Atherosclerotic lesions in smLRP1⁻ mice consisted mainly of macrophage Mac-2-positive and CD68-positive foam cell accumulation, and Von Kossa staining confirmed the absence of calcification (Fig. 5a). We also found low mRNA levels of Wnt5a in aortas from smLRP1⁻ mice (Fig. 5b), whereas sFRP2 mRNA levels remained unchanged compared with controls (Supplementary Fig. S3c). Moreover, *in vitro*, primary cultured LRP1^{-/-} VSMCs, as well as skin fibroblasts, were resistant to differentiation when treated with a chondrogenic cocktail for 15 days (Fig. 5c and Supplementary Fig. S3d). mRNA levels of Cart1 and Sox9 were much less induced than in LRP1^{+/+} cells (Fig. 5d; Supplementary Fig. S3e).

To further demonstrate that LRP1 is required for vascular calcification, we generated LDLr^{-/-} mutant mice in which both PPAR γ and LRP1 were selectively ablated in VSMCs (smPPAR γ ⁻/smLRP1⁻) and fed them an atherogenic diet for 20 weeks. In these mice, the area covered by atheromas (Fig. 6a), as well as the accumulation of macrophage Mac-2-positive and CD68-positive foam cells (Fig. 6b), were similar to that of smLRP1⁻ mice. No accumulation of chondrocytes or calcium deposits was seen in the aortas of these mice (Fig. 6b,c). mRNA levels of Sox9, Cart1 (Fig. 6b), ALP (Supplementary Fig. S3f), as well as Wnt5a (Fig. 6e) remained unchanged, whereas sFRP2 mRNA levels were reduced (Fig. 6d). When treated with a chondrogenic cocktail for 15 days VSMCs isolated from aortas of smLRP1⁻/smPPAR γ ⁻ mice were resistant to differentiation (Supplementary Fig. S3g). mRNA levels of Cart1 and Sox9 remained unchanged in these cells (Supplementary Fig. S3h). Thus, LRP1 in VSMCs is required for vascular calcification

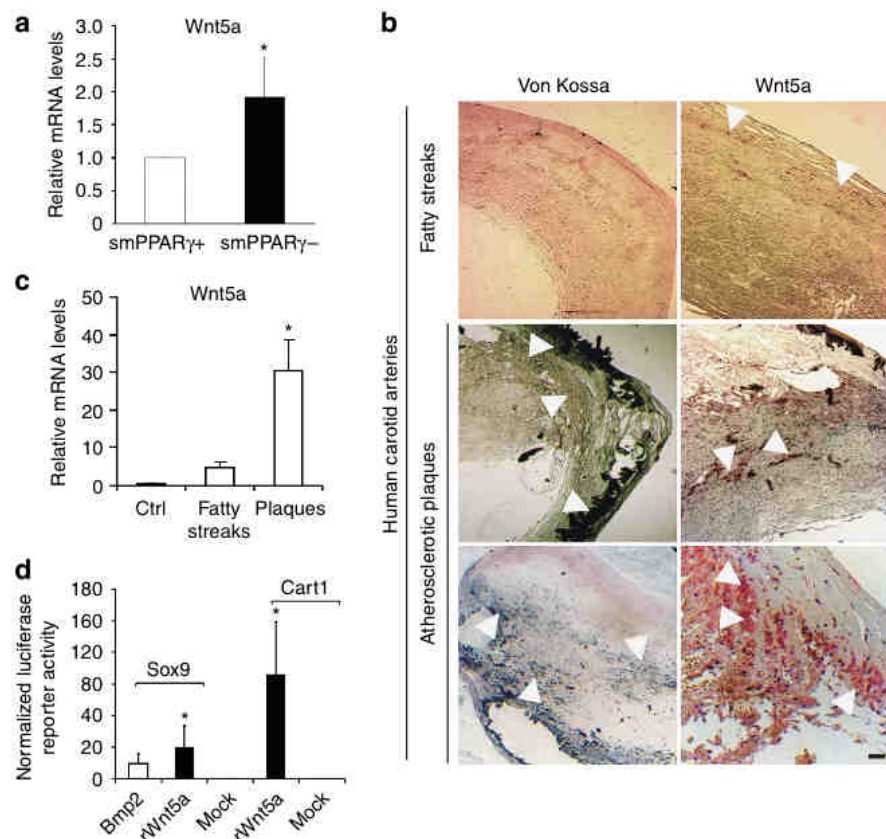


Figure 3 | Wnt5a expression correlates with calcification in mice and human arteries. (a) Wnt5a mRNA levels in aortas from smPPAR γ ^{-/-} ($n = 5$) and control mice ($n = 5$) fed an atherogenic diet. (b) Immunohistochemistry and Von Kossa staining, and (c) RT-PCR analysis of Wnt5a in atherosclerotic lesions from human internal mammary (Ctrl, $n = 3$), and human carotid arteries with (atherosclerotic plaques) and without (fatty streaks) calcified lesions ($n = 4$). Arrowheads show Wnt5a labeling (in red) and calcified lesions. Scale bar, 50 μ m. (d) Luciferase reporter activity in LRP1^{-/-} MEFs transiently transfected with luciferase reporter containing the Sox9 or the Cart1 promoter, and treated with 100 ng ml⁻¹ purified recombinant Wnt5a, mock fraction (without Wnt5a) or BMP2 as positive control (100 ng ml⁻¹) ($n = 4$). Error bars, s.d. * $P < 0.05$.

by promoting a prochondrogenic Wnt5a signalling, which is antagonized by the PPAR γ target gene, *sFRP2* (Fig. 7).

Discussion

The mechanisms underlying vascular calcification have been difficult to study because of the lack of appropriate animal models. Previous studies suggested that PPAR γ ^{30,31} is involved in ectopic calcification, but the underlying molecular mechanism was unclear. In the present study, we identified a functional interaction between PPAR γ and LRP1 in VSMCs of mice that leads to calcified lesions of arteries resembling those seen in humans. We show that mice fed a high-cholesterol diet develop enhanced vascular calcification when PPAR γ is selectively deleted in VSMCs (Fig. 1e,f). Proteins inducing osteoblastic and chondrocytic differentiation, such as Sox9, ALP, Cart1 and osteocalcin, were upregulated in calcified atherosclerotic lesions of smPPAR γ -deficient vessels.

We have shown that the levels of the Wnt inhibitor sFRP2 are strongly reduced in vessels of smPPAR γ ^{-/-} mice, allowing activation of Wnt5a signalling, which promotes calcification of mice. In addition, we show that Wnt5a levels are overexpressed in human atherosclerotic lesions undergoing calcification. We also provide evidence that PPAR γ binds to the sFRP2 promoter and stimulates sFRP2 expression. Recent experiments have shown that sFRP2 inhibits both osteogenic and chondrogenic lineage commitment of mesenchymal stem cells³², and that its overexpression decreases calcification within infarcted myocardium³². Here we show that sFRP2 inhibits chondrogenesis of PPAR γ ^{-/-} VSMCs. In wild-type

VSMCs, a treatment with the PPAR γ ligand rosiglitazone or with recombinant sFRP2 decreases the expression of chondrogenic markers. Conversely, sFRP2 inhibits chondrogenesis of PPAR γ -deficient VSMCs and rosiglitazone does not inhibit chondrogenesis in PPAR γ ^{-/-} VSMCs, as well as in smPPAR γ ^{-/-} mice. Thus, by inducing the expression of sFRP2, PPAR γ protects against vascular calcification. sFRP2 is a secreted protein that has been described to antagonize Wnt1 and Wnt9a²⁶. Here we show that it also interacts with Wnt5a^{9,10}, a regulator of chondrogenesis. sFRP2 is expressed in proliferating and prehypertrophic chondrocytes³³. Its ablation in mice leads to abnormal skeletogenesis, whereas overexpression is associated with a delay in chondrocyte maturation³⁴. The mechanism by which Wnt5a regulates the chondrogenic program was unknown. In the present study, we have shown that Wnt5a induces the expression of two regulators of chondrogenesis, Sox9 and Cart1, and this is associated with ectopic chondrogenesis in the vessel wall. Moreover, we have demonstrated that mice selectively lacking LRP1 or both LRP1 and PPAR γ in VSMCs and fed an atherogenic diet, exhibit low levels of Wnt5a in the aorta, and are protected against vascular calcifications. Taken together, these data demonstrate that the expression of LRP1 in VSMCs is required for vascular calcification to occur, and that PPAR γ by counteracting the LRP1/Wnt5a pro-chondrogenic pathway protects against vascular calcification.

PPAR γ is known to act as a transcriptional sensor that translates stimuli from the local environment into adaptive metabolic responses. For instance, PPAR γ is essential for adipogenesis, which

is induced by lipogenic stimuli³⁵, but it is also a key repressor of osteoblastogenesis^{36,37}. *In vitro* data suggest that PPAR γ activation stimulates adipocyte differentiation of mesenchymal stromal precursor cells at the expense of osteoblastogenesis. A similar switch may occur *in vivo* in VSMCs, where in the absence of PPAR γ , VSMCs undergo a phenotypic change towards the chondrocytic lineage³⁸. This process is affected by the composition of the diet, as it occurs only in mice fed an atherogenic high-cholesterol diet.

The notion that VSMCs can undergo phenotypic changes has been previously reported³⁹. Indeed, VSMCs can give rise to chondrocytes⁴⁰ and have important roles in the initiation and progression of vascular calcification^{40,41}. Moreover, it has previously been suggested that arterial calcification is associated with a decrease in smooth muscle lineage markers, and an increase in chondrogenic markers⁴². Here, we report a decrease in the mRNA levels of the VSMCs markers MHC and sm-Actin in aortas from smPPAR γ - mice, indicating that cells have partly lost their characteristic contractile phenotype⁴³, an event that may facilitate their differentiation toward the chondrocytic lineage. Alternatively, albeit unlikely, chondrocyte-like cells that accumulate in the media of blood vessels from smPPAR γ - mice originate from monocyte-macrophages that have lost Mac-2 and CD68 expression.

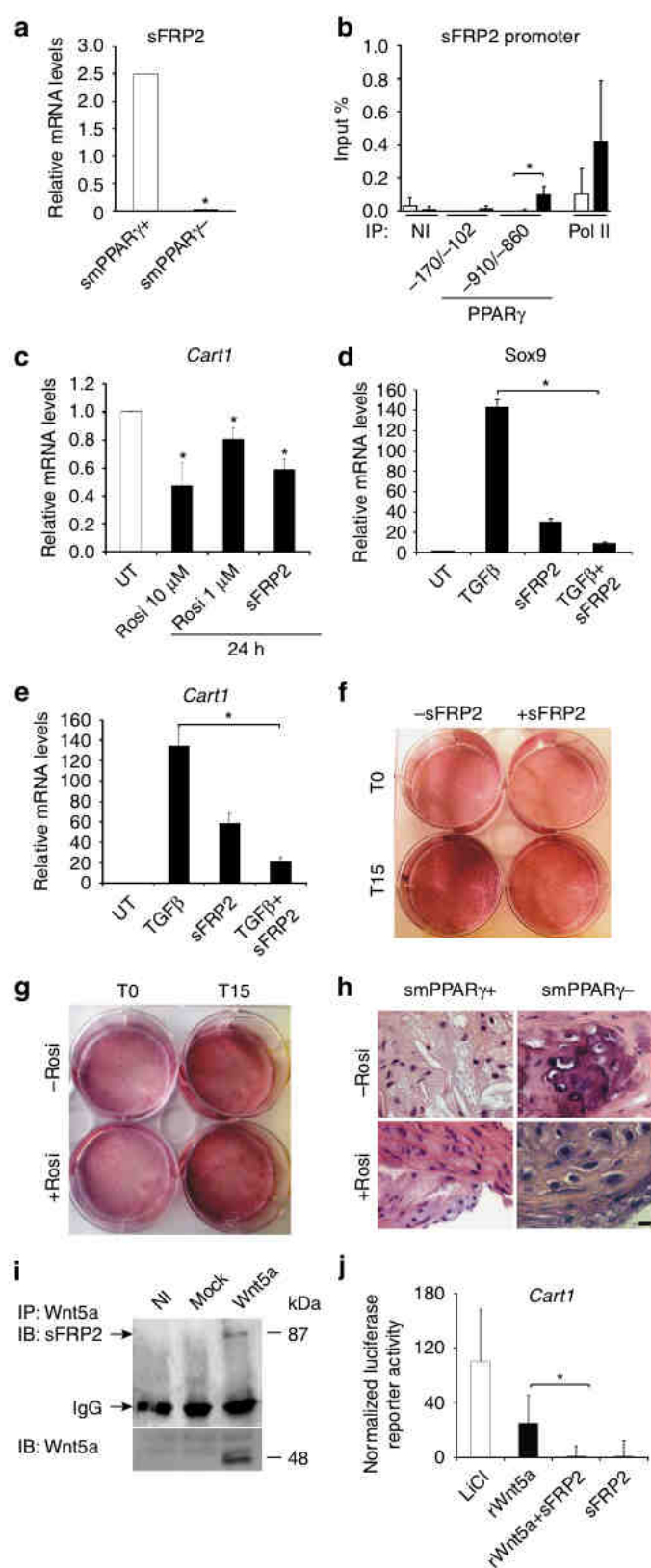
In summary, our data show that LRP1 and PPAR γ are important determinants for chondrocyte differentiation in the vascular wall and for vascular calcification induced during atherosclerosis. By positively regulating a canonical Wnt5a signalling pathway, LRP1 is a pro-chondrogenic factor in the vascular wall. PPAR γ , in contrast, by enhancing the expression of the Wnt5a inhibitor sFRP2, counteracts the LRP1-mediated chondrogenic program (Fig. 7), and acts as an inhibitor of vascular calcification. Our findings may have important clinical implications, as they indicate that selective PPAR γ agonists such as thiazolidinediones might have therapeutic value for the treatment and prevention of artery calcifications.

Methods

Animals. The generation of LDLR knockout, LRP1^{fllox/fllox} SM22Cre and PPAR γ ^{fllox/fllox} animals has been reported earlier^{13,19}. Mice in which LRP1 was ablated in VSMC are referred to as smLRP1- (SM22Cre+; LRP1^{fllox/fllox}; LDLR-/-), and their littermate controls are referred to as smLRP1+ (LRP1^{fllox/fllox}; LDLR-/-). Mice in which PPAR γ was ablated in VSMC are referred to as smPPAR γ - (SM22Cre+; PPAR γ ^{fllox/fllox}; LDLR-/-), and their littermate controls are referred to as smPPAR γ + (PPAR γ ^{fllox/fllox}; LDLR-/-). Animals were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle. As most of the smLRP1- mice and the smLRP1/smPPAR γ double mutants died when fed a Paigen diet for more than 11 (ref. 13) or 20 weeks, respectively, mice were fed a standard laboratory chow (UAR, Villemois-sur-Orge, France) or a Paigen diet for a maximum of 11 weeks for the smLRP1, and 20 weeks for the smPPAR γ mice and the smLRP1/smPPAR γ double mutants. All animals used in the experiments were age- and sex-matched and littermates. Experiments were conducted according to procedures approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at University of Strasbourg, France. For histological analysis,

Figure 4 | sFRP2 inhibits chondroid metaplasia in aortas and VSMCs.

(a) sFRP2 mRNA levels in aortas from smPPAR γ - ($n=5$) and control mice ($n=5$) fed an atherogenic diet. (b) ChIP analysis of PPAR γ binding to the sFRP2 promoter region containing (-910/-860) or not (-170/-102) PPREs ($n=3$). (c) mRNA levels of *Cart1* in wild-type human VSMCs treated for 24 h with a chondrogenic cocktail containing 1–10 μ M rosiglitazone, or recombinant sFRP2 (300 ng ml⁻¹). (d) Sox9 and (e) *Cart1* mRNA levels in VSMCs from aortas of smPPAR γ - mice treated for 15 days with a chondrogenic cocktail containing or not (UT) sFRP2 (300 ng ml⁻¹). (f) Alizarin red staining of VSMCs isolated from PPAR γ -/- aortas and treated for chondrogenesis +/- recombinant sFRP2 during 15 days. (g) Alizarin red staining of VSMCs isolated from aortas of smPPAR γ - mice and treated for 15 days with a chondrogenic cocktail containing (T15) or not (T0) 1 μ M rosiglitazone. (h) Histological analysis and Hematoxylin and eosin (H&E) staining of aortas from smPPAR γ - and control mice fed an atherogenic diet + rosiglitazone. Scale bar, 20 μ m. (i) Co-immunoprecipitation between Wnt5a and endogenous sFRP2 in HEK 293 cells transiently transfected with a Wnt5a-myc construct. NI, non-immune. IB, immunoblot; IP, immunoprecipitation. (j) Luciferase reporter activity in LRP1-/- MEFs transiently transfected with luciferase reporter containing the *Cart1* promoter, and treated with 100 ng ml⁻¹ purified recombinant Wnt5a (rWnt5a), recombinant sFRP2 (300 ng ml⁻¹) or LiCl as positive control (50 mM) ($n=3$). Error bars, s.d. * $P<0.05$.



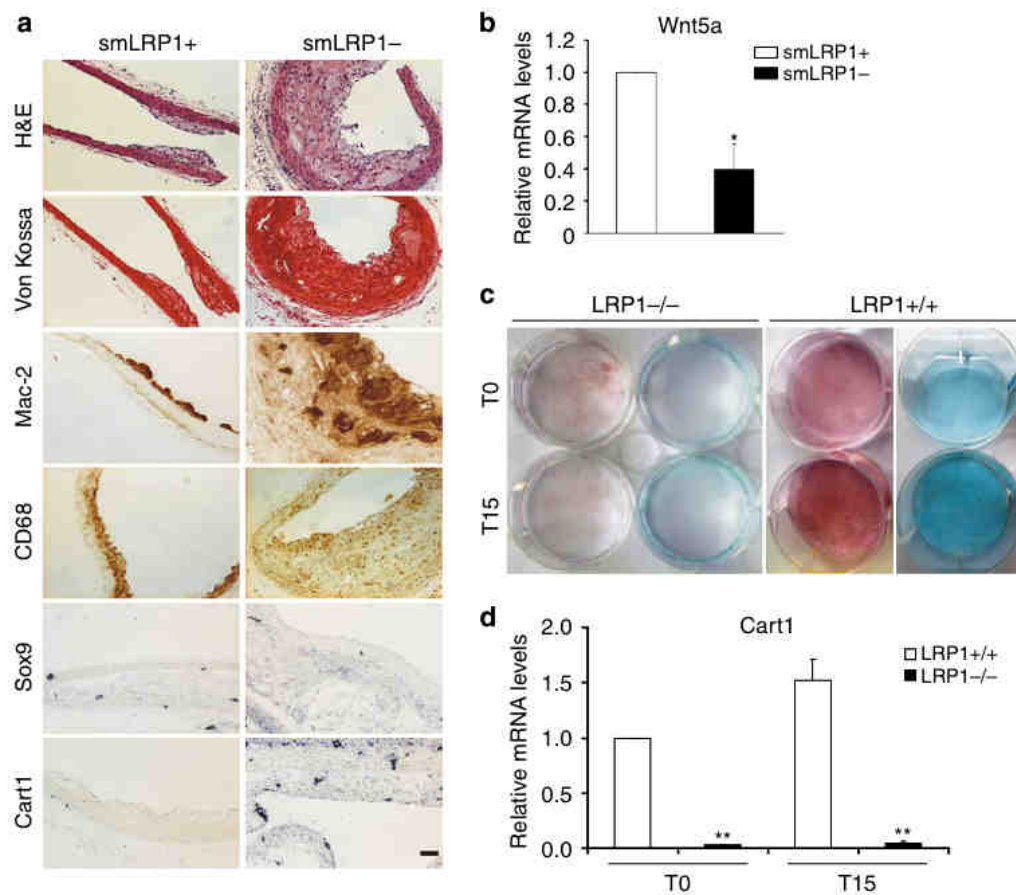


Figure 5 | LRP1 is required for chondroid metaplasia in aortas. (a) Histological analysis and Hematoxylin and eosin (H&E) staining, Von Kossa staining, immunostaining with Mac-2 and CD68 antibodies, and *in situ* hybridization with Sox9 and Cart1 antisense probes in opened aortas from smLRP1⁻ mice fed a cholesterol-rich diet. Scale bar, 50 μ m. (b) Wnt5a mRNA levels in aortas from smLRP1⁻ ($n = 5$) and control mice ($n = 5$). (c) Alizarin red (left panels of each genotype) and alcian blue (right panels of each genotype) staining, and (d) Cart1 mRNA levels in VSMCs isolated from aortas of smLRP1⁻ mice and treated with a chondrogenic cocktail for 15 days ($n = 4$). Error bars, s.d. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

mice were transcardially perfused with a 4% paraformaldehyde solution in phosphate-buffered saline. Entire aortas were dissected, opened and stained with Sudan IV to reveal lipid-filled atherosclerotic lesions¹³. Hematoxylin/Eosin and Von Kossa staining were performed according to standard methods. For calcium measurement, aortic samples were weighted, dried at 105 °C, and mineralized in concentrated HNO₃. The solution was filtered (0.45 μ m) and the volume adjusted to 20 ml with H₂O. Solution was analysed by inductively coupled Plasma Optical Emission Spectrometers at 396.8 nm. For rosiglitazone treatments, rosiglitazone maleate was mixed into the paigen diet at 25 mg kg⁻¹ per day for 2 months.

Human samples. Human carotid endarterectomy samples containing calcified atherosclerotic lesions were obtained from the Vascular Surgery Department (Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris). Fragments of left internal mammary arteries, remaining after coronary artery bypass graft surgery, were obtained from the Cardiovascular Department (Centre Hospitalier Intercommunal, Créteil). An informed consent from all patients was obtained. For Von Kossa staining, sections were de-paraffinized and hydrated to water. Sections were incubated with 1% silver nitrate solution in the darkness for 30 min. After rinsing with distilled water, un-reacted silver was removed with 5% sodium thiosulfate for 5 min. Slides were then counterstained with nuclear fast red for 5 min.

In situ hybridization. Mouse aortas were embedded in OCT (Tissue-Tek; Miles) and frozen in dry ice. Sections (10 μ m) were thaw mounted onto slides (Superfrost plus, Menzel-Glaser) and stored at -80 °C. Complementary DNA (cDNA) fragments for mouse Sox9, Cart1 and VEGF were subcloned to synthesize antisense probes. Digoxigenin-11-UTP RNA sense and antisense riboprobes were transcribed in the presence of UTP-11-Digoxigenin by T7 and T3 RNA polymerases. After probe hybridization, slides were coated with anti-digoxigenin antibody conjugated with Alkaline phosphatase and stained in NTMT (NaCl 100 mM, Tris 100 mM pH 9.5, MgCl₂/6H₂O 50 mM, Tween-20 0.1%), NBT (nitroblue tetrazolium)/BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) buffer.

Cell culture and immunoprecipitation experiments. Cells were seeded in 100 mm dishes and grown to 80% confluence in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen, CA) supplemented with 10% (v/v) new-born calf serum. Adipocyte differentiation was induced as described¹². For primary cultured VSMCs and skin fibroblasts, thoracic aortas and skin from 8-week-old male smLRP1⁻, smPPAR γ ⁻, smLRP1⁻/smPPAR γ ⁻ and controls mice were dissected free from connective tissue. After 15 min at 37 °C in DMEM supplemented with NSC 10% and collagenase 0.1%, the aortas were opened longitudinally and the intima scraped on luminal surface. Tissue samples were minced into small pieces and placed into a T25 flask with high-glucose (4.5 g l⁻¹) DMEM containing 15% fetal bovine serum, 100 U ml⁻¹ penicillin, 100 mg ml⁻¹ streptomycin, 20 mM L-glutamine. Both explants and cells were cultured at 37 °C in 5% carbon dioxide (CO₂). Cells were detached by incubation with 0.25% trypsin-EDTA solution. Passages 4–7 were used in this study. Chondrogenic differentiation was induced with TGF β (10 ng ml⁻¹) for 15 days in 10% FCS/DMEM. Immunoprecipitation experiments were done as described previously¹³. Briefly, cells were washed with ice-cold PBS and lysed for 20 min on ice in lysis buffer supplemented with protease inhibitors. The lysates were precleared, then incubated overnight at 4 °C with the indicated antibody and protein A-Sepharose CL-4B beads. Immunoprecipitates were washed twice with lysis buffer and lysis buffer containing 2 M NaCl, and twice in 10 mM Tris, pH 8, 50 mM NaCl. Proteins were eluted from beads with SDS sample buffer, separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membrane and blotted with the indicated antibody.

Recombinant proteins. Purification of the murine recombinant Wnt5a was described earlier⁴⁴. Cells were infected with 100 ng ml⁻¹ purified recombinant Wnt5a. Infected cell supernatant was cleared by centrifugation at 4 °C, aliquoted and stored at -20 °C until use. The Myc-tagged Wnt5a construct¹² was cloned into the pcDNA 3.1 Zeo (Invitrogen).

Gene expression analysis. RNA was isolated using TRIzol reagent (Sigma, St Louis) according to the manufacturer's instructions. A total of 50 ng of RNA was converted to cDNA using the high-capacity cDNA Archive kit (Applied

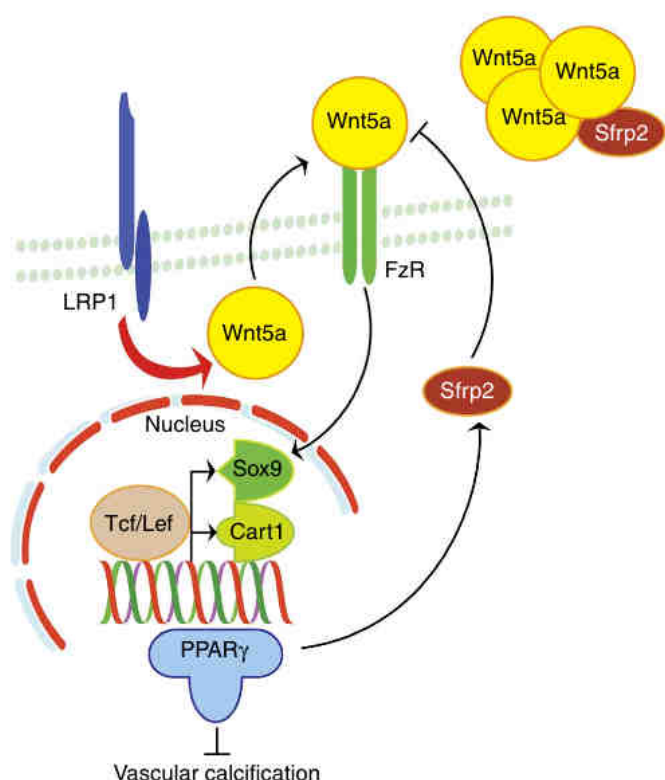


Figure 7 | A schematic diagram of LRP1-dependent vascular calcification.

When mice are fed an atherogenic diet, vascular calcification is induced if LRP1 is expressed in VSMCs. LRP1 positively regulates a Wnt5a signalling pathway that activates chondrogenic-specific genes in the vascular wall. PPAR γ and its target sFRP2 protect against vascular calcification by inhibiting the pro-chondrogenic Wnt5 pathway. Conversely, in the absence of LRP1, Wnt5a signaling is inhibited, which promotes intracellular cholesterol accumulation and foam cell development.

References

1. Wilson, P. W. *et al.* Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation* **103**, 1529–1534 (2001).
2. Sage, A. P., Tintut, Y. & Demer, L. L. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat. Rev. Cardiol.* **7**, 528–536 (2010).
3. Walsh, C. R. *et al.* Abdominal aortic calcific deposits are associated with increased risk for congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Am. Heart J.* **144**, 733–739 (2002).
4. Guzman, R. J. Clinical, cellular, and molecular aspects of arterial calcification. *J. Vasc. Surg.* **45** (Suppl A), A57–A63 (2007).
5. Karreth, E., Hoeberitz, A., Scheuch, H., Eferl, R. & Wagner, E. F. The AP1 transcription factor Fra2 is required for efficient cartilage development. *Development* **131**, 5717–5725 (2004).
6. Shao, J. S. *et al.* Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J. Clin. Invest.* **115**, 1210–1220 (2005).
7. Zhao, Q., Behringer, R. R. & de Crombrughe, B. Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the Cart1 homeobox gene. *Nat. Genet.* **13**, 275–283 (1996).
8. Logan, C. Y. & Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 781–810 (2004).
9. Kawakami, Y. *et al.* Involvement of Wnt-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Dev. Growth Differ.* **41**, 29–40 (1999).
10. Yamaguchi, T. P., Bradley, A., McMahon, A. P. & Jones, S. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* **126**, 1211–1223 (1999).
11. May, P., Woldt, E., Matz, R. L. & Boucher, P. The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Ann. Med.* **39**, 219–228 (2007).
12. Terrand, J. *et al.* LRP1 controls intracellular cholesterol storage and fatty acid synthesis through modulation of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **284**, 381–388 (2009).
13. Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W. P., Anderson, R. G. & Herz, J. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* **300**, 329–332 (2003).
14. Zhou, L., Takayama, Y., Boucher, P., Tallquist, M. D. & Herz, J. LRP1 regulates architecture of the vascular wall by controlling PDGFR β -dependent phosphatidylinositol 3-kinase activation. *PLoS One* **4**, e6922 (2009).
15. Boucher, P. *et al.* LRP1 functions as an atheroprotective integrator of TGF β and PDGF signals in the vascular wall: implications for Marfan syndrome. *PLoS One* **2**, e448 (2007).
16. Tontonoz, P. & Spiegelman, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 289–312 (2008).
17. Cock, T. A. *et al.* Enhanced bone formation in lipodystrophic PPAR γ (hyp/hyp) mice relocates haematopoiesis to the spleen. *EMBO Rep.* **5**, 1007–1012 (2004).
18. Akune, T. *et al.* PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J. Clin. Invest.* **113**, 846–855 (2004).
19. Imai, T. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4543–4547 (2004).
20. Ishibashi, S. *et al.* Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* **92**, 883–893 (1993).
21. Subramanian, V., Golledge, J., Ijaz, T., Bruemmer, D. & Daugherty, A. Pioglitazone-induced reductions in atherosclerosis occur via smooth muscle cell-specific interaction with PPAR γ . *Circ. Res.* **107**, 953–958 (2010).
22. Shao, J. S., Cai, J. & Towler, D. A. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1423–1430 (2006).
23. Bostrom, K. *et al.* Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* **91**, 1800–1809 (1993).
24. Tyson, K. L. *et al.* Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 489–494 (2003).
25. Church, V., Nohno, T., Linker, C., Marcelle, C. & Francis-West, P. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J. Cell Sci.* **115**, 4809–4818 (2002).
26. Morello, R. *et al.* Brachy-syndactyly caused by loss of Sfrp2 function. *J. Cell Physiol.* **217**, 127–137 (2008).
27. Keen, H. L. *et al.* Bioinformatic analysis of gene sets regulated by ligand-activated and dominant-negative peroxisome proliferator-activated receptor gamma in mouse aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 518–525 (2010).
28. Lemay, D. G. & Hwang, D. H. Genome-wide identification of peroxisome proliferator response elements using integrated computational genomics. *J. Lipid Res.* **47**, 1583–1587 (2006).
29. Zhou, L., Choi, H. Y., Li, W. P., Xu, F. & Herz, J. LRP1 controls cPLA2 phosphorylation, ABCA1 expression and cellular cholesterol export. *PLoS One* **4**, e6853 (2009).
30. Abedin, M. *et al.* N-3 fatty acids inhibit vascular calcification via the p38-mitogen-activated protein kinase and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathways. *Circ. Res.* **98**, 727–729 (2006).
31. Lencel, P. *et al.* Cell-specific effects of TNF-alpha and IL-1beta on alkaline phosphatase: implication for syndesmozyte formation and vascular calcification. *Lab Invest.* **91**, 1434–1442 (2011).
32. Alfaro, M. P. *et al.* SFRP2 suppression of BMP and WNT signaling mediates mesenchymal stem cell (MSC) self-renewal promoting engraftment and myocardial repair. *J. Biol. Chem.* **285**, 35645–35653 (2010).
33. Yang, Y., Topol, L., Lee, H. & Wu, J. Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* **130**, 1003–1015 (2003).
34. Daumer, K. M., Tufan, A. C. & Tuan, R. S. Long-term *in vitro* analysis of limb cartilage development: involvement of Wnt signaling. *J. Cell. Biochem.* **93**, 526–541 (2004).
35. Rosen, E. D. *et al.* PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell.* **4**, 611–617 (1999).
36. Wan, Y. PPAR γ in bone homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 722–728 (2010).
37. Wan, Y., Chong, L. W. & Evans, R. M. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat. Med.* **13**, 1496–1503 (2007).
38. Naik, V. *et al.* Sources of cells that contribute to atherosclerotic intimal calcification: an *in vivo* genetic fate mapping study. *Cardiovasc. Res.* **94**, 545–554 (2012).
39. Iyemere, V. P., Proudfoot, D., Weissberg, P. L. & Shanahan, C. M. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J. Intern. Med.* **260**, 192–210 (2006).
40. Speer, M. Y. *et al.* Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ. Res.* **104**, 733–741 (2009).

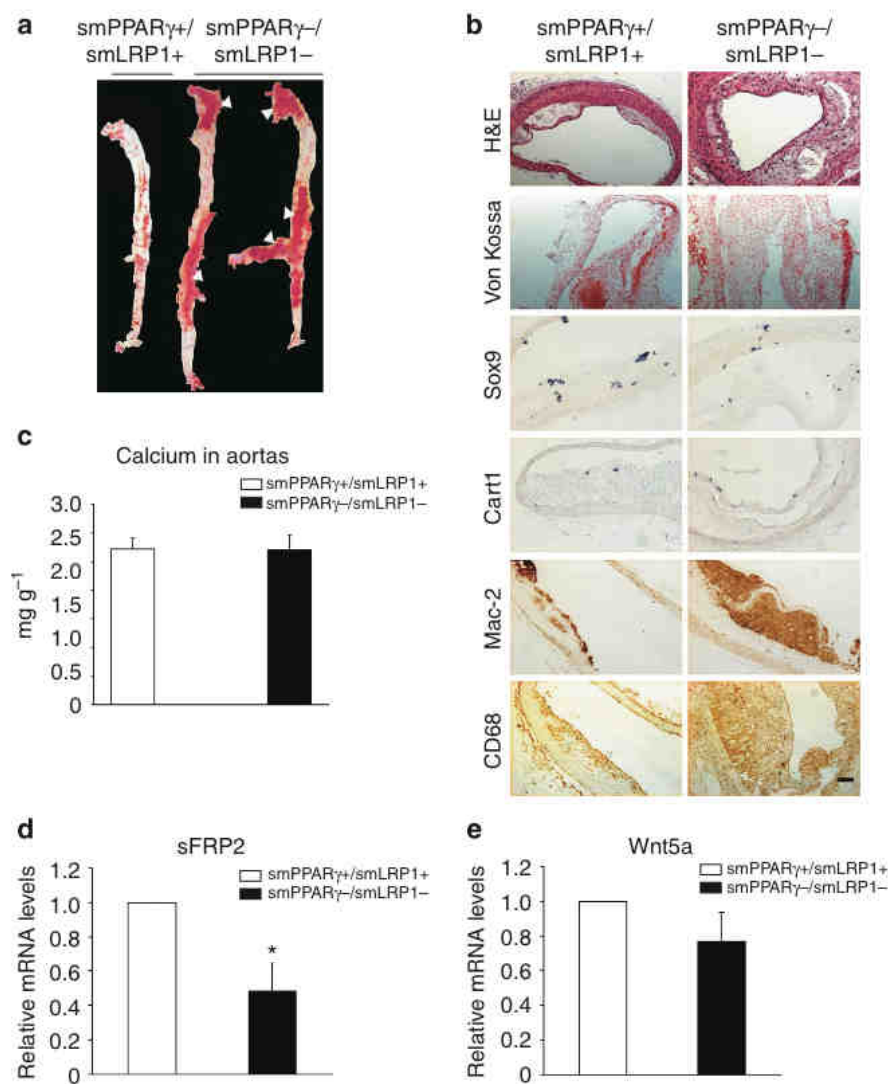


Figure 6 | smLRP1^{-/-}/smPPAR γ ^{-/-} mice are protected against vascular calcification. (a) En-face analysis of Sudan IV-stained aortas from smPPAR γ ^{-/-}/smLRP1^{-/-} mice that have been fed a cholesterol-rich diet for 20 weeks. (b) Hematoxylin and eosin (H&E), Von Kossa staining, immunostaining with Mac-2 and CD68 antibodies and *in situ* hybridization with Sox9 and Cart1 antisense probes in opened aortas from smLRP1^{-/-}/smPPAR γ ^{-/-} mice fed a cholesterol-rich diet. Scale bars, 50 μ m. (c) Calcium deposits accumulation in aortas from smPPAR γ ^{-/-}/smLRP1^{-/-} ($n=5$) and control ($n=4$) mice. (d) sFRP2 and (e) Wnt5a mRNA levels in aortas from smLRP1^{-/-}/smPPAR γ ^{-/-} ($n=5$) and control mice ($n=5$). Error bars, s.d. * $P<0.05$.

Biosystems, Foster City, CA). PCR amplification was performed using SYBRGreen PCR master mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Primers sequences are:

ALP: forward (for.) 5'-CCTGAACTCCCAAAAGCTC-3', reverse (rev.) 5'-TCTGGTGGCATCTCGTTATC-3'; Fra2: for. 5'-GAGTGATCAAGACCA TCGGTACC-3', rev. 5'-AGACAGCTGCTCATCTCTCCTTC-3'; Col10a1: for. 5'-CTTGTGTGCCTTTCAATCG-3', rev. 5'-GTGAGGTACAGCCTACC AGTTTT-3'; Osteocalcin: for. 5'-CTCTGTCTCTCTGACCTCAGCA-3', rev. 5'-GGAGCTGCTGTGACATCCATAC-3'; Runx2: for. 5'-GAGGGCACAAG TTCTATCTGGA-3', rev. 5'-GGTGGTCCGCGATGATCTTC-3'; Col2a: for. 5'-ACACTGGGAATGTCTCTGC-3', rev. 5'-ACCTGCCAGACCATCTTGAC-3'; Sox9: for. 5'-AGCAAGAACAAGCCACAGTC-3', rev. 5'-TCGTTTCAGCA GCCTCCAGA-3'; Cart1: for. 5'-CAATGGATAACTGCAACAATCTCAG-3', rev. 5'-CTGGATACATTGCTGTGCACATTTG-3'; SMMHC: for. 5'-CACCTGG AGAGGATGAAGAAGAA-3', rev. 5'-AAGACTTGACTTTCACTTGGAGT TTATC-3'; SmActin: for. 5'-ATCGTCCACCGCCAAATGC-3', rev. 5'-AAGG AACTGGAGGCGCTG-3'; Wnt5a: for. 5'-GCAGACCGAACGCTGTCAT-3', rev. 5'-CCTTCACCTGGATACCACCCA-3'; Sfrp2: for. 5'-ACGACAACGAC ATCATGGAA-3', rev. 5'-ACGCCGTTCAGCTTGTAAT-3'; Sfrp1: for. 5'-GCCACAACGTGGGCTACAA-3', rev. 5'-ACCTCTGCCATGGTCTCGT-3'; GAPDH: for. 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3', rev. 5'-CTGCTTCAC CACCTTCTTGAT-3'.

Reporter gene assay. The Sox9 (~2 kb)⁴⁵ and the Cart1 promoter (Supplementary Fig. S2b) linked to a luciferase reporter were transiently transfected in HEK

293 cells or MEFs using a calcium phosphate standard method. At 48 h after the transfection, cells were collected and reporter gene assays were carried out using the Luciferase assay system (Promega). Transfection efficiency was normalized by measuring expression of β -galactosidase activity and background activity was subtracted. Mock is the luciferase activity in the absence of exogenous Wnt5a.

Antibodies and immunoblotting. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblot analysis were performed according to standard procedures. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and immunoblot analyses were carried out using antibodies directed against β -catenin (1/1,000), sFRP2 (1/1,000), LRP1 (1/1,000), c-Myc (1/500) (R&D systems, Minneapolis, MN), or GAPDH (1/10,000) (Sigma).

Chromatin immunoprecipitation. ChIPs were performed on MEF cells for three or more biological replicates as described⁴⁶. Non-specific controls were performed with samples incubated with sepharose beads in the presence of non-immune antibodies. Primer sequences were designed to amplify the specific 5'-897-GAGGTCAAATTTCTCCTC-881-3' promoter region of sFRP2. Results are expressed relative to the amount of input DNA per ChIP.

Statistical analysis. Values are reported as mean $\pm$ s.d. of at least triplicate determinations. For *in vivo* analysis, 3–6 male and female mice were used for each genotype. Statistical significance ($P<0.05$) was determined by unpaired Student's *t*-test (Statview, Abacus Concepts, Berkeley, CA).

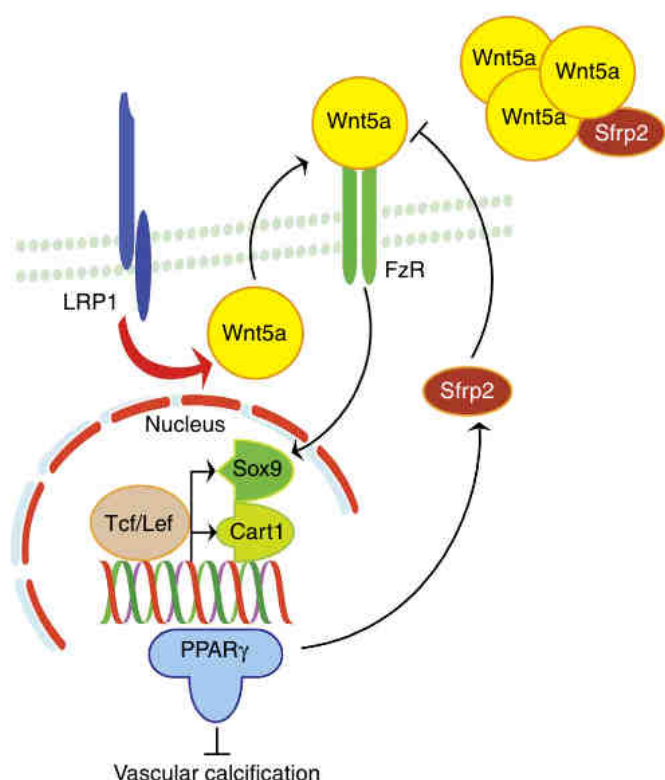


Figure 7 | A schematic diagram of LRP1-dependent vascular calcification.

When mice are fed an atherogenic diet, vascular calcification is induced if LRP1 is expressed in VSMCs. LRP1 positively regulates a Wnt5a signalling pathway that activates chondrogenic-specific genes in the vascular wall. PPAR γ and its target sFRP2 protect against vascular calcification by inhibiting the pro-chondrogenic Wnt5 pathway. Conversely, in the absence of LRP1, Wnt5a signaling is inhibited, which promotes intracellular cholesterol accumulation and foam cell development.

References

1. Wilson, P. W. *et al.* Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation* **103**, 1529–1534 (2001).
2. Sage, A. P., Tintut, Y. & Demer, L. L. Regulatory mechanisms in vascular calcification. *Nat. Rev. Cardiol.* **7**, 528–536 (2010).
3. Walsh, C. R. *et al.* Abdominal aortic calcific deposits are associated with increased risk for congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Am. Heart J.* **144**, 733–739 (2002).
4. Guzman, R. J. Clinical, cellular, and molecular aspects of arterial calcification. *J. Vasc. Surg.* **45** (Suppl A), A57–A63 (2007).
5. Karreth, E., Hoeberitz, A., Scheuch, H., Eferl, R. & Wagner, E. F. The AP1 transcription factor Fra2 is required for efficient cartilage development. *Development* **131**, 5717–5725 (2004).
6. Shao, J. S. *et al.* Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals. *J. Clin. Invest.* **115**, 1210–1220 (2005).
7. Zhao, Q., Behringer, R. R. & de Crombrughe, B. Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the Cart1 homeobox gene. *Nat. Genet.* **13**, 275–283 (1996).
8. Logan, C. Y. & Nusse, R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 781–810 (2004).
9. Kawakami, Y. *et al.* Involvement of Wnt-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Dev. Growth Differ.* **41**, 29–40 (1999).
10. Yamaguchi, T. P., Bradley, A., McMahon, A. P. & Jones, S. A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* **126**, 1211–1223 (1999).
11. May, P., Woldt, E., Matz, R. L. & Boucher, P. The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Ann. Med.* **39**, 219–228 (2007).
12. Terrand, J. *et al.* LRP1 controls intracellular cholesterol storage and fatty acid synthesis through modulation of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **284**, 381–388 (2009).
13. Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W. P., Anderson, R. G. & Herz, J. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* **300**, 329–332 (2003).
14. Zhou, L., Takayama, Y., Boucher, P., Tallquist, M. D. & Herz, J. LRP1 regulates architecture of the vascular wall by controlling PDGFR β -dependent phosphatidylinositol 3-kinase activation. *PLoS One* **4**, e6922 (2009).
15. Boucher, P. *et al.* LRP1 functions as an atheroprotective integrator of TGF β and PDGF signals in the vascular wall: implications for Marfan syndrome. *PLoS One* **2**, e448 (2007).
16. Tontonoz, P. & Spiegelman, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPAR γ . *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 289–312 (2008).
17. Cock, T. A. *et al.* Enhanced bone formation in lipodystrophic PPAR γ (hyp/hyp) mice relocates haematopoiesis to the spleen. *EMBO Rep.* **5**, 1007–1012 (2004).
18. Akune, T. *et al.* PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J. Clin. Invest.* **113**, 846–855 (2004).
19. Imai, T. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4543–4547 (2004).
20. Ishibashi, S. *et al.* Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J. Clin. Invest.* **92**, 883–893 (1993).
21. Subramanian, V., Golledge, J., Ijaz, T., Bruemmer, D. & Daugherty, A. Pioglitazone-induced reductions in atherosclerosis occur via smooth muscle cell-specific interaction with PPAR γ . *Circ. Res.* **107**, 953–958 (2010).
22. Shao, J. S., Cai, J. & Towler, D. A. Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1423–1430 (2006).
23. Bostrom, K. *et al.* Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* **91**, 1800–1809 (1993).
24. Tyson, K. L. *et al.* Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 489–494 (2003).
25. Church, V., Nohno, T., Linker, C., Marcelle, C. & Francis-West, P. Wnt regulation of chondrocyte differentiation. *J. Cell Sci.* **115**, 4809–4818 (2002).
26. Morello, R. *et al.* Brachy-syndactyly caused by loss of Sfrp2 function. *J. Cell Physiol.* **217**, 127–137 (2008).
27. Keen, H. L. *et al.* Bioinformatic analysis of gene sets regulated by ligand-activated and dominant-negative peroxisome proliferator-activated receptor gamma in mouse aorta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 518–525 (2010).
28. Lemay, D. G. & Hwang, D. H. Genome-wide identification of peroxisome proliferator response elements using integrated computational genomics. *J. Lipid Res.* **47**, 1583–1587 (2006).
29. Zhou, L., Choi, H. Y., Li, W. P., Xu, F. & Herz, J. LRP1 controls cPLA2 phosphorylation, ABCA1 expression and cellular cholesterol export. *PLoS One* **4**, e6853 (2009).
30. Abedin, M. *et al.* N-3 fatty acids inhibit vascular calcification via the p38-mitogen-activated protein kinase and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathways. *Circ. Res.* **98**, 727–729 (2006).
31. Lencel, P. *et al.* Cell-specific effects of TNF-alpha and IL-1beta on alkaline phosphatase: implication for syndesphophyte formation and vascular calcification. *Lab Invest.* **91**, 1434–1442 (2011).
32. Alfaro, M. P. *et al.* SFRP2 suppression of BMP and WNT signaling mediates mesenchymal stem cell (MSC) self-renewal promoting engraftment and myocardial repair. *J. Biol. Chem.* **285**, 35645–53 (2010).
33. Yang, Y., Topol, L., Lee, H. & Wu, J. Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* **130**, 1003–1015 (2003).
34. Daumer, K. M., Tufan, A. C. & Tuan, R. S. Long-term *in vitro* analysis of limb cartilage development: involvement of Wnt signaling. *J. Cell. Biochem.* **93**, 526–541 (2004).
35. Rosen, E. D. *et al.* PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell.* **4**, 611–617 (1999).
36. Wan, Y. PPAR γ in bone homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**, 722–8 (2010).
37. Wan, Y., Chong, L. W. & Evans, R. M. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice. *Nat. Med.* **13**, 1496–1503 (2007).
38. Naik, V. *et al.* Sources of cells that contribute to atherosclerotic intimal calcification: an *in vivo* genetic fate mapping study. *Cardiovasc. Res.* **94**, 545–554 (2012).
39. Iyemere, V. P., Proudfoot, D., Weissberg, P. L. & Shanahan, C. M. Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *J. Intern. Med.* **260**, 192–210 (2006).
40. Speer, M. Y. *et al.* Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circ. Res.* **104**, 733–741 (2009).

41. Shanahan, C. M. *et al.* Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* **100**, 2168–2176 (1999).
42. Steitz, S. A. *et al.* Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circ. Res.* **89**, 1147–1154 (2001).
43. Shanahan, C. M., Weissberg, P. L. & Metcalfe, J. C. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **73**, 193–204 (1993).
44. Willert, K. *et al.* Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448–452 (2003).
45. Pan, Q. *et al.* Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter. *J. Cell. Physiol.* **217**, 228–241 (2008).
46. Compe, E. *et al.* Dysregulation of the peroxisome proliferator-activated receptor target genes by XPD mutations. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6065–6076 (2005).

Acknowledgements

We are grateful to J.M. Egly, N. Lemay, M. Mark and N. Ghyselinck (IGBMC, University of Strasbourg) for helpful comments and critical reading of the manuscript, F. Charlotte (Pitié-Salpêtrière, Paris) for providing us with human artery samples, A. Boos and P. Ronot (University of Strasbourg) for calcium quantifications in aortic samples, P. Lacolley and A. Pizard from INSERM U961, University of Nancy, France for cross-sectional distensibility measurements. E.W. is supported by la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). This work was supported by grants from centre national pour la recherche scientifique (CNRS), University of Strasbourg, Fondation de France, Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-PHYSIO-032-01 and ANR-09-BLAN-0121-01), the National Institutes of Health, the American Health Assistance Foundation,

the Perot Family Foundation, the Consortium for Frontotemporal Dementia Research (CFR) and the Wolfgang-Paul Program of the Humboldt Foundation.

Author contributions

E.W. and J.T. contributed equally to this work. E.W., J.T., M.M., R.L.M., V.B., F.C., D.T. and Z.E.A. performed ChIP-assays, immunofluorescence, immunoblot experiments and *in situ* experiments. E.W., J.T., M.M., R.L.M., V.B., D.T. and C.S. characterized the smPPAR γ , smLRP1, and smPPAR γ /smLRP1 mice. M.E.C. and E.N. investigated immunohistochemical stainings of human samples. S.F. and A.B. performed qRT-PCR experiments. C.B., E.W., C.S., A.V.D. and J.T. generated recombinant proteins. W.W., P.C. and D.M. generated the smPPAR γ mice. F.C. and R.L.M. performed *in vitro* experiments in VSMCs, MEFs and skin fibroblasts. J.T. performed treatments of mice with rosiglitazone. V.B., J.T., R.L.M. and E.W. performed all statistical analysis. All authors analysed and discussed the data. P.B. coordinated the project. J.H., P.C., D.M., and P.B. supervised the project and wrote the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Woldt, E. *et al.* The nuclear hormone receptor PPAR γ counteracts vascular calcification by inhibiting Wnt5a signalling in vascular smooth muscle cells. *Nat. Commun.* **3**:1077 doi: 10.1038/ncomms2087 (2012).

SUPPLEMENTARY DATASET

TO

**PPAR α IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELL COUNTERACTS LRP1-INDUCED VASCULAR
CALCIFICATION BY INHIBITING A WNT5A SIGNALING PATHWAY**

**Estelle Woldt¹, Jérôme Terrand¹, Mohamed Mlih¹, Rachel L. Matz¹, Véronique
Bruban¹, Fanny Coudane¹, Sophie Foppolo¹, Zeina El Asmar¹, Maria Eugenia Chollet²,
Ewa Ninio², Audrey Bednarczyk³, Danièle Thiersé³, Christine Schaeffer³, Alain Van
Dorsselaer³, Christian Boudier¹, Walter Wahli⁴, Pierre Chambon⁵, Daniel Metzger⁵,
Joachim Herz⁶, Philippe Boucher¹**

Figure S1

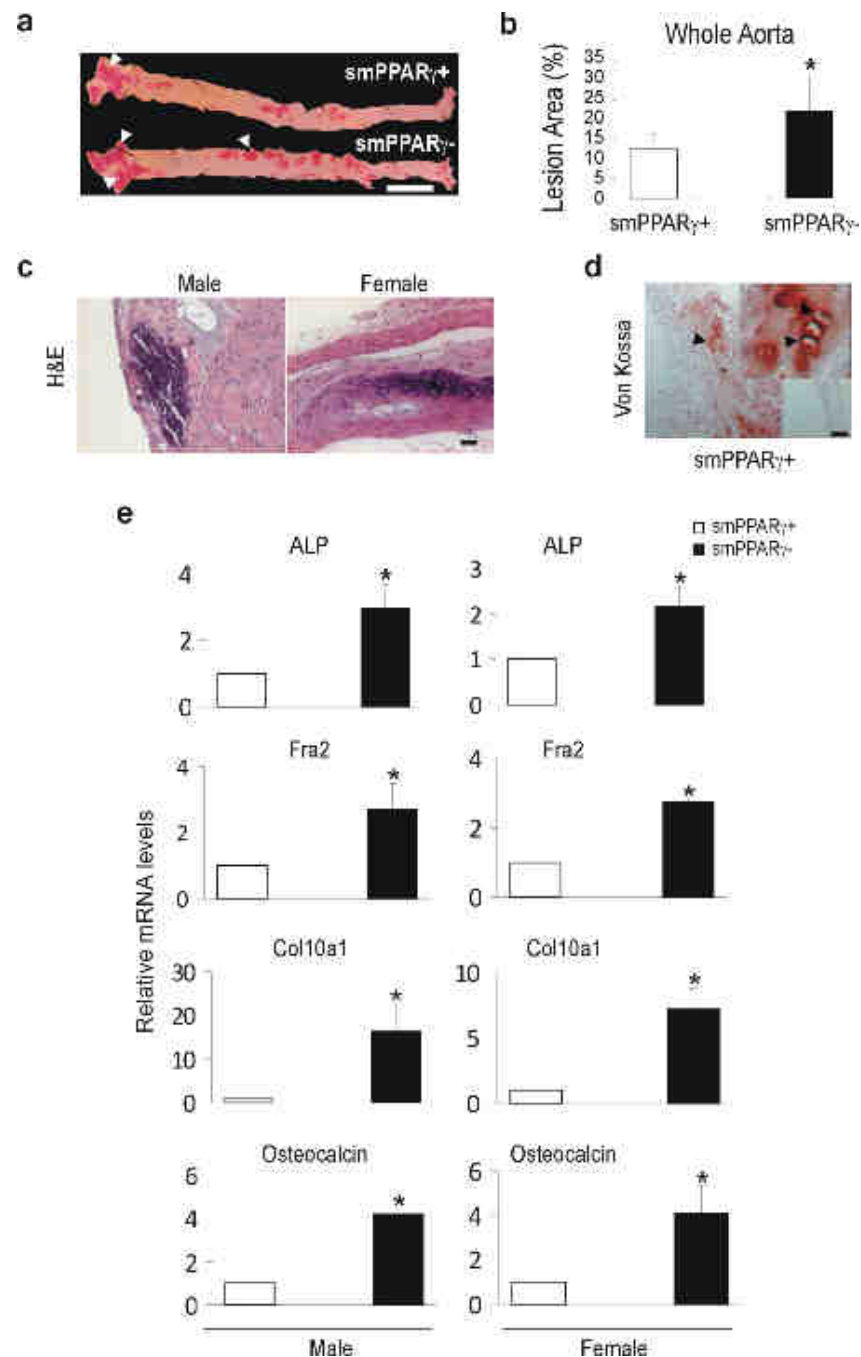


Figure S1: (a) Opened and Sudan IV-stained aortas from smPPAR^{-/-} female mice and controls (smPPAR^{+/+}). Arrowheads show lipid-laden (Sudan positive) atherosclerotic lesions. Scale bar, 0,5 cm. (b) Atherosclerotic lesion size in aortas from female smPPAR^{-/-} (n=4) and controls (n=5) mice. (c) Histological analysis of calcified atherosclerotic lesions in aortas from male and female smPPAR^{-/-} mice. (d) Von Kossa staining of chondrocyte-like cells in aortas from control mice (smPPAR^{+/+}). (e) RT-PCR analysis of the indicated genes in aortas from male (n=3) and female (n=3) smPPAR^{-/-} and control mice (n=6) fed an atherogenic diet.

Figure S2

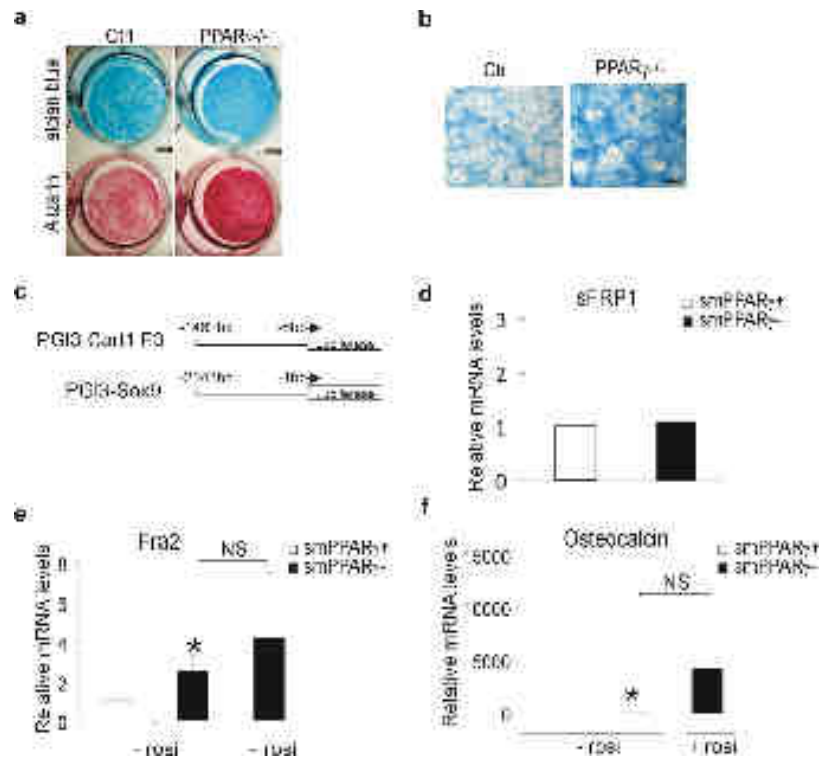


Figure S2: (a) Alizarin red and alcian blue staining of primary cultured PPAR γ ^{-/-} and controls skin fibroblast treated with a chondrogenic cocktail for 15 days. (b) Microscopical analysis of primary cultured vSMCs PPAR γ ^{-/-} and controls treated with a chondrogenic cocktail for 15 days and stained with alcian blue. (c) The *Sox9* (-2 kb) and the *Cart1* promoter is linked to a luciferase reporter. (d) sFRP1 mRNA levels in aortas from smPPAR γ ^{-/-} and control mice. (e) Fra2 and (f) Osteocalcin mRNA levels in aortas from smPPAR γ ^{-/-} and control mice fed an atherogenic diet and treated with rosiglitazone for 2months.

Figure S3

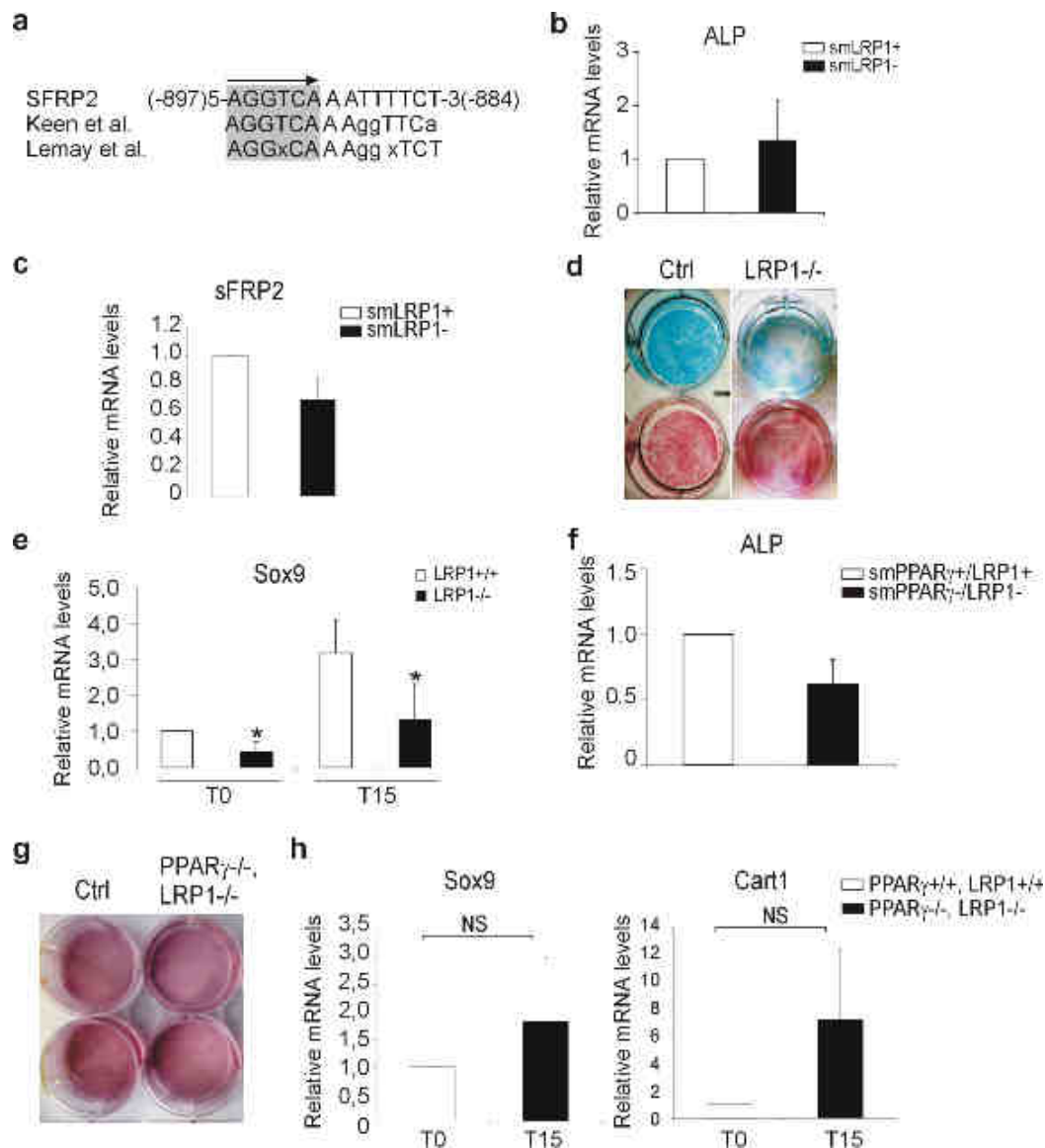


Figure S3: (a) Identification of PPREs in the sFRP2 promoter. (b) Alkaline phosphatase and (c) sFRP2 mRNA levels in aortas from smLRP1 $^{-/-}$ and control mice fed an atherogenic diet. (d) Alizarin red and alcian blue staining, and (e) Sox9 mRNA levels in primary cultured LRP1 $^{-/-}$ and control (LRP1 $^{+/+}$) skin fibroblast treated with a chondrogenic cocktail for 15 days. (f) Alkaline phosphatase mRNA levels in aortas from smLRP1 $^{-/-}$ /smPPAR γ $^{-/-}$ and control mice fed an atherogenic diet. (g) Alizarin red staining of cultured vSMCs isolated from aortas of smLRP1 $^{-/-}$ /smPPAR γ $^{-/-}$ and control mice, and treated with a chondrogenic cocktail for 15 days. (h) Sox9 and Cart1 mRNA levels in cultured vSMCs isolated from aortas of smLRP1 $^{-/-}$ /smPPAR γ $^{-/-}$ and control mice, and treated with a chondrogenic cocktail for 15 days.

Discussions et Perspectives

7. Discussions et Perspectives

Dans cette étude sur la calcification des plaques d'athérome nous avons identifié une interaction fonctionnelle entre LRP1 et PPAR gamma dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Nous avons montré que les souris déficientes en PPAR gamma spécifiquement dans les cellules musculaires lisses (SmPPAR-) sous régime athérogène développent plus de calcification vasculaire que les souris contrôles. Au sein de la plaque d'athérosclérose des souris SmPPAR, on retrouve les gènes impliqués dans le programme de différenciation chondrocytaire et ostocytaire tels que Sox9, Cart1, ALP et Ostéocalcine.

Nous avons montré que le niveau d'expression de sFRP2, un des inhibiteurs de la voie des Wnts, est fortement réduit dans les aortes des souris SmPPAR-. Cette levée d'inhibition entraîne l'activation de la voie de signalisation de Wnt5a qui entraîne la calcification vasculaire. Nous avons également montré que PPARgamma pouvait se fixer directement sur le promoteur du gène sFRP2 et induire son expression. Des études récentes ont montré que sFRP2 est capable d'inhiber la différenciation chondrocytaire et ostéocytaire des cellules souches mésenchymateuses (Alfaro et al., 2010). Nous avons montré que sFRP2 inhibe la chondrogenèse dans les cellules musculaires lisses vasculaires déficientes en PPAR gamma. De plus l'expression des marqueurs de la chondrogenèse diminue dans les cellules musculaires lisses vasculaires soumises à un cocktail de différenciation chondrocytaire traitées avec des agonistes PPARgamma comme la rosiglitazone ou avec du sFRP2 recombinant. De la même manière, sFRP2 inhibe la chondrogenèse dans les cellules musculaires lisses vasculaires déficientes en PPARgamma et chez les souris SmPPAR-. PPARgamma protège de la calcification vasculaire en induisant l'expression de sFRP2. sFRP2 a été identifié comme inhibiteur de la voie des Wnts en antagonisant Wnt1 et Wnt9a. Dans cette étude, nous avons montré que sFRP2 était capable également d'antagoniser Wnt5a. Nous avons également montré que Wnt5a pouvait induire l'expression de deux gènes essentiels à la différenciation chondrocytaire : Sox9 et Cart1.

Les souris qui n'expriment plus LRP1 ou LRP1 et PPARgamma soumises à un régime athérogène ne développent pas de calcification au niveau de la plaque d'athérome. Ces résultats suggèrent que LRP1 est nécessaire à la calcification des plaques d'athérome et que

PPARgamma joue un rôle protecteur en empêchant la voie de signalisation pro-chondrogénique LRP1/Wnt5a.

La transdifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires a déjà été observée (Iyemere et al., 2006). De plus, les cellules musculaires lisses vasculaires sont capables de se différencier en chondrocytes et jouent un rôle dans l'initiation et la progression des calcifications vasculaires (Shanahan et al., 1999; Speer et al., 2009). Ce changement de phénotype s'accompagne d'une perte des marqueurs spécifiques de cellules musculaires lisses comme MHC (Myosine heavy chain) et Sm-actin (Steitz et al., 2001). Nous avons montré que dans les aortes des souris SmPPAR- les cellules musculaires lisses vasculaires perdent l'expression de certains marqueurs comme MHC et Sm-actin ce qui indique que les cellules perdent leur phénotype contractile ce qui pourrait faciliter leur différenciation en cellules osteo-chondrocytaires. Les cellules de type osteo-chondrocytaire pourrait également avoir une origine monocyte-macrophagique étant donné que les souris SmPPAR- perdent l'expression de certains marqueurs des monocyte-macrophages au niveau de la plaque d'athérome tels que Mac-2 et CD68.

Nous avons montré que LRP1 et PPARgamma sont des facteurs déterminant dans la différenciation chondrocytaire dans la paroi vasculaire et dans la calcification des plaques d'athérome. En activant la voie canonique de Wnt5a, LRP1 joue un rôle pro-chondrogénique alors que PPAR gamma par l'intermédiaire de sFRP2 inhibe cette voie de signalisation pour empêcher la calcification vasculaire. Ce travail a permis de mettre en évidence une nouvelle voie de signalisation qui pourrait avoir un impact clinique majeur. En effet, les agonistes sélectifs de PPAR γ comme les thiazolidinediones pourraient être utiles dans la prévention et ou le traitement des calcifications vasculaires.

Bibliographie

8. Bibliographie

Akune, T., Ohba, S., Kamekura, S., Yamaguchi, M., Chung, U.I., Kubota, N., Terauchi, Y., Harada, Y., Azuma, Y., Nakamura, K., *et al.* (2004). PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *The Journal of clinical investigation* 113, 846-855.

Alfaro, M.P., Vincent, A., Saraswati, S., Thorne, C.A., Hong, C.C., Lee, E., and Young, P.P. (2010). sFRP2 suppression of bone morphogenic protein (BMP) and Wnt signaling mediates mesenchymal stem cell (MSC) self-renewal promoting engraftment and myocardial repair. *The Journal of biological chemistry* 285, 35645-35653.

Aronheim, A., Engelberg, D., Li, N., al-Alawi, N., Schlessinger, J., and Karin, M. (1994). Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* 78, 949-961.

Babaev, V.R., Yancey, P.G., Ryzhov, S.V., Kon, V., Breyer, M.D., Magnuson, M.A., Fazio, S., and Linton, M.F. (2005). Conditional knockout of macrophage PPARgamma increases atherosclerosis in C57BL/6 and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25, 1647-1653.

Balse, E., Steele, D.F., Abriel, H., Coulombe, A., Fedida, D., and Hatem, S.N. (2012). Dynamic of ion channel expression at the plasma membrane of cardiomyocytes. *Physiological reviews* 92, 1317-1358.

Bers, D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415, 198-205.

Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W.P., Anderson, R.G., and Herz, J. (2003). LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* 300, 329-332.

Boucher, P., Li, W.P., Matz, R.L., Takayama, Y., Auwerx, J., Anderson, R.G., and Herz, J. (2007). LRP1 functions as an atheroprotective integrator of TGFbeta and PDGF signals in the vascular wall: implications for Marfan syndrome. *PloS one* 2, e448.

Chen, J., Kubalak, S.W., and Chien, K.R. (1998). Ventricular muscle-restricted targeting of the RXRalpha gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis. *Development* 125, 1943-1949.

Cheng, G., Litschenberg, W.H., Cole, G.J., Mikawa, T., Thompson, R.P., and Gourdie, R.G. (1999). Development of the cardiac conduction system involves recruitment within a multipotent cardiomyogenic lineage. *Development* 126, 5041-5049.

Chun, J.S., Oh, H., Yang, S., and Park, M. (2008). Wnt signaling in cartilage development and degeneration. *BMB reports* 41, 485-494.

Cock, T.A., Back, J., Elefteriou, F., Karsenty, G., Kastner, P., Chan, S., and Auwerx, J. (2004). Enhanced bone formation in lipodystrophic PPARgamma(hyp/hyp) mice relocates haematopoiesis to the spleen. *EMBO reports* 5, 1007-1012.

DeLise, A.M., Fischer, L., and Tuan, R.S. (2000). Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 8, 309-334.

Donath, M.Y., Sutsch, G., Yan, X.W., Piva, B., Brunner, H.P., Glatz, Y., Zapf, J., Follath, F., Froesch, E.R., and Kiowski, W. (1998). Acute cardiovascular effects of insulin-like growth factor I in patients with chronic heart failure. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83, 3177-3183.

Gautel, M., Goulding, D., Bullard, B., Weber, K., and Furst, D.O. (1996). The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *Journal of cell science* 109 (Pt 11), 2747-2754.

Goldstein, M.A., and Entman, M.L. (1979). Microtubules in mammalian heart muscle. *The Journal of cell biology* 80, 183-195.

Gordon, A.M., Homsher, E., and Regnier, M. (2000). Regulation of contraction in striated muscle. *Physiological reviews* 80, 853-924.

Graiani, G., Lagrasta, C., Migliaccio, E., Spillmann, F., Meloni, M., Madeddu, P., Quaini, F., Padura, I.M., Lanfranccone, L., Pelicci, P., *et al.* (2005). Genetic deletion of the p66Shc adaptor protein protects from angiotensin II-induced myocardial damage. *Hypertension* 46, 433-440.

Hamblin, M., Chang, L., Zhang, H., Yang, K., Zhang, J., and Chen, Y.E. (2011). Vascular smooth muscle cell peroxisome proliferator-activated receptor-gamma mediates pioglitazone-reduced vascular lesion formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31, 352-359.

Hardy, W.R., Li, L., Wang, Z., Sedy, J., Fawcett, J., Frank, E., Kucera, J., and Pawson, T. (2007). Combinatorial ShcA docking interactions support diversity in tissue morphogenesis. *Science* 317, 251-256.

Harvey, P.A., and Leinwand, L.A. (2011). The cell biology of disease: cellular mechanisms of cardiomyopathy. *The Journal of cell biology* 194, 355-365.

Hawley, S.P., Wills, M.K., Rabalski, A.J., Bendall, A.J., and Jones, N. (2011). Expression patterns of ShcD and Shc family adaptor proteins during mouse embryonic development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 240, 221-231.

Holtwick, R., Gotthardt, M., Skryabin, B., Steinmetz, M., Potthast, R., Zetsche, B., Hammer, R.E., Herz, J., and Kuhn, M. (2002). Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7142-7147.

Houser, S.R., Margulies, K.B., Murphy, A.M., Spinale, F.G., Francis, G.S., Prabhu, S.D., Rockman, H.A., Kass, D.A., Molkentin, J.D., Sussman, M.A., *et al.* (2012). Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research* 111, 131-150.

Hunter, J.J., and Chien, K.R. (1999). Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *The New England journal of medicine* 341, 1276-1283.

Ibrahim, M., Gorelik, J., Yacoub, M.H., and Terracciano, C.M. (2011). The structure and function of cardiac t-tubules in health and disease. *Proceedings Biological sciences / The Royal Society* 278, 2714-2723.

Iyemere, V.P., Proudfoot, D., Weissberg, P.L., and Shanahan, C.M. (2006). Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity and the regulation of vascular calcification. *Journal of internal medicine* 260, 192-210.

Jakobsen, C.J., Torp, P., and Sloth, E. (2006). Assessment of left ventricular ejection fraction may invalidate the reliability of EuroSCORE. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 29, 978-982.

Johnson, R.C., Leopold, J.A., and Loscalzo, J. (2006). Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circulation research* 99, 1044-1059.

Kawano, Y., and Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of cell science* 116, 2627-2634.

Kruger, M., and Linke, W.A. (2009). Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology* 46, 490-498.

Lai, K.M., and Pawson, T. (2000). The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo. *Genes & development* 14, 1132-1145.

Langlois, D., Hneino, M., Bouazza, L., Parlakian, A., Sasaki, T., Bricca, G., and Li, J.Y. (2010). Conditional inactivation of TGF-beta type II receptor in smooth muscle cells and epicardium causes lethal aortic and cardiac defects. *Transgenic research* 19, 1069-1082.

Li, L., Miano, J.M., Cserjesi, P., and Olson, E.N. (1996). SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circulation research* 78, 188-195.

Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.

Lillis, A.P., Van Duyn, L.B., Murphy-Ullrich, J.E., and Strickland, D.K. (2008). LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiological reviews* 88, 887-918.

Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 781-810.

Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.

Malhowski, A.J., Hira, H., Bashiruddin, S., Warburton, R., Goto, J., Robert, B., Kwiatkowski, D.J., and Finlay, G.A. (2011). Smooth muscle protein-22-mediated deletion of Tsc1 results in cardiac hypertrophy that is mTORC1-mediated and reversed by rapamycin. *Human molecular genetics* 20, 1290-1305.

McGlade, J., Cheng, A., Pelicci, G., Pelicci, P.G., and Pawson, T. (1992). Shc proteins are phosphorylated and regulated by the v-Src and v-Fps protein-tyrosine kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 8869-8873.

Michalak, M., and Opas, M. (2009). Endoplasmic and sarcoplasmic reticulum in the heart. *Trends in cell biology* 19, 253-259.

Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P.P., Lanfranccone, L., and Pelicci, P.G. (1999). The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature* 402, 309-313.

Migliaccio, E., Mele, S., Salcini, A.E., Pelicci, G., Lai, K.M., Superti-Furga, G., Pawson, T., Di Fiore, P.P., Lanfranccone, L., and Pelicci, P.G. (1997). Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *The EMBO journal* 16, 706-716.

Miquerol, L., Beyer, S., and Kelly, R.G. (2011). Establishment of the mouse ventricular conduction system. *Cardiovascular research* 91, 232-242.

Mudd, J.O., and Kass, D.A. (2008). Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 451, 919-928.

Napoli, C., Martin-Padura, I., de Nigris, F., Giorgio, M., Mansueto, G., Somma, P., Condorelli, M., Sica, G., De Rosa, G., and Pelicci, P. (2003). Deletion of the p66Shc longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2112-2116.

Okada, S., Kao, A.W., Ceresa, B.P., Blaikie, P., Margolis, B., and Pessin, J.E. (1997). The 66-kDa Shc isoform is a negative regulator of the epidermal growth factor-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of biological chemistry* 272, 28042-28049.

Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Warburton, C., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Dalton, D., Gillett, N., and Stewart, T.A. (1993). IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes & development* 7, 2609-2617.

Qu, A., Shah, Y.M., Manna, S.K., and Gonzalez, F.J. (2012). Disruption of endothelial peroxisome proliferator-activated receptor gamma accelerates diet-induced atherogenesis in LDL receptor-null mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32, 65-73.

Radke, M.H., Peng, J., Wu, Y., McNabb, M., Nelson, O.L., Granzier, H., and Gotthardt, M. (2007). Targeted deletion of titin N2B region leads to diastolic dysfunction and cardiac atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 3444-3449.

Ravichandran, K.S. (2001). Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* 20, 6322-6330.

Reiss, K., Cheng, W., Ferber, A., Kajstura, J., Li, P., Li, B., Olivetti, G., Homcy, C.J., Baserga, R., and Anversa, P. (1996). Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 8630-8635.

Rosca, M.G., and Hoppel, C.L. (2010). Mitochondria in heart failure. *Cardiovascular research* 88, 40-50.

Rota, M., LeCapitaine, N., Hosoda, T., Boni, A., De Angelis, A., Padin-Iruegas, M.E., Esposito, G., Vitale, S., Urbanek, K., Casarsa, C., *et al.* (2006). Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66shc gene. *Circulation research* 99, 42-52.

Sakai, R., Henderson, J.T., O'Bryan, J.P., Elia, A.J., Saxton, T.M., and Pawson, T. (2000). The mammalian ShcB and ShcC phosphotyrosine docking proteins function in the maturation of sensory and sympathetic neurons. *Neuron* 28, 819-833.

Sanford, J.L., Edwards, J.D., Mays, T.A., Gong, B., Merriam, A.P., and Rafael-Fortney, J.A. (2005). Claudin-5 localizes to the lateral membranes of cardiomyocytes and is altered in utrophin/dystrophin-deficient cardiomyopathic mice. *Journal of molecular and cellular cardiology* 38, 323-332.

Savolainen, S.M., Foley, J.F., and Elmore, S.A. (2009). Histology atlas of the developing mouse heart with emphasis on E11.5 to E18.5. *Toxicologic pathology* 37, 395-414.

Schlaepfer, D.D., Hauck, C.R., and Sieg, D.J. (1999). Signaling through focal adhesion kinase. *Progress in biophysics and molecular biology* 71, 435-478.

Schoenenberger, C.A., Mannherz, H.G., and Jockusch, B.M. (2011). Actin: from structural plasticity to functional diversity. *European journal of cell biology* 90, 797-804.

Sebestyen, M.G., Wolff, J.A., and Greaser, M.L. (1995). Characterization of a 5.4 kb cDNA fragment from the Z-line region of rabbit cardiac titin reveals phosphorylation sites for proline-directed kinases. *Journal of cell science* 108 (Pt 9), 3029-3037.

Shanahan, C.M., Cary, N.R., Salisbury, J.R., Proudfoot, D., Weissberg, P.L., and Edmonds, M.E. (1999). Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 100, 2168-2176.

Sotgia, F., Lee, H., Bedford, M.T., Petrucci, T., Sudol, M., and Lisanti, M.P. (2001). Tyrosine phosphorylation of beta-dystroglycan at its WW domain binding motif, PPxY, recruits SH2 domain containing proteins. *Biochemistry* 40, 14585-14592.

Speer, M.Y., Yang, H.Y., Brabb, T., Leaf, E., Look, A., Lin, W.L., Frutkin, A., Dichek, D., and Giachelli, C.M. (2009). Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circulation research* 104, 733-741.

Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 15, 1512-1531.

Steitz, S.A., Speer, M.Y., Curinga, G., Yang, H.Y., Haynes, P., Aebbersold, R., Schinke, T., Karsenty, G., and Giachelli, C.M. (2001). Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers. *Circulation research* 89, 1147-1154.

Stromer, M.H. (1998). The cytoskeleton in skeletal, cardiac and smooth muscle cells. *Histology and histopathology* 13, 283-291.

Terrand, J., Bruban, V., Zhou, L., Gong, W., El Asmar, Z., May, P., Zurhove, K., Haffner, P., Philippe, C., Woldt, E., *et al.* (2009). LRP1 controls intracellular cholesterol storage and fatty acid synthesis through modulation of Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry* 284, 381-388.

Tontonoz, P., and Spiegelman, B.M. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annual review of biochemistry* 77, 289-312.

Vanderlaan, R.D., Hardy, W.R., Kabir, M.G., Pasculescu, A., Jones, N., deTombe, P.P., Backx, P.H., and Pawson, T. (2011). The ShcA phosphotyrosine docking protein uses distinct mechanisms to regulate myocyte and global heart function. *Circulation research* 108, 184-193.

Vattikuti, R., and Towler, D.A. (2004). Osteogenic regulation of vascular calcification: an early perspective. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 286, E686-696.

Wahli, W., and Michalik, L. (2012). PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 23, 351-363.

Wary, K.K., Mainiero, F., Isakoff, S.J., Marcantonio, E.E., and Giancotti, F.G. (1996). The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 87, 733-743.

Wary, K.K., Mariotti, A., Zurzolo, C., and Giancotti, F.G. (1998). A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94, 625-634.

Watkins, H., Ashrafian, H., and Redwood, C. (2011). Inherited cardiomyopathies. *The New England journal of medicine* 364, 1643-1656.

Wills, M.K., and Jones, N. (2012). Teaching an old dogma new tricks: twenty years of Shc adaptor signalling. *The Biochemical journal* 447, 1-16.

Woldt, E., Matz, R.L., Terrand, J., Mlih, M., Gracia, C., Foppolo, S., Martin, S., Bruban, V., Ji, J., Velot, E., *et al.* (2011). Differential signaling by adaptor molecules LRP1 and ShcA

regulates adipogenesis by the insulin-like growth factor-1 receptor. *The Journal of biological chemistry* 286, 16775-16782.

Yang, M., Jiang, H., and Li, L. (2010). Sm22alpha transcription occurs at the early onset of the cardiovascular system and the intron 1 is dispensable for its transcription in smooth muscle cells during mouse development. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology* 2, 12-19.

Zhang, R., Yang, J., Zhu, J., and Xu, X. (2009). Depletion of zebrafish Tcap leads to muscular dystrophy via disrupting sarcomere-membrane interaction, not sarcomere assembly. *Human molecular genetics* 18, 4130-4140.

Zhao, G.Q., Zhou, X., Eberspaecher, H., Solursh, M., and de Crombrughe, B. (1993). Cartilage homeoprotein 1, a homeoprotein selectively expressed in chondrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 8633-8637.

Annexes

Annexes 1 :

LRP1 et ShcA dans la régulation de la voie de la différenciation adipocytaire par l'IGF-1 récepteur :

Woldt, E., Matz, R.L., Terrand, J., **Mlih, M.**, Gracia, C., Foppolo, S., Martin, S., Bruban, V., Ji, J., Velot, E., *et al.* (2011). Differential signaling by adaptor molecules LRP1 and ShcA regulates adipogenesis by the insulin-like growth factor-1 receptor. The Journal of biological chemistry 286, 16775-16782.

Differential Signaling by Adaptor Molecules LRP1 and ShcA Regulates Adipogenesis by the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor*

Received for publication, December 16, 2010, and in revised form, March 21, 2011. Published, JBC Papers in Press, March 22, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.212878

Estelle Woldt^{‡1}, Rachel L. Matz^{‡1,2}, Jérôme Terrand[‡], Mohamed Mlih[‡], Céline Gracia[‡], Sophie Foppolo[‡], Sophie Martin[‡], Véronique Bruban[‡], Julie Ji[‡], Emilie Velot[‡], Joachim Herz^{§3}, and Philippe Boucher^{‡4}

From the [‡]CNRS, UMR7213, University of Strasbourg, Illkirch, F-67401 France and the [§]Department of Molecular Genetics, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, Texas 75390-9046

The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP1) is a transmembrane receptor that integrates multiple signaling pathways. Its cytoplasmic domain serves as docking sites for several adaptor proteins such as the Src homology 2/ α -collagen (ShcA), which also binds to several tyrosine kinase receptors such as the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor. However, the physiological significance of the physical interaction between LRP1 and ShcA, and whether this interaction modifies tyrosine kinase receptor signaling, are still unknown. Here we report that LRP1 forms a complex with the IGF-1 receptor, and that LRP1 is required for ShcA to become sensitive to IGF-1 stimulation. Upon IGF-1 treatment, ShcA is tyrosine phosphorylated and translocates to the plasma membrane only in the presence of LRP1. This leads to the recruitment of the growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) to ShcA, and activation of the Ras/MAP kinase pathway. Conversely, in the absence of ShcA, IGF-1 signaling bifurcates toward the Akt/mammalian target of rapamycin pathway and accelerates adipocyte differentiation when cells are stimulated for adipogenesis. These results establish the LRP1-ShcA complex as an essential component in the IGF-1-regulated pathway for MAP kinase and Akt/mammalian target of rapamycin activation, and may help to understand the IGF-1 signaling shift from clonal expansion to growth-arrested cells and differentiation during adipogenesis.

The insulin-like growth factor 1 (IGF-1)⁵ biological actions are mediated by the IGF-1 receptor, a member of the tyrosine

kinase family of growth factor receptors, composed of two extracellular α -subunits and two membrane-spanning β -subunits, encoding an intracellular tyrosine kinase (1). Upon IGF-1 binding, the activated IGF-1 receptor is generally thought to proceed through phosphorylation of specific cytosolic substrates, such as the adaptor proteins Src homology 2/ α -collagen (Shc). The IGF-1 signal is then transmitted to two downstream pathways: ERK of the MAPK family and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), which potentially leads to two distinct events: cell proliferation or cell differentiation (1). How IGF-1 signaling bifurcates at some point from proliferation to differentiation is not known. IGF-1 is a critical regulator of adipose tissue mass through its regulation of adipogenesis (2). During adipogenesis, dividing preadipocytes shift to growth-arrested cells allowing full differentiation of adipocytes. IGF-1 mediates both proliferation and differentiation of preadipocytes *in vivo* (3) and *in vitro*, including 3T3-L1 cells (2) and primary cultures of mouse (4) and human cells (5). IGF-1 stimulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity is lost as preadipocytes differentiate, and this is paralleled by a loss in Shc tyrosine phosphorylation. Inhibition of Shc tyrosine phosphorylation inhibits DNA synthesis and increases expression of the master regulator of adipogenesis, the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and its target gene *aP2* (6, 7).

The Shc protein family of molecular adaptors is composed of four *Shc* gene products, the ubiquitous *ShcA*, and *ShcB*, *ShcC*, and *ShcD*, which are predominantly expressed in neuronal cells. *ShcA* knock-out mice are embryonic lethal. *ShcA* is expressed as three isoforms of 46, 52, and 66 kDa (8). These isoforms are composed of two distinct domains that bind phosphotyrosine-containing sequences, an amino-terminal phosphotyrosine binding domain and a carboxyl-terminal Src homology 2 (SH2) domain, and of a central collagen homology region that harbors tyrosine phosphorylation sites (8, 9). The 66-kDa isoform contains an additional amino-terminal domain (collagen homology region 2) including a serine phosphorylation site (10, 11). ShcA binds multiple membrane receptors. For instance, through its phosphotyrosine binding domain, ShcA binds to the phosphorylated IGF-1 receptor (12, 13), whereas the SH2 domain of ShcA allows ShcA binding to the PDGF receptor (14).

The tyrosine-phosphorylated low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) also associates with ShcA in a tyrosine phosphorylation-dependent manner through the ShcA

* This work was supported, in whole or in part, by grants from the National Institutes of Health (to J. H.), the Centre National Pour la Recherche Scientifique (CNRS), Nouvelle Société Française d'athérosclérose (NSFA), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Fondation de France, and Agence Nationale de la Recherche Grant ANR-06-Physio-032.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence may be addressed. E-mail: rachel.matz-westphal@unistra.fr.

³ Supported by grants from the American Health Assistance Foundation, the Humboldt Foundation, SFB780, and the Consortium for Frontotemporal Dementia.

⁴ To whom correspondence may be addressed: CNRS, UMR7213, University of Strasbourg, 74, route du Rhin Illkirch, F-67401 France. Tel.: 33-3-6885-4149; Fax: 33-3-6885-4313; E-mail: philippe.boucher@unistra.fr.

⁵ The abbreviations used are: IGF-1, insulin-like growth factor 1; SH2, Src homology domain 2; MEF, mouse embryonic fibroblast; mTOR, mammalian target of rapamycin; LRP1, lipoprotein receptor-related protein 1; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; Tricine, N-[2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl]glycine; ShcA, Src homology 2/ α -collagen.

phosphotyrosine binding domain (15). This phosphorylation occurs on a tyrosine residue located within the second NPXY motif in the cytoplasmic domain of LRP1 (16), which then provides a docking site for adaptor proteins such as ShcA. However, the physiological significance of this association is unknown. LRP1 is a member of the low density lipoprotein receptor gene family (17). It is implicated in the endocytosis of numerous ligands including lipoproteins, cytokines, and growth factors (18), and integrates multiple signaling pathways at the surface of the plasma membrane. LRP1 is required for cholesterol homeostasis in adipocytes and vascular smooth muscle cells through the canonical Wnt5a pathway (19) and integrates PDGF-BB (20) and TGF β signaling (21) in the arterial wall. It co-immunoprecipitates with the PDGF-BB receptor in vascular smooth muscle cells (16, 20, 22) and through this physical interaction protects against atherosclerosis by regulating PDGFR β activity. The present studies were undertaken to investigate the role of the ShcA-LRP1 complex in controlling the IGF-1-mediated molecular switch between proliferation and differentiation of fibroblasts, and its implication during adipogenesis.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Recombinant human IGF-1 and protein A-agarose beads were from Sigma. Anti-IGFR polyclonal antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Anti-ShcA, anti-Grb2, anti-Crk2, and anti-phosphotyrosine (4G10) antibodies were from Upstate Cell Signaling Solutions (Lake Placid, NY). Anti-phospho-p44/42 MAP kinase (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴), anti-p44/42, anti-phospho-AKT (Ser⁴⁷³), anti-AKT, anti-phospho-mammalian target of rapamycin (mTOR) (Ser²⁴⁴⁸), and anti-mTOR antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA).

Cell Culture and Treatments—LRP1-deficient MEF (MEF LRP1^{-/-} cells) and LRP1-expressing MEF (MEF LRP1^{+/+} cells) (19) were cultured in DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and antibiotics. Prior to stimulation cells were cultured for 18 h in DMEM containing 0.3% BSA and then stimulated with IGF-1 (20 nM) at 37 °C in 5% CO₂. Src/Yes/Fyn-deficient (SYF^{-/-}) and control (SYF^{+/+}) fibroblasts were kindly provided by Dr. Richard W. Anderson. ShcA-deficient mouse embryonic fibroblasts were isolated from ShcA^{lox/lox} mice generated by homologous recombination. These cells were cultured in 10% New-Born Calf Serum DMEM and infected with adenovirus expressing Cre recombinase as described previously (19). Whole cell lysates were prepared and analyzed by immunoblot as described previously (19). For siRNA transfection, cells were transfected with control or ShcA siRNA for 24 h in DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were then cultured for 18 h in DMEM with 0.3% BSA and treated with 20 nM IGF-1 for the indicated times.

Adipocyte differentiation was induced using the adipogenic mixture containing IGF-1 (7 nM) or insulin (10 μ g/ml), dexamethasone, isobutylmethylxanthine, and the PPAR γ agonist rosiglitazone. Oil Red O staining was performed as described (19).

Cell Fractionation—For cell fractionation (23), cells were washed twice with chilled PBS then scraped in PBS and centri-

fuged at 1,000 $\times$ g for 5 min at 4 °C. Cell pellets were resuspended in buffer A (0.5 M sucrose, 2 mM EDTA, 40 mM Tricine, pH 7.8, 50 mM NaF, 2 mM Na₂VO₄, 25 mM β -glycerophosphate) supplemented with protease and phosphatase inhibitors, and Dounce homogenized 20 times on ice. For crude membrane preparation, lysates were centrifuged at 1,000 $\times$ g for 10 min at 4 °C and the supernatants were centrifuged at 29,000 $\times$ g for 30 min at 4 °C to separate membranes from cytosol. For plasma membrane preparation, lysates were centrifuged at 1,000 $\times$ g for 10 min at 4 °C, the supernatants were loaded on a 30% Percoll gradient (Sigma) and centrifuged at 29,000 $\times$ g for 30 min at 4 °C to separate plasma membrane from cytosol. Plasma membranes were then sonicated on ice and plasma membrane and cytosol were analyzed by immunoblot.

Immunoprecipitation—Cells were washed with ice-cold PBS and lysed for 20 min on ice in lysis buffer supplemented with protease and phosphatase inhibitors as described (24). Lysates were precleared then incubated overnight at 4 °C with the indicated antibody and protein A-Sepharose CL-4B beads (500 μ g of protein, 5 μ g of IgG, 50 μ l of beads). Immunoprecipitates were washed twice with lysis buffer and lysis buffer containing 2 M NaCl, and twice in 10 mM Tris, pH 8, 50 mM NaCl. Proteins were eluted from beads with SDS sample buffer, separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membrane, and blotted with the indicated antibody.

Ras Activation Assay—Ras activity was assessed with an Ras activation assay kit from Cell Biolabs. After 20 nM IGF-1 stimulation cells were washed twice with ice-cold PBS and then lysed in 700 μ l of assay/lysis buffer containing protease inhibitors (10 μ g/ml of aprotinin, 10 μ g/ml of leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). After centrifugation at 14,000 $\times$ g for 10 min at 4 °C, cell lysates were incubated at 4 °C for 1 h with 40 μ l of the Raf1 Ras binding domain-agarose bead. Lysates were then washed with assay/lysis buffer containing protease inhibitors, and the presence of activated Ras (Ras-GTP) was determined by Western blotting with anti-RAS monoclonal antibody.

Real Time PCR Analysis—RNA was isolated using TRIzol reagent (Sigma) according to the manufacturer's instructions and analyzed for the indicated gene as described previously (19).

Statistical Analysis—Results are from three to four separate experiments. Student's *t* test was used to compare the differences between control and treatment groups. *p* < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

LRP1 Co-immunoprecipitates with the IGF-1 Receptor—To analyze the potential role of LRP1 in controlling the IGF-1 signaling pathway, we first tested whether LRP1 and the IGF-1 receptor are present in the same microcompartment of cellular membrane domains. Fig. 1A shows that, in the cultured bovine vascular smooth muscle cell line CRL 20-18, in which LRP1 is known to co-immunoprecipitate with PDGFR β (20, 22), LRP1 and the IGF-1 receptor are present in the same complex. Formation of this complex is increased when cells are treated with 20 nM IGF-1 for 10 min (Fig. 1A). Caveolae/rafts are cholesterol-rich membrane microdomains that compartmentalize a

variety of signaling molecules, including the IGF-1 receptor (25) and LRP1 (22). Caveolae are enriched in caveolin 1 oligomers, the major protein constituent of the structure, which is a distinct characteristic from lipid rafts that lack caveolin (26). Because caveolin 1 was not present within the complex, the data suggest that LRP1 and the IGF-1 receptor interact directly and that their biochemical association was not merely due to immunoprecipitation of the entire caveolae fraction (Fig. 1A). The formation of this complex is not limited to vascular smooth

muscle cells because co-immunoprecipitation between LRP1 and the IGF-1 receptor was also observed in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Fig. 1B).

IGF-1-dependent Recruitment of ShcA to the Plasma Membrane in the Presence of LRP1—Because ShcA binds to both the IGF-1 receptor and LRP1, we tested whether the recruitment of adaptor protein ShcA to the plasma membrane upon IGF-1 stimulation is affected in the absence of LRP1. Immunoblot analysis of purified plasma membrane from LRP1^{+/+} MEFs showed that expression of ShcA isoforms is almost undetectable in unstimulated cells, and increased upon stimulation with 20 nM IGF-I to reach a maximum expression after 30 min of treatment (Fig. 2A). This increase of ShcA protein expression levels at the plasma membrane was paralleled by a decrease of its expression in the cytosol (Fig. 2A). Conversely, in the absence of LRP1, translocation of ShcA to the plasma membrane failed to respond to IGF-1 stimulation (Fig. 2A). The three isoforms of ShcA exhibited high plasma membrane protein levels in untreated, as well as in IGF-1-treated cells (Fig. 2A). Increased ShcA protein levels were also observed in the crude membrane preparation of LRP1^{+/+} MEFs stimulated with 100 nM insulin, which is known to partly signal through the IGF-1 receptor (Fig. 2B). These data show that the recruitment of ShcA at the plasma membrane is sensitive to IGF-1 stimulation only in the presence of LRP1.

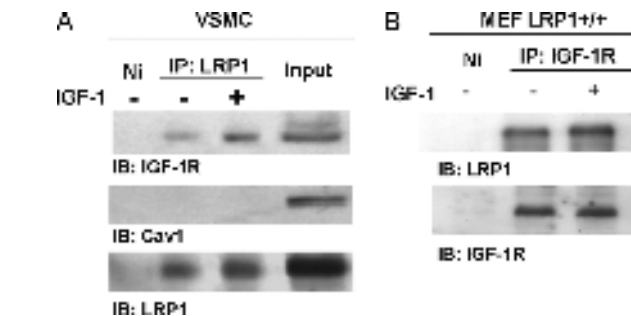


FIGURE 1. LRP1 co-immunoprecipitates with the IGF-1 receptor. A, purified plasma membrane fractions from starved vascular smooth muscle cells (VSMC) treated with 20 nM IGF-1 for 10 min were immunoprecipitated (IP) with an anti-LRP1 and immunoblotted (IB) with an antibody directed against the IGF-1 receptor. Western blot analysis of caveolin 1 (Cav1) ensures the specificity of the immune complex. B, whole cell lysates from starved LRP1^{+/+} MEFs treated with 20 nM IGF-1 for 10 min were immunoprecipitated with an anti-IGF-1 receptor antibody and immunoblotted with an anti-LRP1 antibody. Ni, non-immune control.

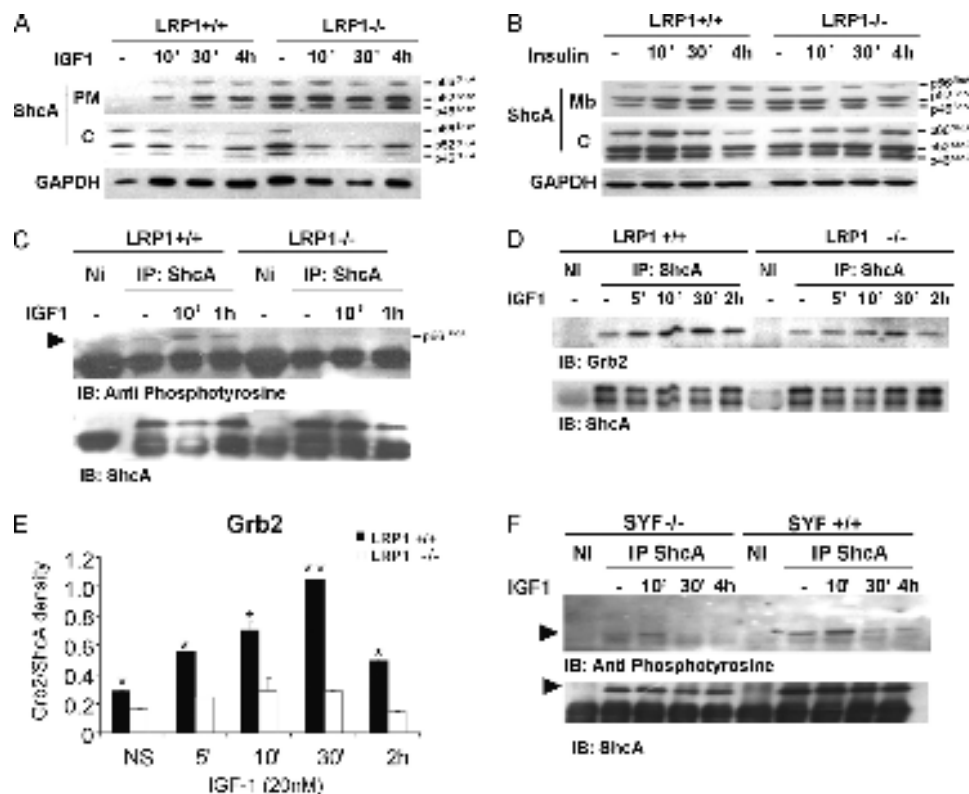


FIGURE 2. The recruitment and activation of ShcA at the plasma membrane are sensitive to IGF-1 treatment only in the presence of LRP1. A, Western blot analysis of ShcA in purified plasma membrane (PM), crude membrane preparation (Mb), and cytosol (C) from LRP1^{-/-} and LRP1^{+/+} MEFs treated with 20 nM IGF-1 or (B) treated with 100 nM insulin for the indicated times. C, whole cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-ShcA and immunoblotted (IB) with antibody 4G10 directed against phosphotyrosine or (D) with anti-Grb2 antibodies. E, quantification of the coimmunoprecipitation between ShcA and Grb2 by densitometry. F, immunoprecipitation of ShcA upon IGF-1 treatment in Src/Yes/Fyn deficient (SYF^{-/-}) and control (SYF^{+/+}) fibroblasts, and immunoblot with antibody 4G10 directed against phosphotyrosine. Results are expressed as mean $\pm$ S.E. *, $p < 0.05$, and **, $p < 0.01$ compared with controls. Ni, non-immune.

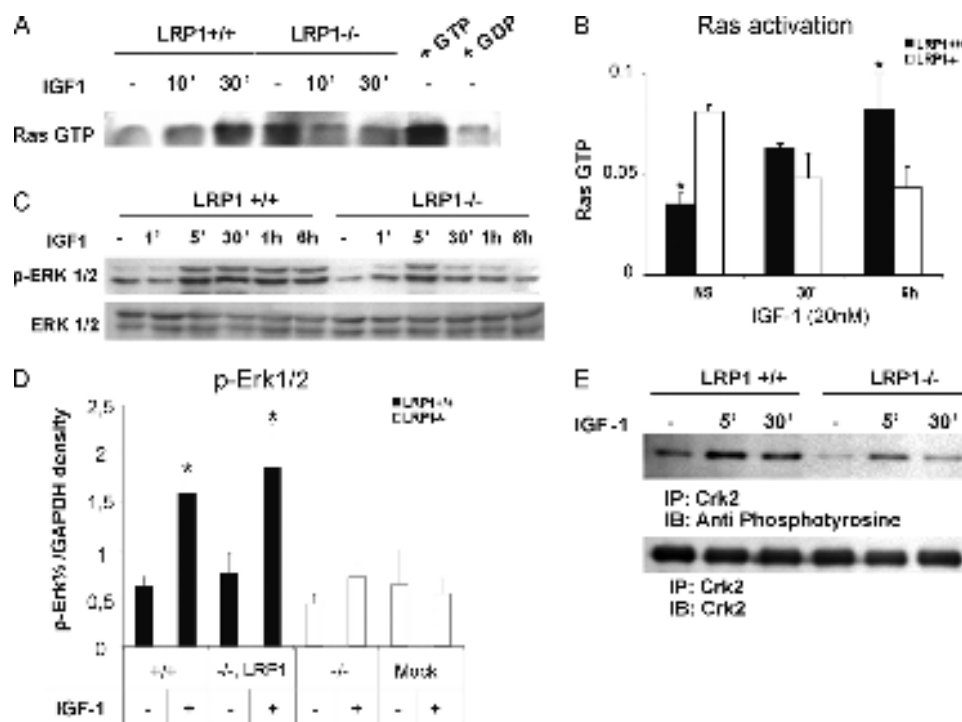


FIGURE 3. LRP1 is required for the IGF-1-induced MAPK cascade activation. LRP1^{-/-} and LRP1^{+/+} cells were treated with or without 20 nM of IGF-1 for the indicated times. *A*, whole cell lysates were incubated with agarose conjugated with the Ras-binding domain of Raf1, then the bound activated Ras (Ras-GTP) was analyzed by Western blotting with anti-Ras antibodies. *B*, quantification of the blots. *C*, Western blot analysis of phospho and total ERK1/2 in LRP1^{-/-}, LRP1^{+/+}, LRP1^{-/-} retransfected with LRP1 (–/–, LRP1), and mock retransfected (Mock) LRP1^{-/-} MEFs treated with or without 20 nM IGF-1 for 10 min. Results are expressed as mean ± S.E. *, *p* < 0.05. *E*, Western blot analysis of phospho and total Crk2. Whole cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-Crk2 and immunoblotted (IB) with antibody 4G10 directed against phosphotyrosine (top panel) or with anti-Crk2 antibodies (bottom panel).

We next analyzed whether LRP1 is required for the IGF-1-induced tyrosine phosphorylation of ShcA by immunoprecipitation. Fig. 2C shows that IGF-1 treatment induced tyrosine phosphorylation of the p66^{ShcA} isoform in LRP1^{+/+}, but not in LRP1^{-/-} MEFs (Fig. 2C). Because tyrosine phosphorylation of ShcA is strongly decreased in Src/Yes/Fyn-deficient cells (Fig. 2F), one or all of these kinases are involved in ShcA phosphorylation. This tyrosine phosphorylation of the p66^{ShcA} isoform was accompanied by a marked IGF-1-induced recruitment of Grb2 to ShcA in LRP1^{+/+}, but not in LRP1^{-/-} MEFs with maximum levels after 30 min of treatment (Fig. 2, D and E). Taken together, these data show that LRP1 is an important component of the IGF-1 signaling pathway, and suggest that LRP1 is required for the IGF-1-induced ShcA activation. It is required for tyrosine phosphorylation of the plasma membrane p66^{ShcA} isoform, and subsequent binding of Grb2 to ShcA.

LRP1 Is Required for the IGF-1-induced Ras and ERK1/2 Activation—The recruitment of Grb2 to ShcA is known to activate the guanine nucleotide exchange factor Sos, which triggers the Ras/Raf/ERK signaling cascade (27, 28). To determine the consequence of the absence of LRP1 on the Ras/MAPK pathway, we measured Ras-GTP levels by Western blotting in LRP1^{+/+} and LRP1^{-/-} MEFs upon IGF-1 stimulation. Whereas Ras activation in LRP1^{+/+} MEFs increased rapidly after the addition of 20 nM IGF-1 (Fig. 3, A and B), this activation is maximal in unstimulated LRP1-deficient cells and severely blunted upon treatment with the same amount of IGF-I over a time course of 10 min (Fig. 3, A and B). The decrease in Ras activation in LRP1^{-/-} MEFs was accompanied

by a decrease in ERK1/2 tyrosine phosphorylation (*p*-ERK1/2) starting after 10 min of IGF-1 treatment (Fig. 3, C and D). Upon 6 h of stimulation, IGF-1 decreased *p*-ERK1/2 by >95% (Fig. 3C). Conversely, IGF-1 stimulation induced a robust increase of *p*-ERK1/2 in LRP1^{+/+} MEFs (Fig. 3, C and D) or in LRP1^{-/-} MEFs re-transfected with LRP1 (Fig. 3D). Thus, LRP1 is required for activation of the IGF-1-induced ShcA/Ras/Raf/ERK signaling pathway.

One explanation for the high basal Ras activity associated with low levels of ERK activation in the LRP1^{-/-} cells (Fig. 3, A–D) would be that in the absence of LRP1, PDGFR signaling is activated (20). Furthermore, several data already suggested that in the absence of LRP1 some small GTPases are activated (29, 30). For instance, LRP1 is a major activator of Rac1 and a reciprocal inhibitor of RhoA in Schwann cells (29). Crk2 is a small adapter protein comprised of SH2 and SH3 domains (31) and tyrosine phosphorylated by the insulin receptor in parallel to the phosphorylation of Shc (32). Stimulation of Crk2 induces the inactivation of the Ras antagonist Rap1 leading to the activation of the ERK kinase cascade (32). Conversely, when tyrosine phosphorylation of Crk2 is reduced, activation of Rap1 inhibits the ERK cascade, but Ras accumulates. We tested the hypothesis that the high basal Ras activity associated with low levels of ERK activation in the absence of LRP1 is due to a reduced Crk2 activity and observed a reduced level of *p*-Crk2 in LRP1-deficient cells (Fig. 3E). Thus, Ras is activated in the absence of LRP1 but uncoupled from the ERK kinase cascade.

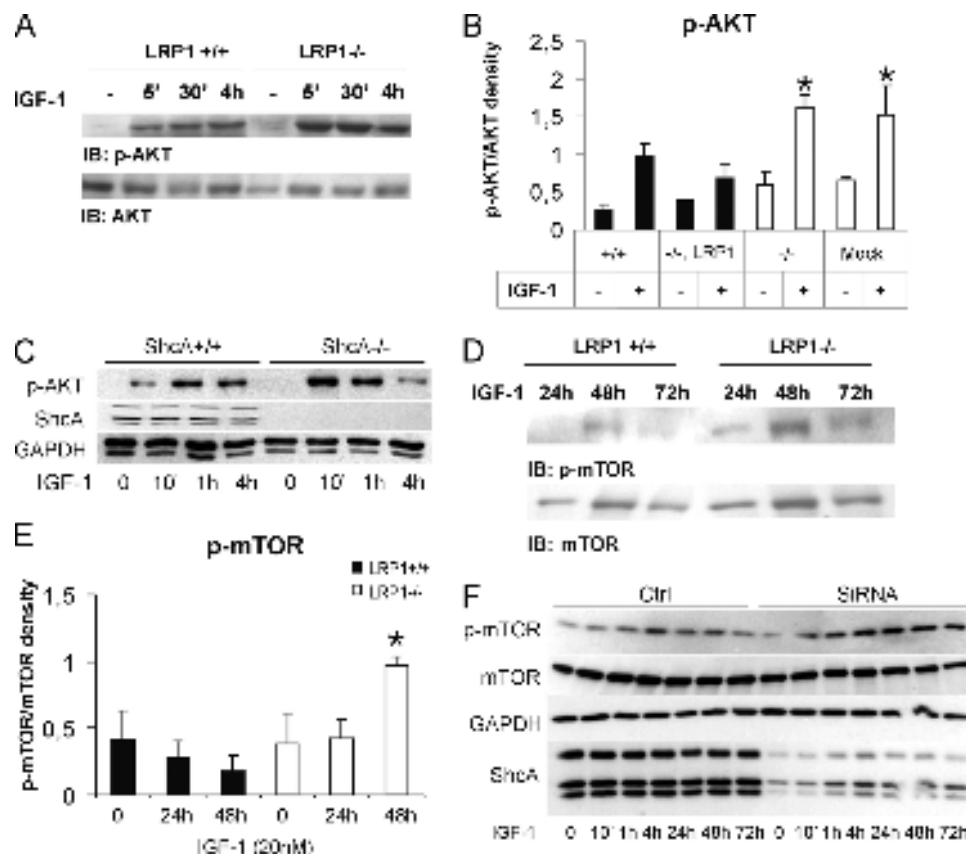


FIGURE 4. LRP1 down-regulates IGF-1 activation of the Akt/mTOR pathway. Western blot analysis of *p*-AKT in (A) LRP1^{-/-} and LRP1^{+/+} MEFs or (C) ShcA^{lox/lox} MEFs inactivated with a Cre/recombinase adenovirus, stimulated with IGF-1 (20 nM) for the indicated times. B, densitometry of the Western blot analysis of *p*-AKT in LRP1^{-/-} and LRP1^{+/+} MEFs treated or not with IGF-1 (20 nM) for 10 min. D, Western blot analysis of *p*-mTOR in LRP1^{-/-} and LRP1^{+/+} MEFs stimulated with IGF-1 (20 nM) for the indicated times. E, densitometric scanning of the Western blot analysis of *p*-mTOR in MEFs. *, *p* < 0.05 compared with control. F, Western blot analysis of *p*-mTOR and total mTOR in 3T3-L1 preadipocyte ShcA inactivated with siRNA or treated with small interfering control (Ctrl) and stimulated with IGF-1 (20 nM) for the indicated times.

Negative Control of the Akt-mTOR Pathway by the LRP1-ShcA Complex—The IGF-1 receptor signals through multiple signaling pathways including the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway (33, 34). In an attempt to determine whether the LRP1-ShcA complex could switch the IGF receptor coupling from one pathway, *i.e.* the Ras/Raf/MEK/ERK pathway to another, *i.e.* the PI3K/Akt pathway, we examined by Western blotting Akt activation in IGF-1-stimulated LRP1^{-/-}, ShcA^{-/-}, and control cells. Our data showed that the level of *p*-Akt was significantly higher in LRP1-deficient cells than in LRP1^{+/+} cells (Fig. 4, A and B). Similarly, a complete deletion of ShcA in skin fibroblasts using the Cre/lox system leads to a marked induction of *p*-Akt upon IGF-1 stimulation, when compared with control cells (Fig. 4C). This indicates that LRP1 and ShcA are common mediators of the IGF-1 action that down-regulates Akt phosphorylation.

Akt has several substrates, and can activate the mTOR, a highly conserved protein kinase that controls cell growth and metabolism in response to nutrients and growth factors (35). This regulation occurs through phosphorylation of mTOR on serine 2448 (34). To determine whether the LRP1-ShcA complex can impact the IGF-1-induced Akt-dependent mTOR activation, we analyzed mTOR serine 2448 phosphorylation after IGF-1 stimulation in LRP1^{+/+} and LRP1^{-/-} MEFs, and in 3T3 L1 pre-adipocytes knocked down for ShcA using the siRNA

technology. A 20 nM IGF-1 treatment induced a time-dependent increase in *p*-mTOR levels, which decreased after 30 min in LRP1^{+/+} cells (Fig. 4, D and E). By contrast, in LRP1^{-/-} MEFs, mTOR phosphorylation increased gradually, and high levels of its protein expression was observed even after 48 h of IGF-1 stimulation (Fig. 4, D and E). Similarly, upon IGF-1 stimulation, mTOR phosphorylation increased in 3T3 L1 pre-adipocytes knocked down for ShcA compared with control cells (Fig. 4F).

IGF-1 through activation of the PI3K/Akt pathway is involved in control of the adipogenic program (36–38). mTOR and its target the p70 S6 kinase (p70S6K) are also strongly activated in human mesenchymal stem cells under adipogenesis-inducing conditions. Treatments with LY294002 and rapamycin, which block the activation of PI3K/Akt and mTOR/p70S6K, respectively, result in pronounced inhibitory effects on adipogenesis (39). Furthermore, in pre-adipocytes, the IGF-1-induced switch from clonal expansion to differentiation correlates with loss of ShcA phosphorylation (6). To determine whether the IGF-1/PI3K/Akt/mTOR pathway could activate the adipocyte differentiation program through ShcA, we evaluated the IGF-1-induced activation of the adipocyte differentiation program in 3T3-L1 preadipocytes knocked down for ShcA. Fig. 5 shows that absence of ShcA strongly accelerated adipocyte differentiation as evaluated by Oil Red O staining

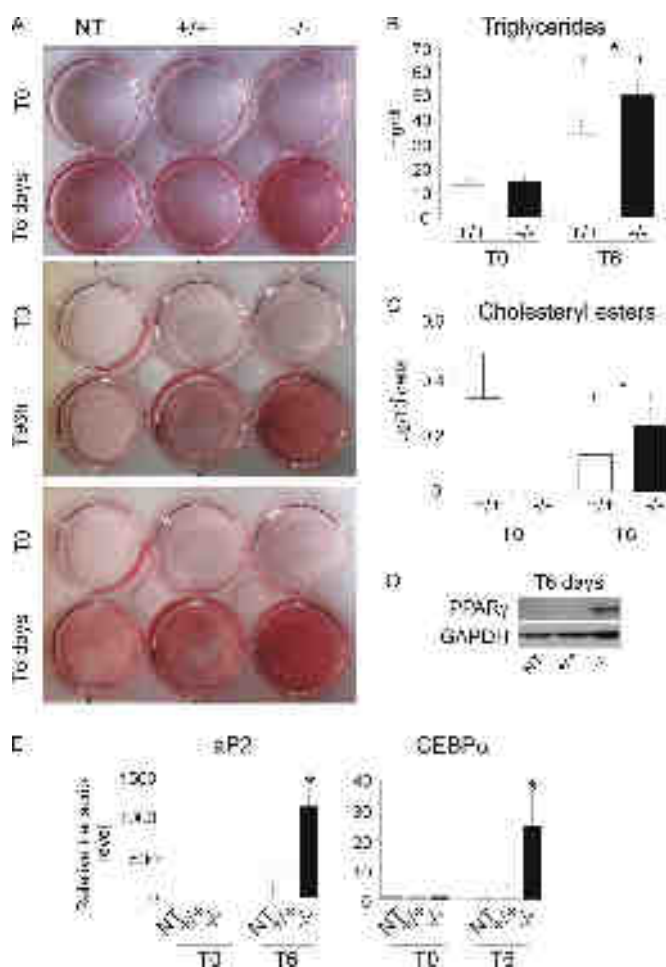


FIGURE 5. Activation of the adipocyte differentiation program by IGF-1 in ShcA-deficient cells. A, 3T3-L1 preadipocyte knockdown for ShcA ($-/-$), transfected with small interfering control ($+/+$) and non-transfected (NT) cells induced for adipocyte differentiation with a differentiation mixture containing IGF-1 (top panel) or insulin (middle and bottom panels) during the indicated times. Triglyceride (B) and cholesterol esters (C) quantification in 3T3-L1 preadipocytes knockdown for ShcA (black) and control cells (white) induced for adipogenesis during 6 days with a differentiation mixture containing IGF-1. D, Western blot analysis of PPAR γ ; E, quantitative RT-PCR analysis of the indicated genes in 3T3-L1 preadipocytes knockdown for ShcA ($-/-$), transfected with small interfering control ($+/+$) or non-transfected (NT) during adipogenesis.

when treated with a differentiation mixture containing IGF-1 (Fig. 5A, top panel) or insulin, which is also known to signal through the IGF-1 receptor (Fig. 5A, middle and bottom panels). When treated with an adipogenic mixture containing IGF-1, 3T3-L1 preadipocytes in which ShcA had been knocked down accumulated 1.5–2-fold more triglycerides and cholesterol esters compared with control cells (Fig. 5, B and C). ShcA $^{-/-}$ cells also expressed higher levels of PPAR γ (Fig. 5D) and PPAR γ target genes such as *aP2* and *CEBP α* than controls (Fig. 5E), even after only 6 days of treatment. Similarly, decreased expression of LRP1 in 3T3-L1 preadipocytes accelerated neutral lipid accumulation as evaluated by Oil Red O staining when these cells were treated with a differentiation mixture containing IGF-1 for 6 days (Fig. 6A). They also accumulated more triglycerides than control cells, without reaching significance (Fig. 6B), but similar levels of cholesterol than control cells (Fig. 6C). Thus, decreased ShcA-LRP1 complex activ-

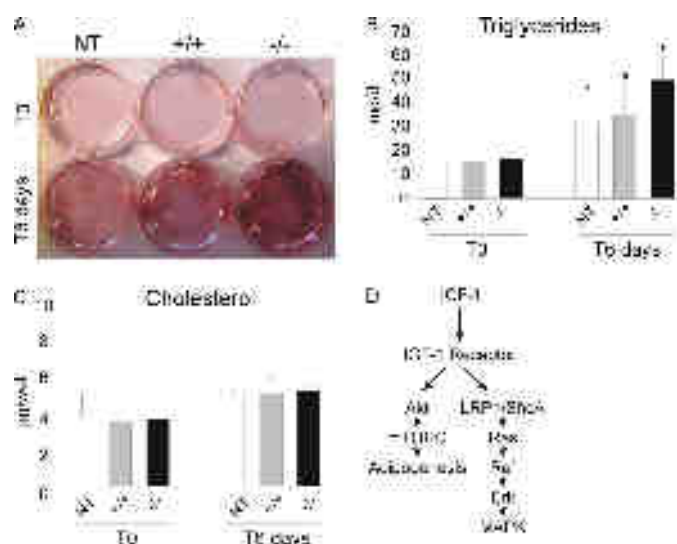


FIGURE 6. Activation of the adipocyte differentiation program by IGF-1 in LRP1-deficient cells. A, 3T3-L1 preadipocytes knockdown for LRP1 ($-/-$), transfected with small interfering control ($+/+$) and non-transfected (NT) cells induced for adipocyte differentiation with a differentiation mixture containing IGF-1 for 6 days. Intracellular triglycerides (B) and cholesterol (C) quantification in 3T3-L1 preadipocytes knockdown for LRP1 (black), control (gray), and non-transfected cells (white) induced for adipogenesis during the indicated time with a differentiation mixture containing IGF-1. D, the LRP1/ShcA switches IGF-1 signaling from the Akt/mTOR to the Grb2/Ras/ERK1/2 pathway. LRP1 is required for a full activation of the ShcA/Grb2/Ras/ERK1/2 pathway and progression in the cell cycle in response to IGF-1. When LRP1 is lacking, the Akt/mTOR pathway is activated. Results are expressed as mean $\pm$ S.E. *, $p < 0.05$.

ity re-routes IGF-1 signaling from the Grb2/Ras/ERK1/2 to the Akt/mTOR pathway, an event that accelerates differentiation of 3T3-L1 preadipocytes committed to adipogenesis (Fig. 6D).

DISCUSSION

In the present study we used adipocyte differentiation in fibroblasts as a model to investigate whether the LRP1-ShcA complex plays a role in the re-routing of IGF-1 action from increased MAP kinase signaling, which stimulates cell division, to activation of the Akt/mTOR pathway with leads to growth arrest and differentiation.

LRP1 integrates multiple signaling pathways at the surface of the membrane. It has been shown to form complexes with cell surface receptors such as the PDGF β receptor (20, 24) or the urokinase-type plasminogen activator receptor (40, 41). LRP1 modulates PDGF signaling by controlling ubiquitination and endocytosis of the PDGF receptor β (24). It also appears to escort the urokinase-type plasminogen activator receptor from caveolae (42) to clathrin-coated pits (43). However, the molecular mechanisms by which the signaling molecules that bind to its external domain or its cytoplasmic domain relay the information are not known. The results of the present study indicate that LRP1 interacts with the IGF-1 receptor. Co-immunoprecipitation between LRP1 and the IGF-1 receptor, which is already detected without any IGF-1 stimulation strongly suggests that LRP1 also modulates IGF-1 receptor-dependent signaling events.

Among the IGF-1 receptor downstream substrates lies the adaptor protein ShcA (28, 44). Here, we show that LRP1 promotes the IGF-1-dependent translocation of the three isoforms

of ShcA from the cytosolic to the plasma membrane compartment. Deletion of LRP1 alters this dynamic recruitment and impairs IGF-1 signaling.

Recruitment of ShcA to specific membrane compartments, *i.e.* caveolae, has been shown to be required for its subsequent phosphorylation upon IGF-I stimulation (44). Our data show that LRP1 is required for the IGF-1-induced tyrosine phosphorylation of the p66 isoform of ShcA. In the absence of LRP1, IGF-1-induced p66 ShcA tyrosine phosphorylation is drastically blunted. ShcA tyrosine phosphorylation leads to Grb2 recruitment to ShcA (28). Here, we also show that LRP1 deficiency leads to a blunted IGF-1-induced Grb2 recruitment to ShcA. Altogether, our data indicate that LRP1 is required for the optimal activation of ShcA upon IGF-1 stimulation.

The recruitment of Grb2 to ShcA leads to the activation of the guanine nucleotide exchange factor SoS, which activates Ras and triggers the Ras/Raf/MEK/ERK signaling cascade (27, 28). As expected, we show that upon IGF-1 stimulation, there is a time-dependent increase in Ras activation in the presence of LRP1, whereas in the absence of LRP1, IGF-1 induces a decrease in Ras activation. Also, upon IGF-1 stimulation, there is a sustained ERK1/2 activation in the presence of LRP1. However, in LRP1-deficient cells, IGF-1-induced ERK1/2 activation is impaired and transient, highlighting that full activation of the Ras-ERK1/2 pathway by IGF-1 requires LRP1.

Besides ShcA/Grb2/Ras/ERK1/2, the IGF-1 receptor, once activated by IGF-1, can also stimulate the Akt/PKB pathway (33). Akt has several substrates such as mTOR (34). Our results show that before and after IGF-1 stimulation *p*-mTOR levels follow the same activation kinetics as Akt, in LRP1^{+/+} as well as LRP1^{-/-} cells. Altogether our results show that the LRP1-ShcA complex induces a switch of IGF-1 receptor coupling away from Akt/mTOR and toward the Grb2/Ras/ERK1/2 pathway.

In our fibroblast experiments, in the absence of ShcA the IGF-1-induced activation of the Akt/mTOR pathway and the concomitant decrease in Ras and ERK1/2 activation accelerate the adipocyte differentiation program and facilitate intracellular storage of cholesteryl esters and triglycerides. This is consistent with previous findings by Hosooka *et al.* (45), who demonstrated that the protein downstream of tyrosine kinases-1 (Dok1) binds and activates Ras in response to insulin, thereby regulating mitogenic signaling mediated by Ras and the ERK pathway (45). Dok1-deficient fibroblasts exhibit impaired adipocyte differentiation, possibly due to an increase in ERK activity and a consequent increase in the phosphorylation, and thus inhibition, of PPAR γ . Dok1-deficient mice are leaner and show improved glucose tolerance and insulin sensitivity (45). PPAR γ plays a crucial role in adipogenesis and our data are also consistent with the fact that the ERK family is known to repress the transcriptional and biological functions of PPAR γ and reduces its ability to promote adipogenesis (46). Conversely, PKB/Akt signaling promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation upon IGF-I stimulation (47), whereas mTOR positively regulates adipocyte differentiation by controlling the activation of PPAR γ (48). Thus, by decreasing PKB/Akt activation in response to IGF-I stimulation, ShcA protects against adipocyte hypertrophy by activating the inhibitory effect of ERK on PPAR γ and may thus protect against diet-induced obesity.

In conclusion, we have shown in this study that the LRP1-ShcA-IGF-1 receptor complex acts as a molecular switch required for the full activation of the Ras/ERK1/2 pathway, whereas absence of ShcA leads to activation of the Akt/mTOR pathway and entry into the adipocyte differentiation program. This has important physiological consequences for the regulation of cell differentiation and proliferation in diverse cell types *in vitro* and *in vivo* and, specifically, for the process of adipose tissue formation, and obesity.

Acknowledgments—We thank Dr. Daniel Metzger (University of Strasbourg, France) for critical reading of the manuscript and helpful suggestions, and Dr. Richard G. W. Anderson (University of Texas, Southwestern Medical Center, at Dallas) for providing the SYF cells.

REFERENCES

1. Laviola, L., Natalicchio, A., and Giorgino, F. (2007) *Curr. Pharm. Des.* **13**, 663–669
2. Smith, P. J., Wise, L. S., Berkowitz, R., Wan, C., and Rubin, C. S. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 9402–9408
3. Holzenberger, M., Hamard, G., Zaoui, R., Leneuve, P., Ducos, B., Beccavin, C., Périn, L., and Le Bouc, Y. (2001) *Endocrinology* **142**, 4469–4478
4. Boney, C. M., Moats-Staats, B. M., Stiles, A. D., and D'Ercole, A. J. (1994) *Endocrinology* **135**, 1863–1868
5. Scavo, L. M., Karas, M., Murray, M., and Leroith, D. (2004) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 3543–3553
6. Boney, C. M., Gruppuso, P. A., Faris, R. A., and Frackelton, A. R., Jr. (2000) *Mol. Endocrinol.* **14**, 805–813
7. Boney, C. M., Smith, R. M., and Gruppuso, P. A. (1998) *Endocrinology* **139**, 1638–1644
8. Pelicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Grignani, F., Pawson, T., and Pelicci, P. G. (1992) *Cell* **70**, 93–104
9. Blaikie, P., Immanuel, D., Wu, J., Li, N., Yajnik, V., and Margolis, B. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 32031–32034
10. Migliaccio, E., Mele, S., Salcini, A. E., Pelicci, G., Lai, K. M., Superti-Furga, G., Pawson, T., Di Fiore, P. P., Lanfrancone, L., and Pelicci, P. G. (1997) *EMBO J.* **16**, 706–716
11. Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P. P., Lanfrancone, L., and Pelicci, P. G. (1999) *Nature* **402**, 309–313
12. Craparo, A., O'Neill, T. J., and Gustafson, T. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 15639–15643
13. Dey, B. R., Frick, K., Lopaczynski, W., Nissley, S. P., and Furlanetto, R. W. (1996) *Mol. Endocrinol.* **10**, 631–641
14. Yokote, K., Mori, S., Hansen, K., McGlade, J., Pawson, T., Heldin, C. H., and Claesson-Welsh, L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 15337–15343
15. Barnes, H., Ackermann, E. J., and van der Geer, P. (2003) *Oncogene* **22**, 3589–3597
16. Loukinova, E., Ranganathan, S., Kuznetsov, S., Gorlatova, N., Migliorini, M. M., Loukinov, D., Ulery, P. G., Mikhailenko, I., Lawrence, D. A., and Strickland, D. K. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 15499–15506
17. Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H., and Stanley, K. K. (1988) *EMBO J.* **7**, 4119–4127
18. Herz, J., Chen, Y., Masiulis, I., and Zhou, L. (2009) *J. Lipid Res.* **50**, (suppl.) S287–292
19. Terrand, J., Bruban, V., Zhou, L., Gong, W., El Asmar, Z., May, P., Zuhrova, K., Haffner, P., Philippe, C., Woldt, E., Matz, R. L., Gracia, C., Metzger, D., Auwerx, J., Herz, J., and Boucher, P. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 381–388
20. Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W. P., Anderson, R. G., and Herz, J. (2003) *Science* **300**, 329–332
21. May, P., Woldt, E., Matz, R. L., and Boucher, P. (2007) *Ann. Med.* **39**, 219–228
22. Boucher, P., Liu, P., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Anderson, R. G., and

LRP1 Controls IGF-1 Signaling Pathway

- Herz, J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 15507–15513
23. Sakai, J., Duncan, E. A., Rawson, R. B., Hua, X., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1996) *Cell* **85**, 1037–1046
24. Takayama, Y., May, P., Anderson, R. G., and Herz, J. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 18504–18510
25. Salani, B., Briatore, L., Garibaldi, S., Cordera, R., and Maggi, D. (2008) *Endocrinology* **149**, 461–465
26. Liu, P., Rudick, M., and Anderson, R. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 41295–41298
27. Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 14843–14846
28. Ravichandran, K. S. (2001) *Oncogene* **20**, 6322–6330
29. Mantuano, E., Jo, M., Gonias, S. L., and Campana, W. M. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 14259–14266
30. Zhou, L., Takayama, Y., Boucher, P., Tallquist, M. D., and Herz, J. (2009) *PLoS One* **4**, e6922
31. Reichman, C. T., Mayer, B. J., Keshav, S., and Hanafusa, H. (1992) *Cell Growth Differ.* **3**, 451–460
32. Pessin, J. E., and Okada, S. (1999) *Endocr. J.* **46**, (suppl.) S11–16
33. Kulik, G., Klippel, A., and Weber, M. J. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1595–1606
34. Levine, A. J., Feng, Z., Mak, T. W., You, H., and Jin, S. (2006) *Genes Dev.* **20**, 267–275
35. Wullschlegel, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006) *Cell* **124**, 471–484
36. Sakaue, H., Ogawa, W., Matsumoto, M., Kuroda, S., Takata, M., Sugimoto, T., Spiegelman, B. M., and Kasuga, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 28945–28952
37. Tomiyama, K., Nakata, H., Sasa, H., Arimura, S., Nishio, E., and Watanabe, Y. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**, 263–269
38. Xia, X., and Serrero, G. (1999) *J. Cell. Physiol.* **178**, 9–16
39. Yu, W., Chen, Z., Zhang, J., Zhang, L., Ke, H., Huang, L., Peng, Y., Zhang, X., Li, S., Lahn, B. T., and Xiang, A. P. (2008) *Mol. Cell. Biochem.* **310**, 11–18
40. Conese, M., Nykjaer, A., Petersen, C. M., Cremona, O., Pardi, R., Andreasen, P. A., Gliemann, J., Christensen, E. I., and Blasi, F. (1995) *J. Cell Biol.* **131**, 1609–1622
41. Webb, D. J., Nguyen, D. H., and Gonias, S. L. (2000) *J. Cell Sci.* **113**, 123–134
42. Stahl, A., and Mueller, B. M. (1995) *J. Cell Biol.* **129**, 335–344
43. Zhang, J. C., Sakthivel, R., Kniss, D., Graham, C. H., Strickland, D. K., and McCrae, K. R. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32273–32280
44. Ling, Y., Maile, L. A., Lieskovska, J., Badley-Clarke, J., and Clemmons, D. R. (2005) *Mol. Biol. Cell* **16**, 3353–3364
45. Hosooka, T., Noguchi, T., Kotani, K., Nakamura, T., Sakaue, H., Inoue, H., Ogawa, W., Tobimatsu, K., Takazawa, K., Sakai, M., Matsuki, Y., Hiramatsu, R., Yasuda, T., Lazar, M. A., Yamanashi, Y., and Kasuga, M. (2008) *Nat. Med.* **14**, 188–193
46. Shao, D., Rangwala, S. M., Bailey, S. T., Krakow, S. L., Reginato, M. J., and Lazar, M. A. (1998) *Nature* **396**, 377–380
47. Xu, J., and Liao, K. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 35914–35922
48. Kim, J. E., and Chen, J. (2004) *Diabetes* **53**, 2748–2756



Implication de LRP1 et ShcA dans deux pathologies cardiovasculaires : l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques est nécessaire. Dans ce travail de thèse nous nous sommes intéressés à deux pathologies cardiovasculaires : l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque. Récemment, nous avons identifié le récepteur LRP1 et la protéine adaptatrice ShcA comme étant deux protéines impliquées dans deux de ces pathologies cardiovasculaires. Nous avons montré que ShcA joue un rôle protecteur dans l'insuffisance cardiaque. Chez les souris déficiente en ShcA au niveau cardiaque, nous observons une cardiomyopathie caractérisée par une dilatation du ventricule gauche associée à une perte de la contractilité. Nous avons montré que ShcA est essentiel à l'organisation des sarcomères et ceci très tôt durant l'embryogenèse. Dans une deuxième partie nous avons montré qu'en l'absence de PPARgamma, LRP1 était nécessaire à la calcification vasculaire en activant la voie prochondrogénique de Wnt5a. Nous avons montré que PPARgamma protège de la calcification vasculaire en induisant l'expression de Sfrp2 qui agit comme un antagoniste de Wnt5a.

Mot clef : ShcA ; LRP1 ; PPARgamma ; Wnt5 ; sarcomère ; costamère ; insuffisance cardiaque ; cœur ; athérosclérose ; calcification ; chondrogenèse

Cardiovascular disease is the number one cause of death worldwide. A better understanding of the pathophysiological mechanisms is necessary. In this thesis we are focused on two cardiovascular diseases: atherosclerosis and heart failure. Recently, we identified the LRP1 receptor and the adapter protein ShcA as two proteins involved in two of these cardiovascular diseases. We have shown that ShcA exerts a protective role against heart failure. Mutant mice lacking ShcA in the heart exhibit a dilated cardiomyopathy with reduced cardiac contractility. Myocyte ultrastructure analysis shows that ShcA is essential to maintain sarcomeric integrity in early embryonic heart development. In last part we have shown vascular calcification in the absence of PPARgamma requires expression of LRP1 in vascular smooth muscle cells. LRP1 promotes a Wnt5a-dependent prochondrogenic pathway. We show that PPARgamma protects against vascular calcification by inducing the expression of secreted frizzled-related protein-2 (Sfrp2, which functions as a Wnt5a antagonist).

Key Words: ShcA; LRP1; PPARgamma; Wnt5a; Sarcomer, Costamer, Heart failure; Heart; Atherosclerosis; Calcification; Chondrogenesis