



Nouvelles voies de régulation contrôlant l'homéostasie lipidique et l'inflammation dans le macrophage humain au cours de l'athérosclérose

Alexandre Superville

► To cite this version:

Alexandre Superville. Nouvelles voies de régulation contrôlant l'homéostasie lipidique et l'inflammation dans le macrophage humain au cours de l'athérosclérose. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. <NNT : 2014PA066496>. <tel-01127622>

HAL Id: tel-01127622

<https://theses.hal.science/tel-01127622v1>

Submitted on 7 Mar 2015

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.



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Présentée par

M. Alexandre SUPERVILLE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

**NOUVELLES VOIES DE RÉGULATION CONTRÔLANT L'HOMÉOSTASIE LIPIDIQUE
ET L'INFLAMMATION DANS LE MACROPHAGE HUMAIN AU COURS DE
L'ATHÉROSCLEROSE**

Soutenue le 25 septembre 2014

Devant le jury composé de :

Pr. Stéphane HATEM

Président du Jury

Dr. David MASSON

Rapporteur

Dr. Giuseppina CALIGIURI

Rapporteur

Dr. Khadija EL HADRI ZEGOUAGH

Examineur

Dr. Nicolas VENTECLEF

Examineur

Dr. Maryse GUERIN

Directeur de thèse

Dr. Wilfried LE GOFF

Co-directeur de Thèse

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Présentée par

M. Alexandre SUPERVILLE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

NOUVELLES VOIES DE RÉGULATION CONTRÔLANT L'HOMÉOSTASIE LIPIDIQUE

ET L'INFLAMMATION DANS LE MACROPHAGE HUMAIN AU COURS DE

L'ATHÉROSCLEROSE

Soutenue le 25 septembre 2014

Devant le jury composé de :

Pr. Stéphane HATEM

Président du Jury

Dr. David MASSON

Rapporteur

Dr. Giuseppina CALIGIURI

Rapporteur

Dr. Khadija EL HADRI ZEGOUAGH

Examineur

Dr. Nicolas VENTECLEF

Examineur

Dr. Maryse GUERIN

Directeur de thèse

Dr. Wilfried LE GOFF

Co-directeur de Thèse

*A mon père,
J'espère que cela t'aurait rendu fier...*

REMERCIEMENTS

Premièrement, je remercie les membres du jury d'avoir accepté mon invitation.

Merci à David Masson et Giuseppina Caligiuri d'avoir accepté d'être mes rapporteurs.

Merci à Nicolas Venteclef et à Khadija El Hadri d'évaluer mon manuscrit en parallèle, ainsi que d'avoir suivi mon travail depuis le début.

Enfin, merci au professeur Stéphane Hatem d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie en premier lieu le Dr. Wilfried Le Goff de m'avoir donné ma chance en M2 malgré bien des obstacles. De m'avoir encadré du début à la fin, formé techniquement comme scientifiquement. De m'avoir laissé suffisamment d'indépendance pour me permettre de développer mes projets, tout en les cadrant intelligemment. Et plus simplement de m'avoir supporté dans tous les sens du terme.

J'ai aussi énormément apprécié nos discussions plus informelles, sur le monde de la science, et le monde en général ; ce fut un grand plaisir de pouvoir échanger avec un chercheur de manière aussi naturelle.

En premier lieu également, merci au Dr. Maryse Guérin. Nos débuts ont certes été difficiles, mais une fois cela surmonté tu as su veiller d'un œil bienveillant sur le bon déroulement des opérations, en sachant parfois me canaliser. Merci pour ta disponibilité, de m'avoir transmis ton expérience, et pour ta compréhension, ton sens de la dédramatisation et ton calme, qualités qu'il me manque parfois cruellement.

Egalement, plus personnellement, j'aimerais remercier mes deux directeurs de thèse d'avoir été un soutien pour les épreuves difficiles traversées durant mon doctorat.

Plus formellement, je tiens à remercier les deux directeurs successifs de la structure, le Dr. John Chapman et le Dr. Philippe Lesnik, qui m'ont accueilli avec bienveillance et sympathie.

Petra El Khoury et Laura Bouchareychas, merci pour votre amitié qui j'espère continuera, et votre soutien de chaque instant, qui a beaucoup compté car nous avons été dans le « même bateau » depuis janvier 2011. Etre coincé entre une flegmatique intemporelle et une râleuse de classe mondiale pendant tout ce temps fut une expérience de choix. J'ai particulièrement apprécié nos « debriefs » du vendredi soir et nos escapades en Autriche, au Liban, en Angleterre et au Canada ; en espérant qu'elles seront renouvelées.

Eric Frisdal, merci pour m'avoir formé techniquement sur bien des aspects, m'avoir communiqué ta rigueur et ta minutie, même si ça m'a beaucoup fait râler, j'ai appris ! Merci également d'avoir veillé à notre sécurité de manière scrupuleuse et enfin pour ton soutien.

Elise Villard, un an que tu as soutenu déjà ; je ne t'ai pourtant pas oubliée (c'est beau), ton soutien a beaucoup compté aussi. Merci de ne pas avoir mis les pièges que tu m'avais promis en première année.

A mes autres collègues « djeuns's » qui ont été des amis. Dans le désordre, Laurianne Galle pour les conseils quand j'étais en panique, Julie Gall pour la « réflexion qui fait mouche », Flora Saint-Charles juste pour ton rire, Raphaëlle Ballaire pour les potins, Alexandre Cukier pour les bières de remontage, Carolane Dauteuille pour les potins aussi.... Et aussi William Hancock-Cerruti, Tiphaine Le Roy, Lucie Poupel, Maïsa Nabulsi et Martine Moreau. Partager le quotidien de chacun d'entre vous a été un réel plaisir pour moi, pour des raisons trop longues à énumérer.

Les chercheurs du laboratoire, Philippe Lesnik, Thierry Huby, Alain Carrié, Philippe Couvert, Emmanuel Gautier, Anatol Kontush, John Chapman, Isabelle Guillas et Michèle Garlatti ont également été un soutien de tous les jours, et participent à rendre si plaisant le quotidien de l'équipe par leurs personnalités diverses et hautes en couleur. Merci donc pour cette ambiance amicale, et pour les moments partagés dans comme parfois en dehors du labo !

A « ma » stagiaire M2 2014, Fatima Kalfaoui ; plein de réussite, d'accomplissements et de joies futures. J'ai eu grand plaisir à partager cette dernière année de thèse, mon projet, l'expérience que j'ai acquise ces dernières années et j'espère que tu pourras te réaliser également le plus rapidement possible !

Enfin, j'aimerais remercier ma famille de m'avoir emmené jusqu'ici et permis de faire de longues études, mes parents, grands-parents, ma sœur Rose et Charlotte.

Une dernière phrase pour mes meilleurs amis, Claire, Alice, Cécile, Léo, Charlie, Mel, Pierre, Montaine, Marine, Brigitte et la Secte qui m'ont entouré et choyé tout ce temps ! Ca fait beaucoup, mais personne n'a été de trop !

SOMMAIRE

❖ Remerciements	IV
❖ Sommaire	VI
❖ Valorisation	X
❖ Liste des abréviations	XIII
❖ Résumé français/anglais	XIV
❖ Liste des figures	XVI

❖ Avant-propos : les maladies cardio-vasculaires	1
❖ Introduction bibliographique	4

Chapitre I : Macrophage & Athérosclérose

A. L'initiation de l'athérosclérose	5
1. Hypercholestérolémie, monocytes et neutrophiles	7
a) Neutrophiles, monocytes et athérosclérose	
b) Mécanismes proposés : action sur les progéniteurs	
2. Stress endothélial	10
a) Shear stress et perméabilité de l'endothélium	
b) Activation de l'endothélium	
3. Infiltration de macrophages	14
a) Initiation de la diapédèse	
b) Les leucocytes dans la plaque	
c) Un processus dynamique	
B. De la strie lipidique à la lésion précoce	20
1. Formation des cellules spumeuse	20
a) Internalisation des lipoprotéines	
b) L'internalisation du cholestérol	
c) Le stockage du cholestérol	
2. Modification de l'environnement	25
a) Activation de l'immunité innée	
b) Le stress oxydant	
3. Recrutement des CMLs	31

C. La lésion avancée	32
1. Fragilisation de la plaque	32
a) La régression de la plaque	
b) L'apoptose des macrophages : le coeur nécrotique	
c) La fragilisation et rupture	
2. Rupture du thrombus	36

Chapitre II : Homéostasie du cholestérol

A. Le cholestérol intracellulaire	40
1. Esters de cholestérol et cholestérol libre	40
a) ACAT-1 et gouttelettes lipidiques	
b) L'hydrolyse neutre des esters	
2. Mobilisation du cholestérol et autophagie	43
a) L'autophagie	
b) Lipophagie et cellules spumeuses	
3. Transport du cholestérol	44
a) Le transport vésiculaire	
b) Les LTPs : NPC-1 et NPC-2	
c) L'hypothèse ARL7	
4. Le cholestérol à la membrane plasmique	51
a) Les radeaux lipidiques	
b) Radeaux lipidiques , efflux et athérosclérose	
B. Le cholestérol dans l'organisme	55
1. Absorption et transport des lipides dans le plasma	56
a) Les chylomicrons, lipoprotéines post-prandiales	
b) La voie endogène d'apport	
2. L'efflux de cholestérol cellulaire	58
a) La diffusion passive	
b) Le transporteur ABCA1	
c) Le transporteur ABCG1	
d) Le récepteur SR-B1/CLA-1	
e) L'apolipoprotéine E	
3. Le transport inverse du cholestérol	69
a) ApoA-I et la formation des HDL	
b) Autres composantes des HDL	
c) Autres propriétés des HDL	
d) Retour et excrétion du cholestérol	
C. Régulations moléculaires	77
1. Les récepteurs nucléaires LXRs	77
a) Mécanisme	
b) LXR, RCT et athérosclérose	
c) LXR dans le macrophage humain	
2. Les micro-RNA	89

Chapitre III : Inflammation & Inflammasome

A. L'inflammation classique dans le macrophage	92
1. Stimuli, récepteurs et populations	92
2. L'activation transcriptionnelle de l'inflammation : NF- κ B	96
a) Les cascades de signalisation : MyD88 et TRIF	
b) Les facteurs NF- κ B-dépendants	
c) Inhibition de NF- κ B et athérosclérose	
3. Autres cytokines NF- κ B-indépendantes	109
B. L'inflammasome NLRP3	110
1. Les inflammasomes, multi-senseurs « verrous » de l'inflammation	110
2. NLRP3, les cristaux et le stress lysosomal	113
3. NLRP3 et l'athérosclérose	115
4. IL-1 β et IL-18	118
C. AEP et les Cathepsines	121
1. Les cathepsines	121
a) Diversité	
b) La cathepsine D et l'efflux de cholestérol	
c) Les cathepsin B et L et l'inflammasome	
2. AEP et la maturation des cathepsines	124

❖ Présentation des travaux de recherche	126
--	------------

Etude #1 (Article soumis)	127
----------------------------------	------------

Stimulation of Cholesterol Efflux from Human Macrophages by Liver X Receptors agonists is a two step mechanism dependant of LXR α and controlled by ABCA1 and ARL7

Etude #2 (Etude préliminaire)	151
--------------------------------------	------------

Rôle de l'agoniste LXR GW3965 dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 au sein des macrophages

Etude #3 (Article en finalisation)	170
---	------------

AEP invalidation impairs NLRP3 activation in macrophages and reduces atherosclerosis development

❖ **Etudes complémentaires** 202

#1 *Human ATP-Binding Cassette G1 controls Macrophage Lipoprotein Lipase Bioavailability and Promotes Foam Cell Formation*

#2 *ATP-Binding Cassette G1 Contributes to Adipocyte Triglyceride Storage, Adiposity and Obesity*

❖ **Discussion et Perspectives** 209

❖ **Bibliographie** 215

➤ Publications

1. Stimulation of Cholesterol Efflux from Human Macrophages by Liver X Receptors agonists is a two step mechanism dependant of LXR α and controlled by ABCA1 and ARL7. Alexandre Superville, Eric Frisdal, Lucie Poupel, MJ Kim, Carmel M. Quinn, Philippe Lesnik, Wendy Jessup, Maryse Guérin et Wilfried Le Goff. Soumis ATVB.
2. AEP-dependant cathepsin B and L maturation is necessary for NLRP3 inflammasome activation by ALUM crystals in macrophages and concomitant atheroma lesion development. Alexandre Superville, Emmanuel L. Gautier, Lucie Poupel, Eric Frisdal, Flora Saint-Charles, Maryse Guérin, Philippe Lesnik et Wilfried Le Goff
3. Human ATP-Binding Cassette G1 Controls Macrophage Lipoprotein Lipase Bioavailability and Promotes Foam Cell Formation. Maryline Olivier, Michael W. Tack, Ruud Out, Elise F. Villard, Bart Lammers, Laura Bouchareychas, Eric Frisdal, Alexandre Superville, Théo Van Berkel, John J Kastelein, Miranda Van Eck, J Wouter Jukema, M John Chapman, Geesje M. Dallinga-Thie, Maryse Guérin et Wilfried Le Goff. ATVB 2012.
4. ATP-Binding Cassaette G1 Contributes to Adipocyte Triglycerides Storage, Adiposity and Obesity. Eric Frisdal, Soazig Le Lay, Henri Hooton, Maryline Olivier, Rohia Allili, Wane Plengpanich, Elise F. Villard, Sophie Gilibert, Alexandre Superville, Lobna Miftah-Alkhair, M. John Chapman, Gessje M. Dallinga-Thie, Nicolas Venteclef, Christine Poitou, Joan Tordjman, Philippe Lesnik, Thierry Huby, Isabelle Dugail, Karine Clément, Maryse Guérin et Wilfried Le Goff. Soumis.

➤ **Communications Orales**

- LXR α promotes cholesterol efflux from human foam cells in an ABCA1 dependent manner. Alexandre Superville, Eric Frisdal, Lucie Poupel, MJ Kim, Carmel M. Quinn, Philippe Lesnik, Wendy Jessup, Maryse Guérin et Wilfried Le Goff. 9ème congrès annuel de la Nouvelle Société d'athérosclérose Française (NSFA) Juin 2012, Biarritz, France
- Preponderant role of LXR α in cholesterol efflux from human foam cells in a specific ABCA1-dependant pathway. Alexandre Superville, Eric Frisdal, Carmel M. Quinn, MJ. Kim, Wendy Jessup, Philippe Lesnik, Maryse Guérin, Wilfried Le Goff . 1ère journée de l'Institut de Cardiométabolisme et Nutrition (ICAN), Septembre 2013, Paris, France.
- Implication of AEP in macrophage NLRP3 inflammasome activation. A role in inflammation and atherogenesis? Alexandre Superville, Emmanuel L. Gautier, Lucie Poupel, Eric Frisdal, Flora Saint-Charles, Maryse Guérin, Philippe Lesnik et Wilfried Le Goff. 10ème congrès annuel de la NSFA, Juin 2014, Biarritz, France

➤ **Communications affichées**

- Preponderant role of LXR α in cholesterol efflux from human foam cells. Alexandre Superville, Eric Frisdal, Maryse Guérin and Wilfried Le Goff. 13èmes journée de l'Ecole Doctorale Physiologie et Physiopathologie, 24-25 mai 2012, CRC, Paris, France.
- Preponderant role of LXR α in cholesterol efflux from human foam cells through a specific ABCA1-dependent pathway. Alexandre Superville, Eric Frisdal, MJ Kim, Carmel M. Quinn, Philippe Lesnik, Wendy Jessup, Maryse Guérin et Wilfried Le Goff. 14èmes journée de l'Ecole Doctorale Physiologie et Physiopathologie, 16-17 mai 2013, Hopital Saint Antoine, Paris, France.
- Preponderant role of LXR α in cholesterol efflux from human foam cells through a specific ABCA1-dependent pathway. Alexandre Superville, Eric Frisdal, MJ Kim, Carmel M. Quinn, Philippe Lesnik, Wendy Jessup, Maryse Guérin et Wilfried Le Goff. European Atherosclerosis Society Congress, Juin 2013, Lyon, France
- Stimulation of cholesterol efflux from human macrophage by LXR agonists is a two-step LXR α -dependent mechanism controlled by ARL7 and ABCA1. . Alexandre Superville, Eric Frisdal, MJ Kim, Carmel M. Quinn, Philippe Lesnik, Wendy Jessup, Maryse Guérin et Wilfried Le Goff. Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology (ATVB) Congress, 1-3 Mai 2014, Toronto, Canada.
- Stimulation of cholesterol efflux from human macrophage by LXR agonists is a two-step LXR α -dependent mechanism controlled by ARL7 and ABCA1. . Alexandre Superville, Eric Frisdal, MJ Kim, Carmel M. Quinn, Philippe Lesnik, Wendy Jessup, Maryse Guérin et Wilfried Le Goff. 10ème congrès annuel de la NSFA, Juin 2014, Biarritz, France.

LISTE DES ABREVIATIONS

ABCA1/ABCG1 : ATP-Binding Cassette A1/G1
ACAT : Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase
AEP : Asparagine Endopeptidase
ApoA-I : apolipoprotéine A-I
ApoE : apolipoprotéine E
CCR / CCL : C-C chemokine receptor / ligand
CEH : Cholesterol Ester Hydrolase
CETP : Cholesteryl-ester Transfer Protein
CL : Cholestérol Libre
CM : Chylomicrons
CML : Cellules Musculaires Lisses
CXCR – CXCL : CXC chemokine receptor / ligand
DAMP : Damage Associated Molecular Pattern
DC : Cellule Dendritique
HDL : High Density Lipoprotein
IL-1 β / 18 / 6 / 10 : Interleukine 1 bêta / 18 / 6 / 10
LDL : Low Density Lipoprotein
LDLox : LDL oxydées
LDLr : LDL-récepteur
LPL : Lipoprotéine Lipase
LTP : Lipid Transfer Protein
LXR : Liver X Receptor
MCV : Maladies Cardiovasculaires
M-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor
MMP : Matrix Metalloprotease
NF- κ B : Nuclear Factor kappa B
NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NPC1/2 : Niemann-Pick type C protein 1/2
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
PL : Phospholipides
PRR : Pattern Recognition Receptor
RCT : Reverse Cholesterol Transport / Transport Inverse du Cholestérol
RE : Réticulum Endoplasmique
ROS : Reactive Oxygen Species
SR-BI/CLA-1 : Scavenger receptor class B member 1 / CD36 and LIMPII analogous-1
SREBP : Sterol Regulatory Element Binding Protein
TG : Triglycérides
TLR : Toll-like Receptor
TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha
UPR : Unfolded Protein Response
VLDL : very-low density lipoprotein

Nouvelles voies de régulation contrôlant l'homéostasie lipidique et l'inflammation dans le macrophage humain au cours de l'athérosclérose

L'accumulation de cellules spumeuses dans l'intima des artères est le point critique de l'initiation de l'athérosclérose. L'accumulation de cholestérol et l'activation des voies pro-inflammatoires sont responsables de l'acquisition par les macrophages de ce phénotype délétère. Les dérivés oxydés du cholestérol accumulés vont stimuler les récepteurs nucléaires LXR et incidemment l'efflux de cholestérol athéroprotecteur, tandis que la phagocytose de cholestérol cristallisé dans la lésion causera une perturbation du trafic vésiculaire qui activera l'inflammasome NLRP3, verrou de l'inflammation IL-1. Cette étude a pour but de décrypter ces voies dans le macrophage humain.

La stimulation de l'efflux de cholestérol par un agoniste LXR dans le macrophage humain m'a été médiée par l'activation transcriptionnelle LXR α -dépendante d'ARL7 - qui permet le transport du cholestérol libre de la membrane des endosomes et lysosomes aux radeaux lipidiques – et du transporteur ABCA1 – l'exportant vers les HDL, lipoprotéines athéroprotectrices.

L'activation du complexe multi-protéique NLRP3 dans le macrophage, et la sécrétion des cytokines délétères IL-1 β et IL-18, est également réprimée par l'agoniste LXR. L'activation des cathepsines B et L par l'enzyme AEP est aussi nécessaire pour l'activation de NLRP3 par des cristaux. Inactiver l'AEP protège ainsi contre le développement de l'athérosclérose.

Ces travaux ont démontré la nécessité des études chez l'humain pour la mise en évidence des mécanismes moléculaires et la nécessité d'intégrer les signalisations lipidiques et inflammatoires étroitement liées dans la cellule spumeuse.

RESUME EN ANGLAIS

New insights in signaling pathways controlling lipid homeostasis and inflammation in human macrophages during atherosclerosis

Foam cell accumulation in arterial walls is the critical initiating event of atheroma plaque development. Macrophages acquire this phenotype by cholesterol ester accumulation and pro-inflammatory signaling pathways activation. Oxidized form of cholesterol activates LXR and subsequently atheroprotective cellular cholesterol efflux. In parallel, crystallized cholesterol phagocytosis will impair vesicular traffic, activating NLRP3 and deleterious IL-1 cytokines release. Here we describe further those pathways in human macrophages and to evidence new key factors in atherosclerosis development.

First, stimulation of cellular cholesterol efflux to ApoA-I and HDL from human macrophage by LXR agonist is LXR α -dependent. Transcriptional activation of ARL7 increases cholesterol transport from endolysosomal membrane to efflux-prone plasmic membrane pools, lipid rafts. From there, cholesterol will be exported on ApoA-I containing lipoproteins by ABCA1 transporter, whose expression is stimulated by LXR α agonists as well.

Cholesterol crystals phagocytose will lead to inflammasome NLRP3 activation, leading to pro-atherogenous IL-1 β and IL-18 secretion. We first showed LXR agonist GW3965 role in repressing transcription of NLRP3 partners. Also, we evidenced the importance of cathepsin B and L maturation by asparagin endopeptidase (AEP) in human macrophages, and atheroprotective properties of AEP silencing.

Overall, this work demonstrated the necessity of using human models to confirm murine data about molecular mechanisms. Also, it is important to integrate lipid homeostasis and inflammation signaling in foam cells, for there is a strong molecular link between both.

LISTE DES FIGURES

- ❖ Figure 1 – Classification histologique des stades de développement d’une lésion d’athérosclérose (p. 6)
- ❖ Figure 1bis – Description des stades développement d’une lésion d’athérosclérose (p. 6)
- ❖ Figure 2 – Régulation de la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques par l’axe de signalisation IL-23 – IL-17 – G-CSF (p. 9)
- ❖ Figure 3 – Mécanismes de recrutement et accumulation des monocytes au sein de la plaque (p. 13)
- ❖ Figure 4 – L’infiltration des leucocytes dans l’intima – un phénomène dynamique (p. 19)
- ❖ Figure 5 – Les récepteurs Scavengers (p. 23)
- ❖ Figure 6 – La polarisation des macrophages (p. 28)
- ❖ Figure 7 – Le cycle estérification/hydrolyse du cholestérol dans le macrophage (p. 42)
- ❖ Figure 8 – Gradient du cholestérol membranaire (p. 44)
- ❖ Figure 9 – Structure du cholestérol (p. 45)
- ❖ Figure 10 – Trafics vésiculaires et Rabs (p. 46)
- ❖ Figure 11 – Transport vésiculaire et non-vésiculaire du cholestérol dans la cellule spumeuse (p. 50)
- ❖ Figure 12 – Les radeaux lipidiques et l’efflux de cholestérol (p. 54)
- ❖ Figure 13 – Le transporteur ABCA1 (p. 59)
- ❖ Figure 14 - Le transporteur ABCG1 (p. 62)
- ❖ Figure 15 – Le recepteur SR-B1/CLA-1 (p. 65)
- ❖ Figure 16 - Le transport extracellulaire du cholestérol (p. 75)
- ❖ Figure 17 – Mécanisme d’activation des LXR dans le noyau des macrophages (p. 78)
- ❖ Figure 18 – Traitement LXR in vivo, macrophage, athéroprotection et hypertriglycémie (p. 80)
- ❖ Figure 19 – Schéma de synthèse LXR (p. 86)
- ❖ Figure 20 – De la différenciation à l’inflamtion (p. 91)
- ❖ Figure 21 - Les récepteurs TLRs et l’immunité innée (p. 94)
- ❖ Figure 22 – La voie classique d’activation de l’inflammation (p. 96)
- ❖ Figure 23 – Les voies d’activation NF-κB (p. 98)
- ❖ Figure 24 – Les inflammasomes (p. 109)
- ❖ Figure 25 – L’inflammasome NLRP3 au cours de l’athérosclérose (p. 113)
- ❖ Figure 26 – Schéma de synthèse des nouvelles voies (p. 208)
- ❖ Tableau 1 – Cellules et facteurs impliqués dans le développement de la plaque d’athérome (p. 38)
- ❖ Tableau 2 – Caractérisation des lipoprotéines humaines (p. 56)
- ❖ Tableau 3 - M1/M2, les deux phénotypes extrêmes (p. 92)
- ❖ Tableau 4 – Pyroptose, apoptose, nécrose (p. 108)
- ❖ Tableau 5 – Les cathepsines dans l’athérosclérose (p. 120)



Avant-propos

Les maladies cardio-vasculaires

Les maladies cardio-vasculaires (MCV) représentent actuellement la première cause de mortalité mondiale selon l'Organisation Mondiale de la Santé, au premier rang desquelles se trouvent les cardiopathies coronariennes ou infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux (rapport sur la situation mondiale des maladies non transmissibles 2010 ; Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Geneva: WHO; 2011.). Les prédictions ne vont pas en faveur d'une inversion de cette tendance, car elle est une conséquence directe de facteurs environnementaux actuels tels, pêle-mêle, un apport énergétique déséquilibré, le manque d'activité physique ou le tabagisme ; mais également d'une augmentation récente assez dramatique du diabète de type II, de l'obésité et du syndrome métabolique en général.

A l'origine de ce fléau se trouve l'athérosclérose, leur composante-clé. Comme l'illustre son étymologie grecque *αθηρη* « bouillie » et *σκληρος* « dur », il s'agit d'une obstruction progressive des artères par des lipides recouvertes d'une chape d'éléments fibreux, ou plaque d'athérome. Si cette dernière se forme dans des vaisseaux essentiels, tels la carotide ou les coronaires, sa rupture conduit aux accidents cliniques cités précédemment. La formation des plaques se situe au carrefour de dérégulations lipidiques, oxydatives et inflammatoires.

En effet, le cholestérol plasmatique associé aux lipoprotéines de basse densité ou LDL (Low-Density-Lipoprotein), son principal véhicule intravasculaire chez l'homme, peut pénétrer la paroi artérielle lorsqu'il est en excès. La modification des LDL dans l'intima, notamment par des mécanismes d'oxydation, conduira à leur identification et internalisation par les macrophages de la paroi issus des monocytes circulants, des cellules inflammatoires et phagocytes de l'immunité innée. La formation de cellules dites « spumeuses », macrophages gorgés de ce cholestérol présentant des propriétés oxydantes et inflammatoires, est le marqueur initial des lésions athérosclérotiques

précoces (CK Glass, JL Witztum 2001). De manière inverse, le cholestérol associé aux lipoprotéines de haute densité ou HDL (High-Density Lipoproteines) a un effet protecteur de par ses propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes (Kontush, Chapman 2006) et sa capacité à transporter le cholestérol venant des tissus périphériques tels que les macrophages de la paroi artérielle vers le foie avant son excrétion finale (Khera, Cuchel et al, 2011).

Les MCV, considérées comme « maladies non-transmissibles », représentent un enjeu économique important, particulièrement dans les pays à revenus faibles ou intermédiaires. En effet, les facteurs de risque y sont plus importants (tabagisme, alimentation) et la prévention, cruciale, moindre. Les habitants les moins aisés sont non seulement exposés à des dépenses de santé considérables mais également à une mort précoce, souvent pendant leur période active, ce qui entraîne des conséquences néfastes au niveau macro-économique sur leur pays (The global burden of disease: 2004 update. Geneva, World Health Organization, 2008).

Ainsi, différentes stratégies sont mises en l'œuvre pour réduire l'incidence des maladies cardiovasculaires sur la population. Les premières sont économiques et préventives, et vont jusqu'à concerner l'ensemble du syndrome métabolique : la lutte contre le tabagisme, la taxation des produits riches en graisses, sucres ou sel, la limitation du trafic au profit de la mise en place de pistes cyclables, favorisant l'exercice physique...

Il est également actuellement possible d'agir sur les lipides plasmatiques par une stratégie pharmacologique afin de réduire le facteur de risque « haut LDL-C ». En effet, l'administration de statines (inhibiteurs de l'HMGCoA-réductase, enzyme-clé de la synthèse du cholestérol) réduit le LDL-C de 25 à 50% et l'incidence des accidents cardiovasculaires de 20 à 40% (Ridker, Danielson et al. 2008). Cette diminution est non-négligeable mais pas satisfaisante pour autant : un risque résiduel élevé d'évènement cardiovasculaire persiste chez de nombreux patients (Cziraki, Watson et al 2008).

Depuis une dizaine d'années, les recherches explorent des stratégies d'augmentation du taux de HDL-C pour lutter contre les maladies cardio-vasculaires. Les inhibiteurs de la CETP, proposés comme candidats majeurs dans ce contexte, ont pour le moment échoué à réduire les MCV (Barter, Caulfield et al 2007). Egalement

l'analyse de polymorphismes génétiques associés à un HDL-C élevé n'a démontré aucune thérapeutique, semblant remettre en question cette stratégie (Voight, Peloso et al, 2012). L'hypothèse actuelle est que les propriétés athéroprotectrices des HDL seraient davantage dues à leur fonctionnalité et structure, paramètres indépendants de la concentration plasmatique de HDL-C.

Actuellement, l'inhibition du facteur hépatique PCSK9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) (M. Abifadel, C. Boileau, 2003), responsable de la dégradation du récepteur chargé de la recapture de LDL, suscite l'espoir de l'industrie pharmaceutique (F. Petrides, G. Lambert, 2013).

Une stratégie alternative à la régulation des concentrations de cholestérol plasmatique serait d'agir directement sur les cellules de la paroi artérielle responsables du développement de la plaque, en première ligne, les macrophages. En effet, la capacité des lipoprotéines, et principalement des HDL, à stimuler l'efflux de cholestérol de ces macrophages gorgés de lipides a été corrélée inversement avec la prévalence des MCV (Khera, Cuchel et al, 2011). Leurs fonctions inflammatoires, oxydatives et d'immunité innée seraient également directement responsables de la formation de l'athérome. De plus, les lésions doivent aussi être analysées qualitativement : leur richesse en lipides est par exemple un facteur qui augmente considérablement leur chance de rupture, cause des accidents vasculaires.

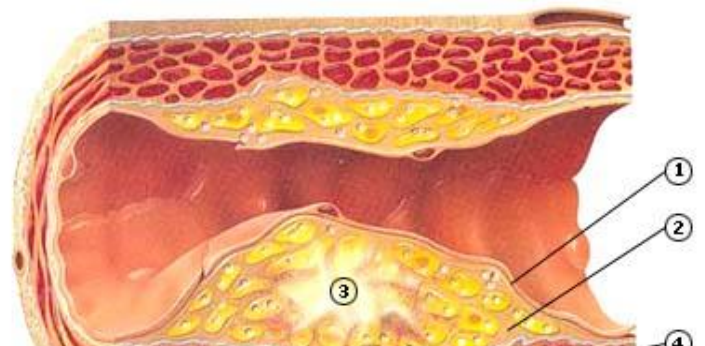
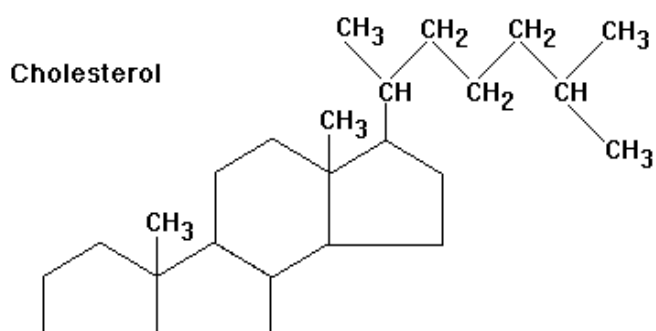
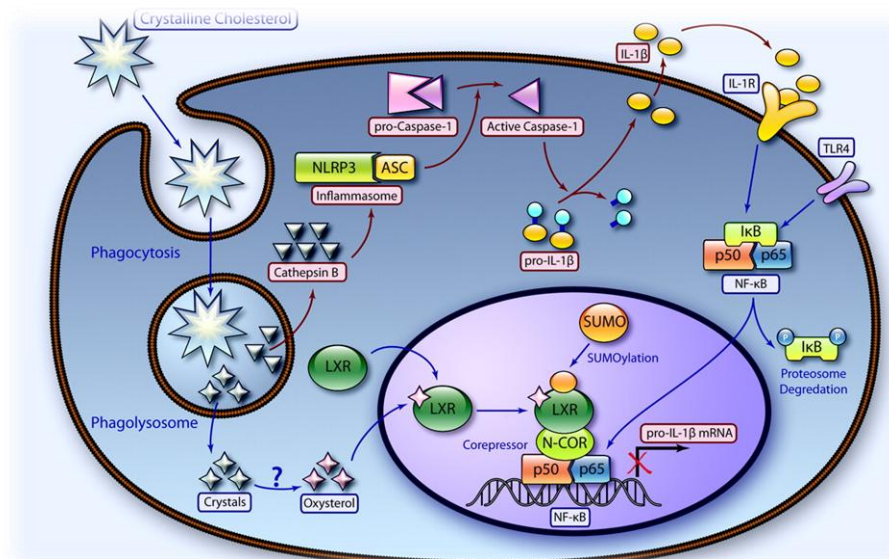
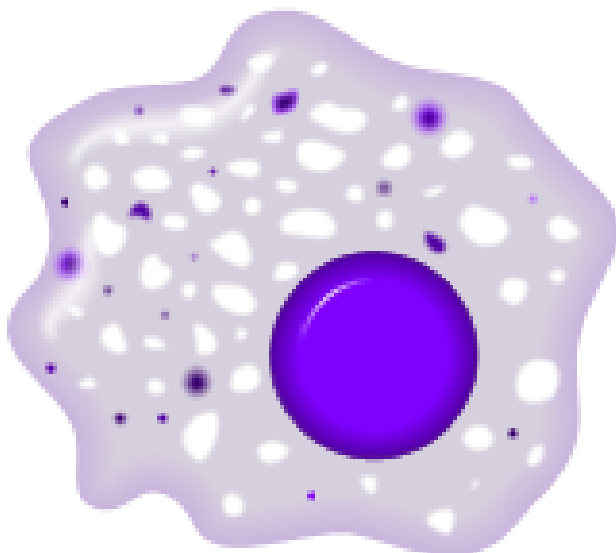
Dans ce contexte, il est également prometteur d'identifier des cibles moléculaires spécifiques aux macrophages humains afin de lutter contre la formation de l'athérosclérose dès le stade précoce de la maladie. Notamment, les agonistes des récepteurs LXR ont été proposées comme cibles thérapeutiques potentielles, dans le cadre de la stimulation de l'export du cholestérol mais aussi de la régulation de l'inflammation (Erik G Lund, Carl P Sparrow, 2003). Cette fonction inflammatoire et d'immunité innée du macrophage est également sujette de nombreuses études, puisque nombre de cytokines ont des propriétés pro-athérogènes chez divers modèles animaux (Aït Oufella, Mallat 2010).

Ainsi, l'objectif général de mon travail de recherche a été d'identifier de nouvelles voies de régulation de l'homéostasie lipidique et de l'inflammation dans le macrophage humain encore peu connues, et jouant un rôle potentiellement important dans la formation ou la régression de la plaque d'athérome ; dans le cadre d'une thérapie visant

exclusivement les macrophages de la paroi artérielle. L'essentiel des études menées à ce
a en effet été réalisé dans des modèles murins.

© Random42 2011

Introduction Bibliographique



Ⅲ. Macrophage & Athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie qui se développe tout au long de la vie de l'individu de manière silencieuse, jusqu'à ce que l'obstruction d'une artère essentielle par un thrombus se produise. Il existe une classification histologique des plaques d'athérome, basée sur des observations anatomopathologiques, où l'on dénombre 6 à 8 stades, élaborée par H. Stary et approuvée par l'American Heart Association en 2000 (Stary, ATVB 2000). Cependant on retient globalement 3 stades principaux : la strie lipidique, la lésion précoce et la lésion avancée. (Ross, Ann Rev Physio, 1995) (Figure 1, 1bis). Aujourd'hui l'athérosclérose est considérée comme une pathologie complexe au carrefour d'altérations lipidiques, oxydatives et inflammatoires. Son développement est causé par une réponse immunitaire conduisant à la rétention de lipoprotéines riches en cholestérol dans la paroi des vaisseaux sanguins.

A. L'initiation de l'athérosclérose

La pénétration des LDL, lipoprotéines athérogènes transportant le cholestérol, dans l'endothélium des artères est l'évènement initial de la formation des lésions et l'hypercholestérolémie, associée à une hausse du taux de ces LDL dans le plasma, représente un facteur de risque majeur responsable du développement de la maladie

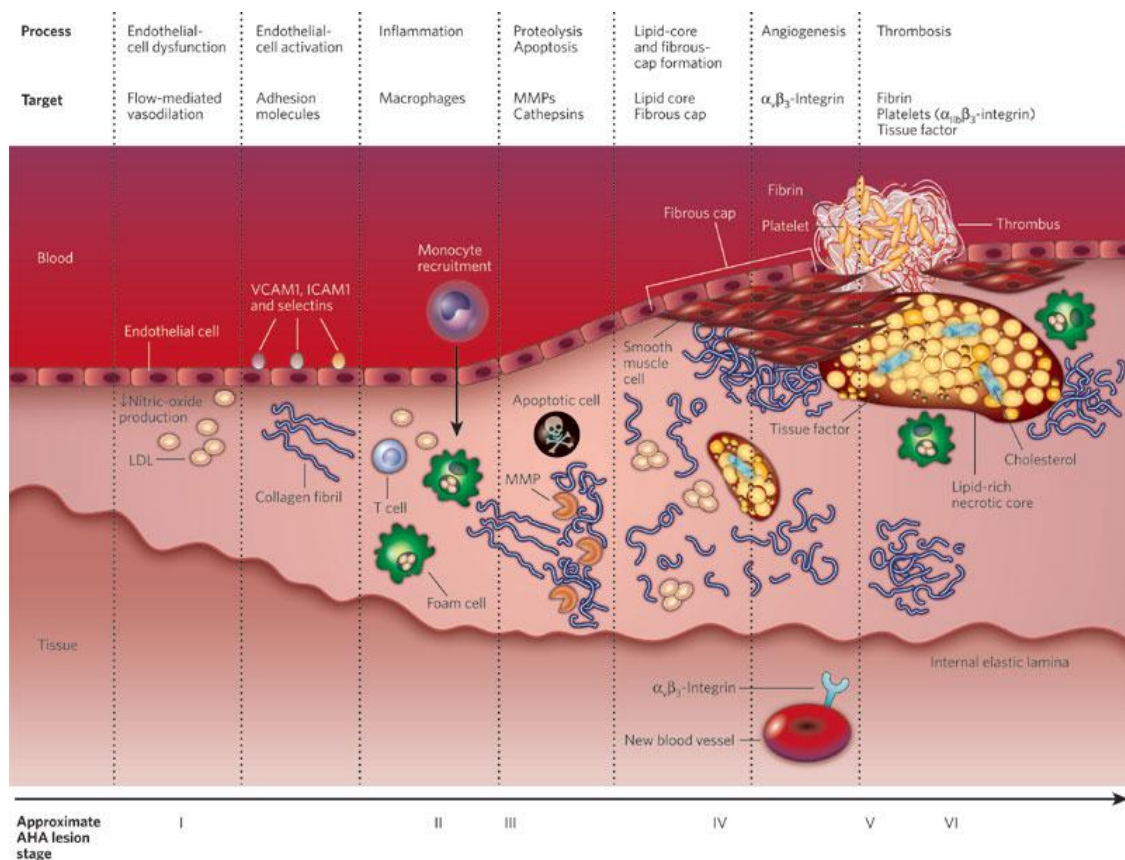


Figure 1 – Classification histologique des stades de développement d’une lésion d’athérosclérose (Sanz, Nature 2008)

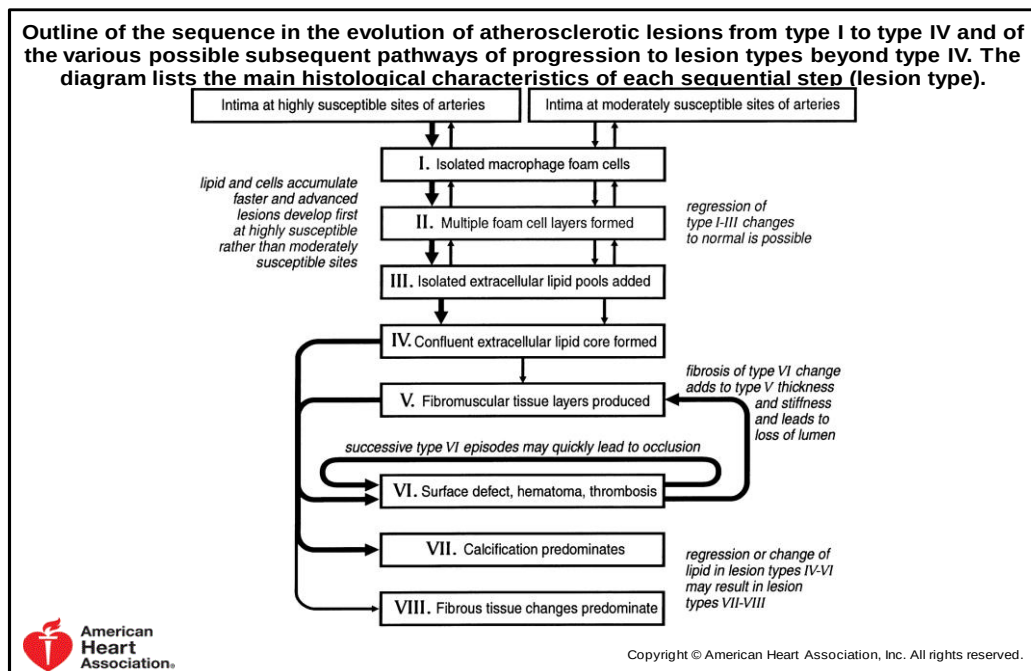


Figure 1bis – Description des stades de développement d’une lésion d’athérosclérose

(Stary, ATVB 2000)

1. Hypercholestérolémie, monocytes et neutrophiles

a) Neutrophiles, monocytes et athérosclérose

Les désordres lipidiques et inflammatoires sont deux piliers de la pathogenèse de l’athérosclérose et sont intrinsèquement liés. En effet, l’hypercholestérolémie affecte le phénotype des leucocytes : des études chez la souris (Swirski FK et al, JCI 2007 ; Drechsler M. et al, Circ 2010) et chez l’homme (Tani S et al, Am J Cardiology 2009) l’ont positivement corrélée à une augmentation du nombre de cellules myéloïdes circulantes, les monocytes et les neutrophiles.

Les neutrophiles, quasiment absents dans la plaque, jouent néanmoins un rôle important dans l’initiation de la formation de celle-ci (Soehnlein O., Circ res 2012). Des études récentes démontrent qu’ils sont impliqués dans le recrutement des monocytes au sein de la plaque (Döring Y. et al, Circ Res 2012), l’activation des cellules présentatrices d’antigène (Döring Y. et al, Circ 2012) et dans l’activation de l’endothélium des vaisseaux (Soehnlein O. et al, Circ res 2012). Les mécanismes sous-jacents sont encore mal définis.

Les monocytes circulants sont les précurseurs des macrophages, leucocytes responsables de la formation de la plaque. Ils sont séparés en sous-populations, en fonction des marqueurs de surface qu’ils expriment. On distingue :

- Les monocytes CD14⁺CD16⁻ (chez l’humain) ou Ly-6C^{high} (chez la souris), ou monocytes « classiques », sont plus nombreux (80 – 85% chez l’humain) et inflammatoires. Leur migration dépend de la chimiokine CCL2/MCP-1 exprimée par les macrophages.
- Les monocytes CD14⁺CD16⁺⁺ (chez l’humain) ou Ly-6C^{low} (chez la souris), ou monocytes « non-classiques », résidents ou « patrouilleurs », ont un rôle réparateur et résolvent l’inflammation, mais sont pourtant impliqués dans le développement de la plaque également. Leur migration dépend de la fractalkine, et de son récepteur CX₃CR1 présente sur les cellules endothéliales activées.

- Les monocytes CD14⁺⁺CD16⁺ ou « intermédiaires » ont été décrits chez l'humain. Ils expriment Tie2, protéine impliquée dans l'angiogénèse. Ils sont positivement corrélés à la survenue des MCV chez l'homme (Rogacev KC. Et al, J Am Coll Cardiol 2012)

(Shantsila E et al, J Thromb Haemost 2011) (Ghattas et al, J Am Coll Cardio 2013)

Seuls les monocytes Ly-6C^{high}, chez la souris, sont augmentés par l'hypercholestérolémie et sont responsables la formation de la plaque : ce sont eux qui infiltreront la paroi des vaisseaux et, une fois différenciés en macrophages, initieront le développement de la plaque (Swirski FK et al, JCI 2007).

Le mécanisme liant l'hypercholestérolémie et l'inflammation chez la souris et l'humain n'est toujours pas décrit précisément, mais plusieurs études récentes ont tenté d'en comprendre les mécanismes.

b) Les cellules souches hématopoïétiques

Ces études soutiennent l'hypothèse d'une augmentation de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques, via différentes voies de signalisation.

Chez la souris, il a été démontré que l'augmentation du cholestérol à la membrane des cellules souches hématopoïétiques, causée naturellement par une hypercholestérolémie ou artificiellement par la délétion ciblée des transporteurs ABCA1 et ABCG1, qui permettent d'éliminer le cholestérol de cette membrane, augmente leur prolifération (Yvan-Charvet et al, Science, 2010). Les radeaux lipidiques, domaines de la membrane plasmique spécialisés riches en sphingolipides et en cholestérol, seraient plus nombreux, augmentant l'expression à la surface membranaire présentant des récepteurs à l'interleukine-3 et au GM-CSF, dont l'activation est responsable de la prolifération et est corrélée à la monocytose et à l'infiltration des macrophages dans la plaque (Wang M et al, ATVB 2014).

Chez l'humain, une étude clinique chez des patients traités ou non par des statines montre une corrélation positive entre les taux de cholestérol et de LDL plasmatiques, les taux circulants de cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ et les taux circulant d'interleukine-17 et de G-CSF (granulocyte colony stimulating factor). L'exposition des cellules souches aux LDL augmente l'expression de gènes liés à la réception du signal de

2. Le Stress Endothélial

La paroi des artères est constituée de trois couches cellulaires différentes, respectivement en allant de la lumière vers l'extérieur, l'intima, la média et l'adventice. C'est dans l'intima que s'initiera la formation de la lésion. La couche de cellules endothéliales protégeant la paroi de l'artère du flux sanguin ou endothélium vasculaire a un rôle important dans cette initiation.

a) Shear stress et perméabilité de l'endothélium

Les plaques d'athéromes ne sont pas distribuées uniformément dans l'ensemble des vaisseaux mais ont davantage tendance à se former dans les zones de bifurcation et d'embranchement des artères. Ceci est dû aux contraintes de cisaillement du flux hémodynamique, ou « shear stress », qui agit sur l'endothélium des vaisseaux comme une contrainte mécanique. Des études de transcriptome ont été menées sur des endothéliums exposés à un fort shear stress comparés à des endothélium protégés de celui-ci (Passerini AG et al, Proc Natl Acad Sci USA 2004), prélevés dans des artères de porc.

Les cellules endothéliales exposées aux contraintes de cisaillement « shear stress » ont un profil favorisant l'initiation du développement de la plaque :

- elles présentent un stress du réticulum endoplasmique (RE). Cet état cellulaire intervient en réponse à une synthèse excessive de protéines saturant le RE. La transcription coordonnée de protéines chaperonnes, enzymes repliant et assemblant les peptides correctement, est activée afin de prévenir l'agrégation de protéines mal repliées dans la cellule ; cette réponse est appelée UPR (unfolded protein response). Lorsque l'UPR est insuffisante, le stress du RE peut déclencher l'apoptose cellulaire (Rutkowski DT. Et al, Trends Biochem Sci 2007). Les gènes impliqués dans la gestion de ce stress et l'UPR sont les plus activés dans les régions de « shear stress » : notamment les gènes *IRE1α* (inositol requiring kinase 1α), *XBP1* (X-box binding protein 1), *ATF4* (activating transcription factor 4) et *ATF6α* (activating transcription factor 6α) sont exprimés davantage. Ils codent pour des

protéines de la membrane du RE qui, en cas de stress de ce dernier, vont être transloquées dans le noyau pour activer le promoteur spécifique des gènes de l'UPR (Civelek M. et al, Circ res 2009).

- l'enzyme responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique NO par l'endothélium, eNOS (endothelial nitric oxide synthase), subit une phosphorylation inactivatrice dans les zones de shear stress par l'enzyme PYK2. Il y a donc une chute de la production de NO, facteur maintenant l'homéostasie de l'endothélium, vasodilatateur et athéroprotecteur (Fisslthaler B et al., Circ Res 2008)
- il y a une légère augmentation du niveau d'inflammation, insuffisante pour réellement activer l'endothélium. IκB, qui séquestre le facteur de transcription NF-κB responsable de l'activation de l'inflammation, est moins actif dans les zones subissant un « shear stress ». (Hajra L. et al, Proc Natl Acad Sci 2000). Ces zones seront donc plus sensibles aux stimuli inflammatoires.
- l'endothélium est plus perméable, en conséquence de l'action du shear stress sur la stabilité des jonctions (Davies PF. Proc Natl Acad Sci 1986), par exemple en annulant l'induction de la Connexin-37 par le Krüppel-like factor 2 (KPL2), protecteur (Pfenniger A., J Mol Cell Cardiol 2012)
- la dynamique d'immuno-surveillance des monocytes dans les zones exposées est augmentée, ce qui augmente le nombre de ces cellules au contact des potentielles stries lipidiques récemment formées (Ogunirade, Ann Biomed Eng 2002)

L'hypercholestérolémie, en plus d'augmenter également le nombre de monocytes « inflammatoires » circulants, va également augmenter la perméabilité de l'endothélium en activant indirectement une kinase, RhoA/Rho, qui va phosphoryler les occludines, jonctions cellule-cellule de l'endothélium (Van Nieuw Amerongen GP. Et al, Circulation 2000). Alliée aux modifications induites par le shear stress, l'hypercholestérolémie chronique va promouvoir une internalisation des lipoprotéines dans l'intima et leur accumulation. Le point de départ de la formation de la strie lipidique sera l'activation de l'endothélium, en réponse à l'accumulation excessive de lipides dans l'intima, et l'expression des molécules d'adhésion des leucocytes par celui-ci

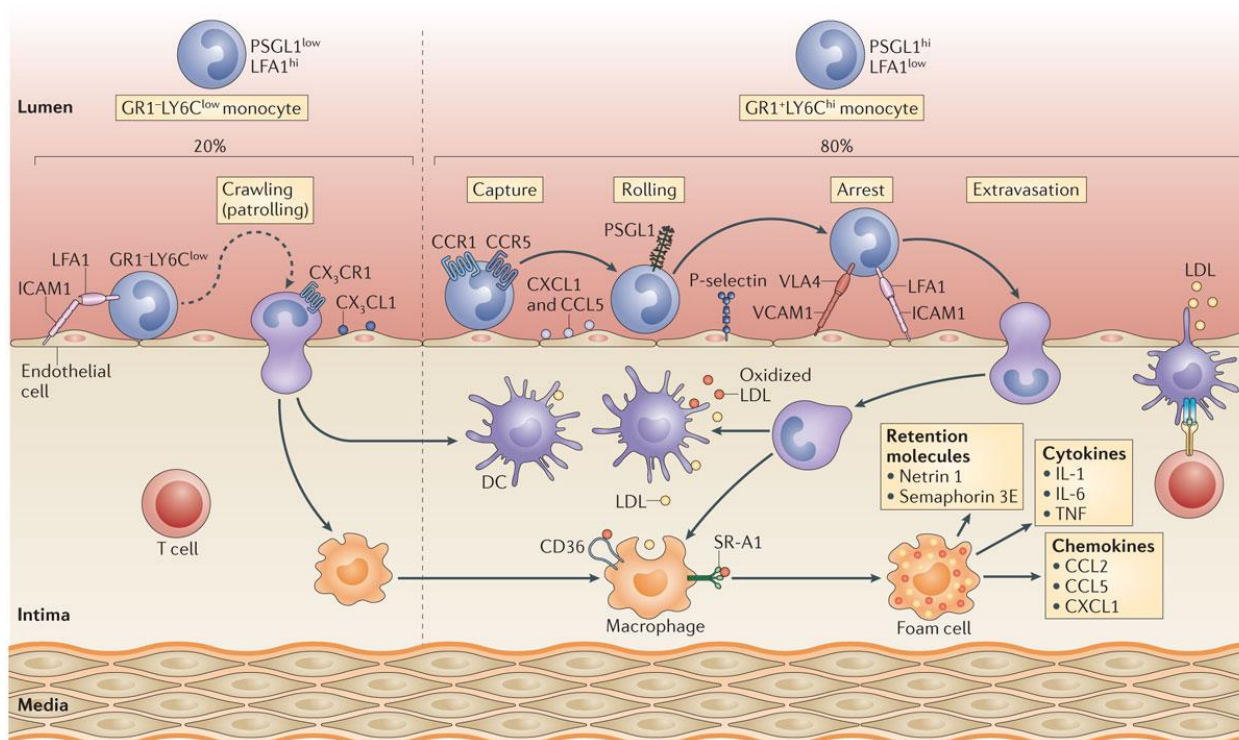
b) Activation de l'endothélium

Elle est nécessaire pour le recrutement des monocytes circulants dans les sites d'inflammation, et c'est la première étape de la formation de la plaque d'athérome. Ce processus est indépendant des monocytes et dépend exclusivement de mécanismes propres aux cellules endothéliales, appelés cascade d'adhésion des leucocytes. Ce mécanisme, largement étudié et décrit, peut-être décomposé en plusieurs étapes illustrées [Figure 3](#) (Ley K. et al, *Nature Rev Immunol* 2007).

Les monocytes sont attirés sur les sites d'intérêt de l'endothélium en réponse à la sécrétion de chimiokines, molécules chemoattractantes, par ce dernier. En effet, à la surface des monocytes se trouvent des récepteurs à ces chimiokines, les CCR ou CXCR (C-C ou CXC chemokine receptor respectivement) liant les chimiokines elles-mêmes CCL ou CXCL (C-C ou CXC chemokine ligand). Une étude récente chez la souris décrit le rôle des récepteurs CCR1 et CCR5 des monocytes et des chimiokines CXCL1 et CCL5 dans le recrutement des monocytes « classiques » au niveau des plaques. Ces chimiokines se trouvent au pôle luminal de la membrane des cellules endothéliales sur les glycosaminoglycanes et les P-selectines (Soehnlein O. et al, *EMBO Mol Med* 2013). Le couple CCR2/CCL2 (ou MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1) est bien décrit et crucial dans le recrutement des monocytes lors de l'inflammation (Serbina NV. et al, *Nat Immunol* 2006) : une fois activées, les cellules endothéliales sécréteront également CCL2/MCP-1.

L'étape du « rolling » est un phénomène complexe médié par de nombreux facteurs. L'adhésion aux selectines sur la membrane des cellules endothéliales dépend de ligands glycosylés, tels que PSGL1 (P-selectine glycoprotein-1) (McEver R. et al, *J Clin Invest* 1997). Mais la véritable limite de l'activation de l'endothélium, est l'expression à la surface de ses cellules des molécules d'adhésion VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) et ICAM-1 (intracellular cell adhesion molecule). Leur mode de fonctionnement a été très bien décrit : elles se lient aux intégrines présentes sur la membrane des monocytes, respectivement les intégrines $\beta 1 / \alpha 4 \beta 1$ (ou VLA4, very late antigen 4) pour VCAM-1 et les intégrines $\beta 2$ LFA1 (lymphocyte-function associated antigen 1) et Mac-1 (CD11a/CD18 et CD11b/CD18) pour ICAM-1. Les monocytes Ly-6C^{low}, chez la souris, expriment plus LFA1 que les monocytes Ly-

6C^{high} : ils ne pénètrent pourtant pas davantage l'endothélium. Ceci démontre qu'ICAM-1 et VCAM-1 sont impliquées spécifiquement dans la liaison des monocytes à ce dernier (Geissmann F. et al, Immunity 2003). Chez des souris développant de l'athérosclérose, le blocage ou l'invalidation de ces molécules d'adhésion diminue significativement le développement des plaques d'athérome (Patel S. et al, Circulation 1998 ; Nageh M. et al, ATVB 1997).



Nature Reviews | Immunology

Figure 3 – Mécanismes de recrutement et accumulation des monocytes au sein de la plaque (Moore KJ. Et al, Nat Rev Immuno 2013)

Les monocytes circulants vont être attirés à l'endroit de la dysfonction endothéliale par l'interaction chimiokines/récepteurs, puis vont « rouler » et adhérer fermement sur l'endothélium par l'interaction avec les ICAM-1/V-CAM-1 endothéliales, et transmigration dans l'intima où ils se différencieront en macrophages. La présence de lipoprotéines athérogènes modifiées et de cellules immunitaires intimaux vont amplifier ce phénomène en induisant toujours davantage de stress endothélial.

Les mécanismes chez l'humain sont également en cours d'investigation, grâce à des modèles in vitro de cultures primaires de cellules endothéliales. Un système de filtre permet de quantifier l'adhésion et la migration transendothéliale d'autres cellules sous différentes conditions, incluant un shear stress. Une étude récente a souligné l'importance de la Junctional Adhesion Molecule-A (JAM-A) dans la transmigration des monocytes et lymphocytes T au travers d'un endothelium sous tension de lipoprotéines oxydées, soit un environnement très athérogène (Schmitt MMN. Et al, Atherosclerosis 2014).

3. L'infiltration des leucocytes

a) Chimiokines et Transmigration

Cette étape déjà bien décrite est dépendante également de la sécrétion de chimiokines par les cellules endothéliales activées, mais également par les leucocytes, macrophages principalement, présents dans l'intima et ayant déjà traversé l'endothélium vasculaire. Dans les phases plus avancées du développement de la plaque, ce phénomène s'auto-amplifie puisque de plus en plus de cellules sont recrutées. Lors de l'initiation de la plaque, les monocytes mais aussi d'autres types de leucocytes détaillés ci-devant vont infiltrer l'intima des artères.

Une étude chez la souris utilise un marquage permettant de tracer les différentes populations de monocytes et leur réponse aux chimiokines. Ainsi, la transmigration des monocytes classiques Ly-6C^{high}, majoritaire, dépend largement des récepteurs CCR2 et CCR5 mais aussi de CX₃CR1, exprimé plus faiblement, alors que les monocytes Ly-6C^{low} CX₃CR1^{high} ne semblent trans migrer que via l'axe CCL5/CCR1/5 (Tacke F. et al, JCI 2007). Le rôle prépondérant de ces 3 cytokines dans ce mécanisme a été démontré chez la souris (Combadière C et al., Circulation 2008), même l'implication d'autres voies est actuellement étudiée, telle que celle de la voie CXCL4-CCL5 ou MIF (migration inhibition factor) (Zernecke A. et al, ATVB 2014).

La majeure partie des études ont été réalisées chez les modèle de souris Apolipoprotéine E-déficientes ($\text{apoE}^{-/-}$) et LDL-récepteur-déficientes ($\text{LDLR}^{-/-}$) développant spontanément l'athérosclérose, et la transposition de ces résultats chez l'homme est difficile. Le rôle prépondérant de CCL5 dans l'athérosclérose par exemple a été confirmé par une étude de polymorphisme (Boger CA. Et al, Atherosclerosis 2005 ; Simeoni E. et al, Eur Hearth J 2004) et des études cliniques visant à bloquer les chimiokines CCL2 (Gilbert J. et al, Am J Cario 2011) et CCL5 (Cipriani S. et al, Circulation 2013) pour diminuer les MCV sont en cours. Enfin, il sera très difficile d'utiliser le taux circulant de ces chimiokines, difficile à détecter et peu stables (Aukrust P. et al, Thromb Haemost 2007) comme biomarqueur de risque cardiovasculaire.

b) Les leucocytes de la plaque

Le rôle clé du macrophage dans le développement de l'athérosclérose a été démontré clairement il y a plusieurs années par plusieurs études *in vivo*. Une étude portant sur des souris $\text{apoE}^{-/-}$ présentant une délétion du M-CSF, facteur de croissance responsable de la différenciation des macrophages. Ces souris $\text{apoE}^{-/-}\text{M-CSF}^{-/-}$ n'ont quasiment aucun monocyte et macrophage circulant ou résident et présentent des lésions d'athérome drastiquement réduites lorsque comparées à celles de souris $\text{apoE}^{-/-}$ contrôle. Ceci souligne l'importance capitale de l'accumulation des macrophages dans l'intima des vaisseaux pour le développement de la plaque d'athérosclérose (Smith JD, Miyata M, PNAS 1997). Egalement, les souris $\text{apoE}^{-/-}/\text{MCP-1}^{-/-}$ développent beaucoup moins de lésions d'athérome que des souris $\text{apoE}^{-/-}$ (Boring L, Charo IF, Nature 1998). Enfin, $\text{CX}_3\text{CR1}$ a également a été muté dans les souris $\text{apoE}^{-/-}$, résultant en une forte diminution du nombre de monocytes recrutés au niveau de la lésion ainsi que de la taille de celle-ci, en comparaison avec des souris apoE simples (Lesnik P, Charo IM, JCI 2003). Le macrophage est en effet impliqué dans toutes les grandes fonctions biologiques participant à la formation de la plaque (et donc potentiellement à sa régression) : l'homéostasie lipidique, l'inflammation, l'oxydation, et la phagocytose de cellules apoptotique ou efferocytose. (Moore, Fisher, Nature Rev Immuno 2013).

Des études se sont intéressées au rôle d'autres leucocytes dans la formation de l'athérome, notamment des lymphocytes T, cellules de l'immunité adaptative. Les T CD4⁺ de profil Th1 représentent la population majeure de ces cellules dans la plaque. Ils sont les initiateurs de la réponse pro-inflammatoire en sécrétant des cytokines pro inflammatoires, notamment l'interféron γ (IFN γ) polarisant les macrophages naïfs en macrophages pro inflammatoires (M1). Les souris apoE^{-/-} déficientes pour le principal facteur de différenciation des lymphocytes Th1 T-bet développent moins d'athérosclérose (Buono C. et al, Proc Natl Acad Sci 2005). L'inactivation de IFN γ la réduit également (Aït Oufella H. et al, ATVB 2011). Le rôle de la polarisation des macrophages sera détaillé plus loin.

Les cellules dendritiques (DCs), des cellules présentatrices d'antigène (CPA) présentant nombre des caractéristiques des macrophages ont également été étudiées récemment. Elles ont un rôle prépondérant dans l'activation des lymphocytes, en particulier Th1 de par leur rôle de présentation d'antigène, au travers du major histocompatibility complex-II (MHC-II), ainsi que par leur sécrétion d'IL-12 (Steinman, RM. Et al, Annu Rev Immunol 2012). Des études démontrent cependant que leur déplétion chez la souris augmente le cholestérol circulant mais n'a pas d'impact sur les lésions d'athérome, et qu'à l'inverse l'augmentation de leur survie grâce à l'expression constitutive de l'anti apoptotique Bcl2 diminue le taux de cholestérol circulant (Gautier EL. Et al, Circulation 2009 ; Shearn A. et al, ATVB 2012). En effet, les DCs forment également des cellules spumeuses dans l'intima (Paulson KE. Et al, Circ Res 2010). L'hypothèse serait une double action des cellules dendritiques : une pro-athérogénique via l'activation des lymphocytes T et une anti-athérogénique sur la cholestérolémie qui se compenseraient. Cependant ces régulations semblent bien plus complexes. De nombreuses populations, hétérogènes fonctionnellement, de DCs ont été identifiées récemment et les mécanismes exacts toujours sous investigation (Zernecke A., Scientifica 2014).

Les lymphocyte B sont également actuellement candidats pour la formation de la plaque d'athérome, et ont été identifiés dans celle-ci à différents stades chez la souris (Doran AC. Et al, Circ Res 2012) et dans les lésions avancées uniquement chez l'homme (Aubry MC. Et al, Cardiovasc Path 2004). Plusieurs populations hétérogènes fonctionnellement ont été décrites. Beaucoup d'études se focalisent sur leur rôle dans la sécrétion d'anticorps anti-LDL_{ox}. Le lymphocyte B1a sont athéroprotecteurs via la sécrétion d'immunoglobulines M (IgM)

anti-LDLox, et les lymphocytes B2 sont pro-athérogènes via la stimulation de l'axe DCs/lymphocyte T et la polarisation Th1 de ces même cellules.

Enfin, les neutrophiles sont présents en très faible quantité dans la plaque, mais ont un rôle important en circulant dans l'initiation de la formation de celle-ci, comme décrit précédemment (IA1).

c) Un processus dynamique

L'infiltration des monocytes/macrophages dans l'intima des vaisseaux n'est pas le seul processus qui gouverne la formation de la plaque d'athérome. De plus en plus d'études démontrent qu'il s'agit en réalité d'une cinétique d'infiltration de cellules dans l'intima gouvernée par des facteurs multipolaires (Moore KJ. Et al, Nat Rev 2013).

- une balance infiltration / sortie des monocytes
- une balance survie/apoptose de ces cellules, plus importante dans les stades avancés.

Récemment, les molécules de la famille des nétrines, sémaphorines et ephrines, normalement impliquées dans la guidance des circuits neuronaux mais également exprimées par les cellules endothéliales de l'artère ont été étudiées. Leur rôle dans cet équilibre entrée/sortie des monocytes a été démontré et suscite l'intérêt grandissant de la communauté scientifique. Leur expression est en effet modulée dans des conditions promouvant l'athérosclérose. Par exemple, l'éphrine B2, qui mime l'effet de chimiokines en leur absence et promeut le recrutement des leucocytes, est plus exprimée dans des conditions athérogènes ; en revanche, la netrin1 et la semaphorin3A , inhibitrices de la signalisation chimiokine et de l'égression de macrophages, voient leur expression diminuée dans les régions sous stimuli athérogènes. L'inactivation de la netrin1 spécifiquement dans les lignées myéloïdes de souris LDLr^{-/-} diminue ainsi la formation de plaques (van Gils JM. Et al, Nat Immunol 2012). L'analyse de plaques d'athérome humaines et de modèles in vitro a confirmé l'implication de ces facteurs de guidance neuronale dans l'infiltration des leucocytes dans la plaque d'athérome (van Gils JM. Et al, ATVB 2013). Depuis ces études, de nombreux autres membres de ces familles sont étudiés (Funk SD et al, Pharmacol Res 2012) et

si les résultats sont prometteurs, ces facteurs ont plus certainement un rôle additionnel dans la régulation de la cinétique d'entrée des leucocytes dans la plaque.

En raison de leur potentiel thérapeutique, les mécanismes de stimulation de l'égression des leucocytes de l'intima et donc de la plaque ont été également étudiés. En particulier, le récepteur aux chimiokines CCL19 et CCL21, CCR7, présent à la membrane des macrophages, monocytes, DCs et lymphocytes T suscite un intérêt. En effet, son absence inhibe la régression de la plaque dans plusieurs modèles (Feig JE. Et al, Proc Natl Acad Sci USA 2011 ; Feig JE. Et al, PLoS One 2011), et son inactivation spécifique dans les moëlls osseuses de la souris apoE^{-/-} augmente la taille des lésions de manière importante (Wan W. et al, Cardiovasc res 2013) . La conclusion quant à son rôle précis dans le développement de l'athérome est toujours discuté, puisqu'un résultat inverse est observé chez des souris LDLr^{-/-} CCR7^{-/-} (Luchtefeld M. et al, Circulation 2010). En effet, CCR7 aurait également un rôle dans le recrutement des lymphocytes T par les DCs (Schieffer B et al, TCM 2011) qui rendrait son potentiel anti athérogène via la migration des cellules hors de la plaque plus difficile à établir.

Enfin, l'inhibition pharmacologique du récepteur CX3CR1 est présentée comme une potentielle thérapie visant à diminuer la monocytose et l'infiltration dans la plaque (Poupel L. et al, ATVB 2013). Des études démontrent clairement le rôle proathérogénique de l'axe CX₃CR1/CX₃CL1 dans le développement de lésion (Lesnik P et al, JCI 2003 ; Martínez-Hervás S. et al, Cardiovasc Res Adv 2014). De plus, la fractalkine CX₃CL1 a des effets cytotoxiques sur l'endothélium par le recrutement d'autres leucocytes (Nishimura M. et al, J Immunol 2002) et induit la prolifération des cellules musculaires lisses (White GE. Et al, Cardiovasc res 2010).

L'initiation de l'athérosclérose par le recrutement des monocytes est donc un phénomène complexe, dont les 3 étapes (attraction, attachement et transmigration) font intervenir un grand nombre de facteurs.

Les conditions préalables, une hypercholestérolémie associée à un « shear stress », étant réunies, l'activation des cellules endothéliales, indépendamment des autres cellules, sera le vrai premier pas de la formation de la plaque. Les facteurs exprimés par ces dernières vont promouvoir une inflammation locale, responsable de l'entrée de différentes populations de leucocytes - en grande majorité de monocytes se différenciant ainsi en macrophages - et de lipoprotéines dans l'intima.



19

inflammatoire, a été mise en évidence récemment et est peu importante. La cellule-clé du développement de l'athérosclérose reste le macrophage.

B. De la strie lipidique à la liaison précoce

L'ingestion de lipoprotéines natives mais surtout modifiées par les macrophages dans l'intima est le premier évènement pathogène de la formation de la plaque d'athérome. On parlera dès lors de « strie lipidique », pouvant se développer dès les 10 premières années de la vie, cette dernière étant réversible. C'est de plus à ce niveau là que se focalisera notre étude. La modification en profondeur de l'environnement sous-endothélial ainsi que le recrutement de nouveaux acteurs musculaires et fibrotiques feront progresser la maladie et la strie lipidique vers un phénotype « lésion fibro-lipique » beaucoup plus difficile dès lors à faire régresser.

1. Formation des cellules spumeuses

a) Infiltration des lipoprotéines

Les lipoprotéines LDL ayant infiltré l'intima artériel ne restent pas telles quelles. Elles vont subir diverses modifications, en partie à cause de leur environnement, qui leur feront développer des propriétés inflammatoires et oxydatives athérogènes. Ces mécanismes de modification des LDL ont été étudiés en détail depuis leur découverte en 1979 (Henriksen T. et al, Scand J Clin Lab Invest 1979).

Une étude démontre ensuite que l'incubation de LDL avec des cellules endothéliales les modifie et les rend reconnaissable par un récepteur aux LDL acétylées de macrophages : les LDL pourraient s'acétyler in vivo quand exposées à des cellules endothéliales elle-même subissant un shear stress (Henriksen T. et al, Proc Natl Acad Sci 1981). Mais la liaison à ce récepteur était incomplète et il fut difficile de détecter des LDL acétylées (LDLac) in vivo : en 1983 une étude de la Cleveland Clinic démontra que le stress oxydatif est responsable de la conversion des LDL en leur forme cytotoxiques, les LDL oxydées (LDLox) (Morel DW. Et al, J Lipid Res 1983). Cette modification a été décrite bien plus en détail depuis et est responsable

du déclenchement de l'inflammation et de l'internalisation dérégulée de lipoprotéines par le macrophage, notamment à cause de la présence d'épitopes reconnus par l'immunité innée à la surface des LDLox (Leibundgut G et al, Curr Opin Pharmacol 2013). Les cellules endothéliales, par plusieurs mécanismes dont l'origine est la baisse de la synthèse de NO, antioxydant, présentent une dérégulation de leur balance redox et vont sécréter des espèces réactives de l'oxygène ROS, notamment de l'anion superoxyde. Ces molécules sont à l'origine de l'oxydation des LDL, en ciblant leurs acides gras polyinsaturés (péroxidation des lipides) et leur composante protéique, l'apolipoprotéine B100 (Arai H., Subcell Biochem 2014). Chez l'homme, la théorie « oxydative » de l'athérosclérose a été validée, puisqu'on détecte des LDLox dans les plaques d'athéromes, des anticorps anti-LDLox dans la circulation et que la susceptibilité à l'oxydation des LDL et l'incidence de l'athérosclérose sont corrélées (Witztum JL. Et al, Trends Cardiovasc Med, 2001).

En grande quantité dans l'intima, les LDL s'aggrègent, et ont ainsi une plus forte atherogénicité que de simples LDL isolées car elles sont internalisées en grand nombre via plusieurs mécanismes (Kruth HS., Curr Opin Lipido 2002). Ce procédé est dû à l'interaction avec certaines glycoprotéines de la matrice extracellulaire retenant les lipoprotéines et par l'action d'enzymes de la famille des phospholipases sécrétées de type A2 (PLA2) (Oorni K. et al, Curr Opin Lipidol 2009), dont les taux circulants sont corrélés avec le risque de CVD chez l'Homme (Lind L. et al, Eur Heart J 2012)

Enfin, beaucoup plus récemment, il a été démontré que le cholestérol est présent dans l'intima des artères sous forme de cristaux : une étude chez la souris LDL-r^{-/-} détecte des cristaux de cholestérol par réflexion dans les zones sous-endothéliales, en extracellulaire, aussi tôt que 2 semaines après le début du régime athérogène et dans les macrophages de la plaque. Egalement, des cristaux ont été identifiés dans les plaques d'athérosclérose humaines, au niveau des zones riches en leucocytes (Duwell P. et al, Nature 2011). Une partie de cette étude détaille plus avant le mécanisme d'action de ces cristaux sur les macrophages de la plaque d'athérome.

b) L'internalisation du cholestérol

En conditions normolipidémiques, le LDLr lie et internalise les lipoprotéines contenant de l'apoB via l'endocytose ; il est exprimé par les hépatocytes du foie, où son rôle, majeur dans la régulation du taux des LDL et l'excrétion du cholestérol, est, hier, aujourd'hui et probablement demain, au centre de l'intérêt de la communauté scientifique et médicale. Cependant, s'il est également exprimé par le macrophage, il a un rôle dans l'initiation de l'athérosclérose et l'accumulation du cholestérol intracellulaire ; une transplantation de moëlle osseuse LDLr^{+/+} chez des souris LDLr^{-/-} n'a pas d'effet sur le développement de la plaque (Linton MF. Et al, J Biol Chem 1999). En effet son expression à la membrane est soumise à un rétrocontrôle via SREBP2/INSIG/SCAP et est rapidement inactivée dès que la concentration de cholestérol intracellulaire augmente. Ce mécanisme, décrit en détail par Brown et Goldstein, leur a valu le prix Nobel de Médecine en 1985 (Brown MS. Et al, Cell 1997).

Les lipoprotéines modifiées sont perçues par les macrophages comme des signaux de « dommages » (DAMPs ou « damage associated molecule pattern ») et reconnues par des récepteurs spécialisés, ou PRRs (« pattern recognition receptors »), les récepteurs « éboueurs » ou Scavenger.

Ces récepteurs ont été identifiés dans les années 90 pour la première fois (Endemann G. et al, J Biol Chem 1993 ; Acton SL. Et al, J Biol Chem 1994, Freeman MW., Curr Opin Hematol 1997), comme liant les LDLox spécifiquement, et une famille entière de molécules hétérogènes structurellement a rapidement été décrite suivant cette découverte (Figure 5). Leur rôle est d'éliminer les ligands du soi non-désirés par endocytose ; le ligand est acheminé dans le lysosome puis dégradé, et le récepteur est le plus souvent recyclé à la membrane pour être à nouveau fonctionnel ; le mécanisme permettant l'endocytose et le recyclage des récepteurs Scavengers n'est toujours pas précisément décrit, et il est probablement récepteur-dépendant.

Des récepteurs scavengers impliqués dans le développement de l'athérosclérose et la transformation des macrophages en cellules spumeuses, les mieux connus sont CD36 (SR-B2) et SR-A (Figure 5). Il a été démontré qu'ils dégradent 75 à 90% des LDL modifiées (LDLac ou LDLox) in vitro (Kunjathoor VV. Et al, J Biol Chem 2002). In vivo chez la souris, leurs déficiences dans des souris apoe^{-/-} n'empêchent pas le recrutement de cellules spumeuses, mais diminuent l'inflammation et l'apoptose dans les macrophages et préviennent ainsi leur progression vers un état plus avancé et nécrotique (Manning-Tobin JJ. Et al, ATVB 2009). Il y

aurait une stimulation de l'inflammation et un déclenchement de l'apoptose dans les macrophages, concomitante à l'internalisation des LDLox par ces récepteurs.

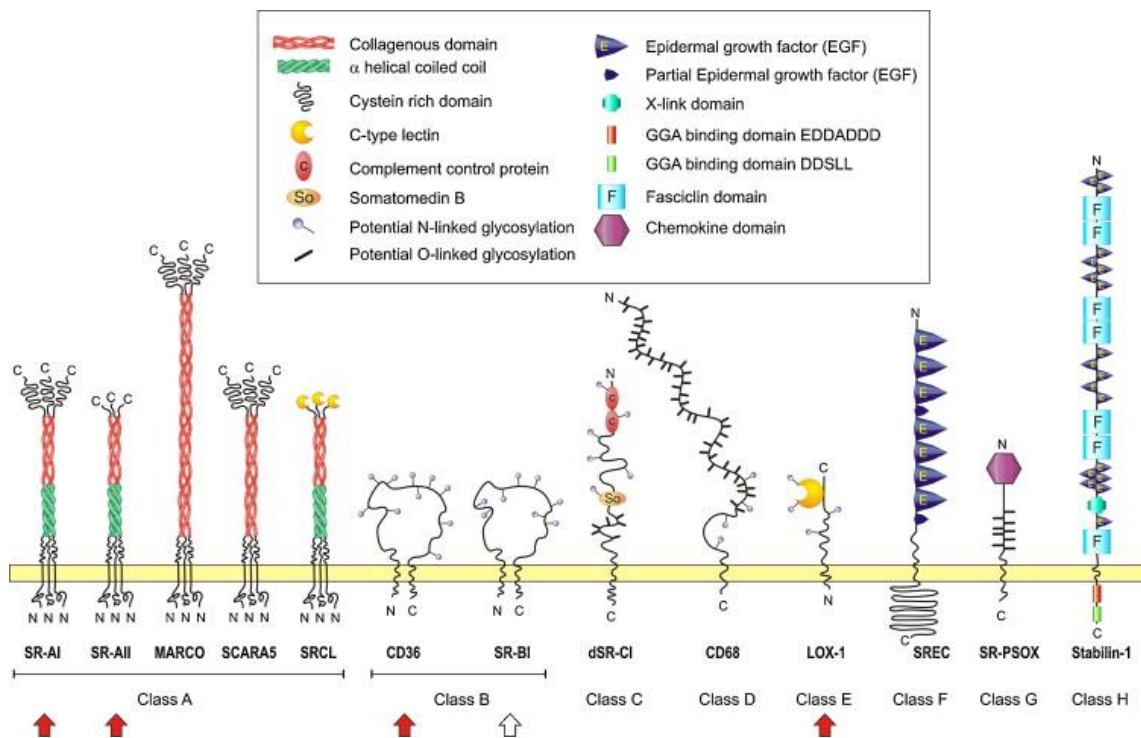


Figure 5 – Les récepteurs Scavengers (Kzhyshkowska J. et al, Immunobiology 2012)

L'ensemble des membres de la famille sont présentés ici. La flèche rouge indique des propriétés athérogènes (internalisation de LDL modifiées) et la flèche blanche un rôle athéroprotecteur (SR-BI/CLA-1 – voir partie IIB).

La formation de plaques se maintient en l'absence de CD36 et SR-A, ce qui suggère que d'autres voies existent. Le récepteur Scavenger LOX-1 est également responsable de l'internalisation des LDLox (Pirillo A. et al, Mediators Inflamm 2013). Il est en majorité exprimé par les cellules endothéliales : une fois son ligand lié, il y augmente l'inflammation ce qui participera à l'activation de l'endothélium. Mais il est également présent sur la membrane des macrophages différenciés, son expression étant dépendante du niveau d'inflammation. L'inactivation de LOX-1 dans des macrophages murins naïfs ne modifie pas l'internalisation des LDLox, il est responsable de 5 à 10% de cette captation *in vitro* puisqu'il est beaucoup moins exprimé que les autres scavengers. Mais lorsque l'inflammation

augmente, les cytokines pro-inflammatoires stimulent l'expression de LOX-1 et diminuent celle de SR-A et CD36 : il assure alors jusqu'à 40% de l'internalisation des LDLox. Il prend donc une part de plus en plus importante dans la formation de cellules spumeuses au fur et à mesure que la maladie progresse (Schaeffer DF. Et al, J Lipid Res 2009)

Les LDL agrégées (LDLag), souvent liées à la matrice, en contact avec les macrophages, induisent également l'accumulation massive de cholestérol dans leur cytoplasme. Il a été démontré qu'elles peuvent être internalisées via le récepteur LRP1 (LDLr-related protein 1) (Lorente-Cortés V., JLR 2007) ou via un mécanisme de phagocytose. Une étude démontre qu'une fois différenciés, les macrophages humains peuvent internaliser les LDLag via « phagocytose » ou « macropinocytose » (Huang W. et al, JLR 2002 ; Kruth HS. Et al, J Biol Chem 2002). Ce mécanisme d'endocytose récepteur-indépendant sont différents de la phagocytose : il fait intervenir un réseau d'invaginations de la membrane plasmique (surface connected compartments SCC). Les LDL natives participeraient également à la formation de cellules spumeuses : en hypercholestérolémie elles sont reconnues et internalisées par un mécanisme équivalent : la micropinocytose (Barthwal MK. Et al, PLOS One 2013). Ces 2 mécanismes sont indépendants des Scavenger récepteurs. Il n'a pas encore été démontré que les LDLag soient également sensibles à l'oxydation et internalisées par les récepteurs scavengers.

c) Le stockage du cholestérol

Les lipoprotéines, une fois internalisées par endocytose, seront acheminées jusqu'au lysosome ou leur composante protéique est dégradée. Le cholestérol libre est cytotoxique. Afin de se protéger de son accumulation excessive dans les membranes et dans le réticulum endoplasmique (RE), l'enzyme ACAT1 va synthétiser des esters de cholestérol qui seront stockés dans des gouttelettes lipidiques ; lorsqu'en trop forte quantité, on considèrera que la cellule a acquis le phénotype « cellule spumeuse » (Ghosh S. et al, Vascular Pharmacology 2010).

Si le système sature et que le cholestérol libre s'accumule en trop grande quantité dans les membranes de la cellule et du RE, il va empêcher l'estérification par l'ACAT1, promouvoir un signal inflammatoire (Zhu, X. et al, J lipid res 2010) et un stress du RE, associé

avec un déclenchement de l'UPR et de l'apoptose (Feng B. et al, Nature Cell Biol 2003). Pour être exporté sur des lipoprotéines antiathérogènes (apoA1, apoE, HDL) via l'efflux cellulaire du cholestérol, le cholestérol libre a besoin de se trouver à des zones spécifiques de la membrane plasmique. Un trafic intracellulaire du cholestérol défectueux, pouvant être également causé par l'accumulation excessive de celui-ci, bloquera le cholestérol au niveau des lysosomes.

Les mécanismes précis responsables de l'homéostasie intracellulaire du cholestérol dans les macrophages seront décrits chapitre IIA.

2. La modification de l'environnement

Pendant longtemps, l'athérosclérose a été vue comme une accumulation passive de cholestérol dans la paroi des artères. Depuis un quart de siècle cependant, cela a grandement évolué : le rôle primordial de l'inflammation dans le développement de la maladie a émergé, chez l'humain comme chez la souris, et a été étudié en détail. En réalité, le scientifique Rudolf Virchow avait émis cette hypothèse dès 1860 ! Au final, c'est bien l'inflammation qui fait le lien entre les facteurs de risques lipidiques « traditionnels » et le développement mécanique de la maladie. Le niveau de CRP (C-Reactive Protein), reflet de l'inflammation systémique, est par ailleurs considéré comme un marqueur du risque de développer des MCV par l'humain, au même titre que le taux de LDL-C (Libby P., ATVB 2012)

a) L'activation de l'immunité innée

Cette immunité innée est le pilier central du développement de l'athérosclérose, puisque les macrophages, cellules phagocytes, sont les cellules principales de la plaque. Nous nous sommes ainsi focalisés davantage sur ces derniers. Tout au cours du développement de la plaque, des récepteurs PRRs à la surface des macrophages sont activés. La saturation des cellules spumeuses en cholestérol intracellulaire est responsable de l'activation d'un cercle vicieux inflammatoire qui va promouvoir la sécrétion de ligands signaux de « danger » dans la paroi artérielle, allant vers une inflammation sans cesse

augmentée et le recrutement de toujours plus de monocytes, se différenciant en macrophages, se transformant en cellules spumeuses...

Le procédé même d'internalisation des LDL modifiées par les SRs va pouvoir stimuler l'inflammation. L'implication d'autres PRRs, les Toll-Like Recepteur (TLRs), a récemment été étudiée. Ces récepteurs, présents à la membrane des macrophages (mais également des cellules épithéliales) reconnaissent une grande variété de PAMPs (Pathogen associated molecular patterns) et sont les mieux caractérisés. Ils vont, une fois activés, transduire un signal via la myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88) ou le TIR domain-containing adaptor inducing IFN β (TRIF), qui aboutira au déclenchement de l'inflammation et à la sécrétion de cytokines, principalement via l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Les souris MyD88^{-/-} apoE^{-/-} développent en effet beaucoup moins d'athérosclérose que les souris apoE^{-/-} (Bjorkbacka H. et al, Nat Med 2004) ; il est cependant difficile d'en faire une cible thérapeutique vu son rôle extrêmement large dans le déclenchement de l'inflammation. Ils sont ainsi exprimés en particulier par les macrophages et les cellules endothéliales, et seront davantage détaillés partie IIIA1.

Le rôle de chaque TLR a été décrypté dans l'athérosclérose (Figure 21) ; leur expression est en effet augmentée dans les lésions chez l'humain et chez la souris. Chez le macrophage, TLR2 et TLR4 semblent émerger comme les principaux médiateurs de l'inflammation : leur délétion chez des souris protège les animaux du développement de l'athérosclérose.

- Les souris LDL-R^{-/-} TLR2^{-/-} développent moins d'athérosclérose (Mullick AE., J Clin Invest 2005) ; dans des macrophages primaires issus d'athéromes humain, son blocage empêche également l'activation de NF- κ B et des métalloprotéinases de la matrice (MMPs), d'autres facteurs délétères (Monaco C. et al, Circulation 2009). Enfin, un mécanisme de reconnaissance des LDLox impliquant TLR2 et CD36 favoriserait également l'apoptose en induisant un stress RE (Seimon TA. et al, CellMeTable 2010).
- Les souris apoE^{-/-} TLR4^{-/-} ont moins de monocytes au niveau des lésions et développent moins d'athérosclérose (Michelsen KS. Et al, Proc Natl Acad Sci 2004). En effet, TLR4 reconnaît les LDLox très peu oxydées pour, notamment, déclencher une micropinocytose (Choi SH. Et al, Circ res 2009). Egalement, un complexe formé

de TLR4 , TLR6 et CD36 reconnaît les LDLox et promeut l'inflammation. (Stewart CR. et al, Nat Immunol 2010).

L'internalisation des LDLox participe donc déjà naturellement à l'activation inflammatoire des macrophages. D'autres PRRs, les nucleotid-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs), complexes protéiques intracellulaires ou inflammasomes, constituent un verrou supplémentaire à l'inflammation. Leur activation, en particulier celle de NLRP3 dans l'athérosclérose, est nécessaire à la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires, notamment IL-1 β , qui aurait un rôle prépondérant dans le développement de la maladie (Duewell P. et al, Nature 2011). Elle dépend de la cristallisation du cholestérol, qui a lieu dans la lésion ou dans les macrophages. Les voies de signalisation de l'inflammation telles que NF- κ B, l'inflammasome et toutes les cytokines sécrétées ou détectées qui en découlent, seront détaillées chapitre III.

Enfin, intervient également dans le développement de l'athérosclérose la polarisation des macrophages par les stimuli TLR mais également en provenance des lymphocytes T. Ces signaux font acquérir aux macrophages différenciés des phénotypes particuliers, notamment par l'activation d'un programme transcriptionnel particulier (Figure 6, Tableau 3). On identifie :

- Les macrophages « naïfs », « résidents » ou M0, seulement différenciés par du M-CSF
- Les macrophages « classiques », M1 ou dits « pro-inflammatoires ». Originaires en majorité des monocytes LY-6C^{high} ou CD14⁺CD16⁻. Ils sécrètent des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des ROS.
- Les macrophages « alternatifs », M2 ou anti-inflammatoires. Contrairement aux M1, ils résolvent l'inflammation via la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires. Mais leurs phénotypes, récemment remis en cause, est en réalité hétérogènes, au niveau de leur fonction comme au niveau de leur capacité à faire progresser l'athérosclérose (sous catégories détaillées Figure 6).
- De nouveaux « profils » ont été décrits récemment : les « M4 », différenciés par le CXCL4 des plaquettes, pro-athérogéniques (Gleissner CA. et al. J immunol 2010) ; les macrophages « Mhem », spécialisés dans le traitement du fer et de l'hémoglobine, exprimant IL-10 et HO-1 (Boyle JJ. Et al, Am J Pathol 2009) ; les macrophages Mox abordés ci-dessous.

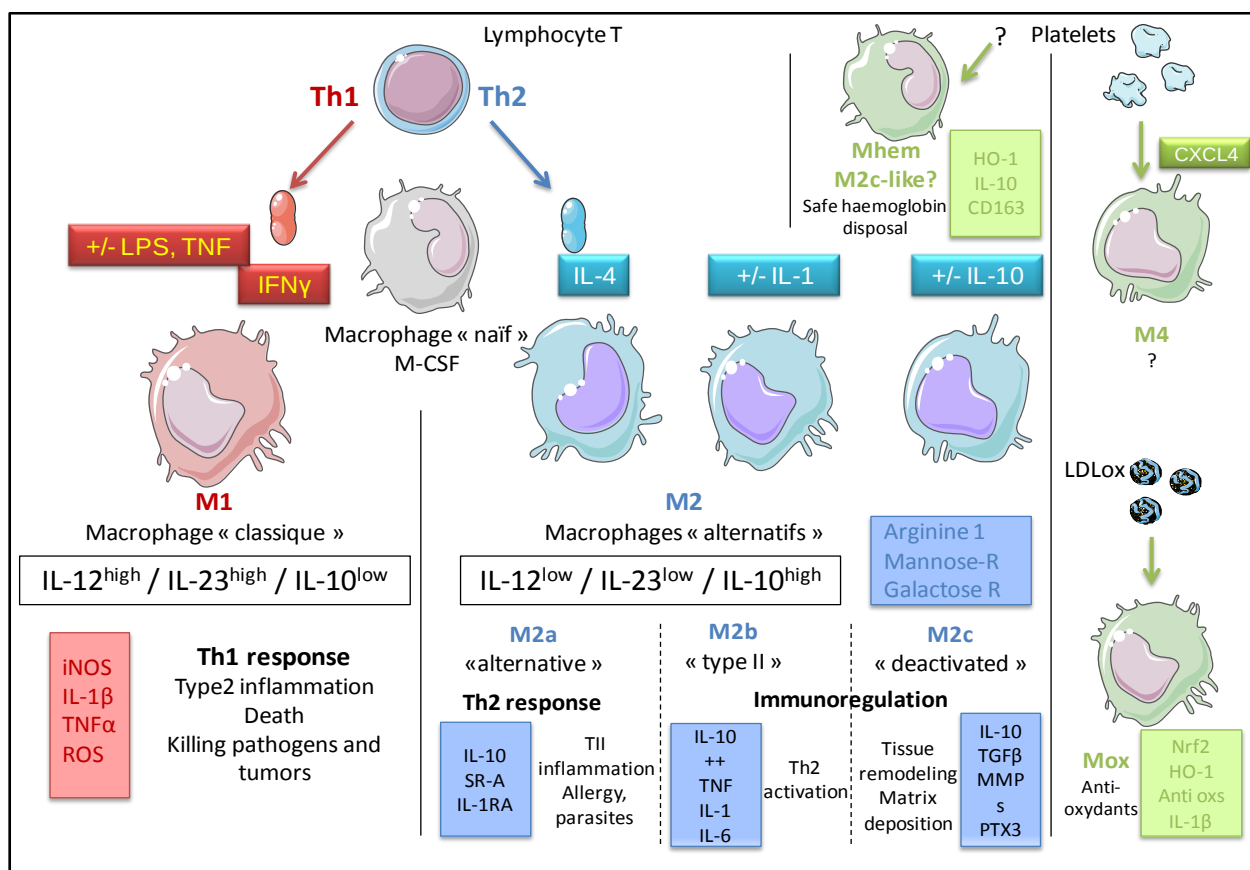


Figure 6 – La polarisation des macrophages

(Mantovani A. et al, Trends Immunol 2004 ; Hoeksema AM. et al, Curr Atheroscler Rep 2012)

Les différents types de macrophages polarisés sont listés ici. En rouge, les macrophages M1, caractéristiques d'une polarisation Th1/Th17, pro-inflammatoires. En bleu, les M2, plus hétérogènes, induits par la polarisation Th2/Treg. Leur action est anti-inflammatoire et promeut la résolution de l'inflammation. En vert, de nouveaux profils de macrophages polarisés, vers une fonction type particulière. Ces macrophages peuvent néanmoins être rapprochés d'un grand « sous-types » de polarisation classique.

Des analyses histologiques de plaques humaines ont démontré que les différentes sous-populations de macrophages occupent des endroits et des fonctions différents dans la plaque (Chinetti-Gbaguidi G. et al, Circ Res 2011). Les LDLox induiraient seules une polarisation intermédiaire, puisqu'en plus de l'activation des TLRs fortement inflammatoire elle pourrait stimuler l'expression du facteur arginase-1, marqueur M2 (Gallardo-Soler A. et

al, Mol Endocrinol 2008), certains ayant même jusqu'à proposer un phénotype alternatif « Mox » pour décrire ces macrophages de la plaque, caractérisés par l'activation d'un facteur de transcription, Nrf2, lui-même activant l'expression d'antioxydants comme la thioredoxine reductase 1 (Kadl A. et al, Circ Res 2010). Les facteurs de transcription sont en effet proposés comme régulateurs des polarisations de macrophage dans l'athérosclérose. NR4A1 (Hanna RN. Et al, Nature Immunol 2011), KLF-4 (Liao X. et al, J Clin Invest 2011) ou PPAR γ (Chinetti-Gbaguidi G. et al, Circ Res 2011) favorisent par exemple la polarisation en M2 et protègent aussi du développement de l'inflammation et de la plaque. Les voies de signalisation gouvernant cette polarisation du macrophage sont nombreuses et nécessitent encore des recherches.

b) Le stress oxydatif

Le stress oxydatif joue également un rôle important dans la pathogénèse de l'athérosclérose. En effet, la captation de LDLox, en plus d'activer l'inflammation via les PRRs, va également provoquer la transduction d'un signal pro-oxydation, pouvant provoquer des dysfonctions allant jusqu'à l'apoptose. Si les cellules endothéliales sont les plus importantes actrices de ce phénomène, les macrophages de la plaque et en particulier les cellules spumeuses y jouent un rôle non négligeable.

Ainsi, l'activation du complexe NADPH oxydase à la membrane plasmique du macrophage ou un dysfonctionnement de la mitochondrie va promouvoir la production d'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Celui-ci :

- Est impliqué dans l'oxydation des lipides, en particulier des LDL (formation de nouveau LDLox) comme évoqué précédemment mais aussi des lipides de la membrane plasmique
- Va servir de substrat à d'autres enzymes, notamment la superoxyde dismutase (SOD) qui formera du peroxyde d'oxygène H_2O_2 , sécrété.

(Cathcart et al, J Leuc Biol 1985)

Ainsi, des souris apoE^{-/-} mutées pour p47, une composante de l'enzyme NADPH ainsi inactivé, ont beaucoup moins de plaques d'athéromes comparé à des apoE^{-/-}, soulignant ainsi le rôle majeur du NADPH et de l'oxydation (Barry-Lane et al, J Clin Invest 2001).

Cependant, l'hypothèse du stress oxydatif in vivo chez l'humain est toujours débattue : des études cliniques testant l'impact d'un traitement par des antioxydants, comme la vitamine E ou la vitamine C chez l'homme n'ont démontré aucune réduction des MCV suite à l'administration de celles-ci. Des anti-oxydants synthétiques montrent cependant un effet chez l'animal, notamment le probucol ou l'AGI-1067, qui ne modifient pas l'ampleur de la plaque mais la stabilise (Tardif JC., *Can J Cardiol* 2006).

Des études plus récentes chez l'humain soulignent néanmoins le rôle important d'une enzyme, la myéloperoxydase (MPO), sécrétée par les macrophages, dans les dommages associés à l'oxydation au sein de la lésion d'athérome. Cet enzyme peut s'associer aux lipoprotéines, notamment apoA1, et catalyser leur oxydation via H₂O₂. Ainsi, en oxydant un résidu spécial de l'apoA1, le Trp72, elle l'empêcherait de jouer son rôle d'accepteur de cholestérol ; un rôle capital dans la protection contre l'athérosclérose voire dans la régression de la plaque, car l'apoA1 et les HDL médient l'efflux cellulaire de cholestérol. Ce mécanisme permet aux macrophages spumeux d'exporter leur cholestérol en excès vers des lipoprotéines qui l'acheminent au foie où il sera éliminé (cf IIB). Les patients développant de l'athérosclérose présentent en effet une apoA1 et des HDL fonctionnelles en circulation, mais abondamment non-fonctionnelles dans la plaque d'athérome (Shao B. et al, *Circ Res* 2014 ; Hewing B. et al, *ATVB* 2014 ; Huang Y. et al, *Nat Med* 2014).

Ainsi le stress oxydant, résultant de la dysfonction endothéliale d'une part et induit par les macrophages de la plaque d'autre part est une composante indissociable de la formation de celle-ci. La sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les cellules spumeuses vont oxyder davantage l'environnement de l'intima mais également les LDL en présence, ce qui va promouvoir davantage de recrutement de monocytes et activer l'inflammation dans les macrophages résidents. En outre, son action sur les lipoprotéines athérogènes, le stress oxydant accélère le développement de la lésion et limitera la régression de celle-ci via le blocage de la voie de l'efflux de cholestérol cellulaire.

3. Le recrutement des cellules musculaires lisses (SMCs)

La transition d'une lésion simple à une lésion d'athérome plus complexe est initiée par la migration des cellules musculaires lisses (CMLs) de la média des artères vers l'intima. Elles pourront s'y multiplier et également internaliser des lipoprotéines modifiées pour acquérir un phénotype de cellule spumeuse, et commenceront alors à sécréter différents composants de la matrice extracellulaire, du collagène, de la fibrine et des protéoglycanes, qui formeront une chappe fibreuse sous endothéliale. La migration de ces CMLs et leur activation nécessite au préalable l'activation d'une inflammation et d'un stress oxydatif chroniques décrits précédemment, ainsi que la sécrétion de facteurs de croissance par les leucocytes infiltrés, qui modifient profondément l'environnement de l'intima artériel (Glass CK. Et al, Cell 2003).

Ces CMLs sont présentes en très grand nombre dans l'environnement athérogène de l'intima lors des phases avancées de la maladie. Elles présentent de nombreuses similitudes avec les macrophages, notamment elles internalisent le cholestérol, forment des esters et se transforment en cellules musculaires lisses spumeuses. Elles présentent en effet à leur surface les récepteurs LDLr, VLDLr, CD36 et SR-A responsables de l'interaction avec les lipoprotéines athérogéniques LDL, LDLox et VLDL ; leur capacité à exporter ce cholestérol du cytoplasme est inférieure à celle des cellules spumeuses classiques.

Enfin, en réponse à cette charge en cholestérol et à des stimuli inflammatoires présents dans la plaque (comme notamment l'IL-1 β), les CMLs vont initier une trans-différenciation en macrophages : elles exprimeront de moins en moins leur marqueur Smooth Muscle α -actine (SM α -actine) et davantage CD68, marqueur des macrophages. Cette perte du phénotype « CML » est associée à un défaut de sécrétion du collagène I et de la fibronectine, impliqués dans la formation de la chape fibreuse de la plaque et de sa stabilisation. Ce mécanisme délétère participera donc à l'apport de nouvelles cellules inflammatoires dans la plaque avancée fibrosée ainsi qu'à sa fragilisation.

(Allahverdian S. et al, Trends Cardiovasc Med 2010)

C. La lésion avancée

C'est à ce stade que la lésion est vraiment à risque et à même d'obstruer la circulation. En effet, les plaques peuvent causer des événements cliniques en produisant des sténoses locales ou, plus grave, en interrompant le flux sanguin via la formation d'un thrombus après rupture. En effet, les plaques présentant les plus grosses chapes fibreuses, même si elles obstruent davantage la circulation, ne sont pas les plus à risque ; elles font suite à une meilleure résolution naturelle de l'inflammation sous-endothéliale. Une inflammation plus agressive et rapide formera une plaque fragile à fine couche matricielle, bien plus à même de rompre lorsqu'exposée aux contraintes mécaniques de la circulation (Davies MJ, Circulation 1995)

1. La fragilisation de la plaque

a) Une plaque irréversible

Récemment, l'idée de l'athérosclérose maladie progressant continuellement sans régression possible a été remise en question. L'expansion de la lésion, dont la taille dépend du nombre de cellules, leucocytes et CMLs, en présence dans l'intima, est un processus dynamique complexe, dépendant :

- D'une part de l'entrée, détaillée précédemment, de la rétention et de la prolifération de ces cellules
- D'autre part de l'apoptose et de l'émigration de ces cellules hors de la plaque.

Les lésions avancées sont caractérisées par une inversion marquée de cette balance : l'émigration diminue, tandis que la prolifération, concept développé plus récemment, augmente.

Une étude récente chez la souris a démontré qu'il y a davantage de marqueurs de prolifération dans les lésions avancées chez la souris au cours du développement de l'athérosclérose, et que c'est cette dernière qui serait impliquée dans le développement de la plaque à ce stade, et non le recrutement de monocytes (Robbin CS. Et al, Nat Med 2013). Cette prolifération cellulaire est corrélée ici avec l'activation du récepteur SR-A même si le mécanisme sous-jacent reste à être élucidé : l'internalisation de LDLox par SR-A est

également a même de stimuler l'apoptose via le stress RE, mais également via le facteur NF- κ B, qui joue un rôle dans la survie et la prolifération cellulaire.

De manière opposée, le recouvrement de la paroi de l'intima par une chape fibreuse réduit l'infiltration de monocytes dans la plaque, mais surtout l'émigration de ceux-ci. En effet, il a été évoqué précédemment que les facteurs de rétention des macrophages sont davantage exprimés lors de l'athérosclérose, notamment l'inhibiteur de migration nétrine 1 (van Gils JM et al, Nat Immunol 2012).

b) Apoptose et cœur nécrotique

Les principales cellules à rentrer en apoptose – mort cellulaire programmée empêchant la nécrose et ainsi le relargage dans l'environnement des composants toxiques – dans la lésion d'athérome sont les macrophages et les CMLs.

De manière simplifiée, l'apoptose peut être déclenchée par deux voies de transduction de signal intracellulaires :

- Premièrement, une activation des « récepteurs de la mort ». Notamment FAS (ou CD95), récepteur aux FAS-ligands, ou le TNF-R1, récepteur au TNF α , lient intracellulairement respectivement FADD (FAS associated protein with death domain) et TRADD (TNFR associated protein with death domain). Les « domaines de la mort », activés, vont cliver et activer la caspase-8, initiatrice d'une cascade d'activation de caspases aboutissant à l'activation de la Caspase-3.
- Une dysfonction mitochondriale entrainera une perte du potentiel d'action de sa membrane, une ouverture de mégapores dans celle-ci et le relargage du cytochrome C dans le cytoplasme. Celui-ci forme un complexe muttiprotéique, notamment avec APAF-1 et la pro-caspase-9, aboutissant à l'activation de cette caspase-9, aboutissant elle-même à l'activation de la caspase-3.

C'est cette caspase-3, qui une fois présente sous forme activée dans le cytoplasme, va hydrolyser les protéines cellulaires nécessaires à la survie. Cette signalisation de la mort est cependant plus complexe et fait intervenir plusieurs voies simultanément. Notamment, le déclenchement de l'apoptose correspond également à un déséquilibre de la balance entre facteurs pro et anti apoptotiques. Ainsi, parmi les inhibiteurs de l'apoptose les plus décrits :

- Les protéines Bcl2 et BclX vont empêcher le relargage du cytochrome via leur liaison avec le facteur BAX et leur régulation des flux calciques mitochondriaux.
- L'activation de la voie PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Kinase) par des facteurs de croissance ou de survie active la voie AKT, qui active Bcl2/BclX en phosphorylant la protéine BAD qui les séquestre. Elle phosphoryle également directement la caspase-9 ; et le facteur de transcription de gènes pro-apoptotiques FOXO3a (Forkhead box, group O 3a), ce qui le maintient dans le cytoplasme.

Ainsi, le déclenchement de l'apoptose dépend d'activations simultanées d'une multitude de voies complexes. (Elmore S., *Toxicol Path* 2007).

L'apoptose des macrophages est détectée dans la lésion tout au cours de son développement. Elle est due aux nombreux stimuli oxydants et inflammatoires de l'environnement de la plaque, dont beaucoup ont pour conséquence de promouvoir un stress du RE et l'UPR, une dysfonction mitochondriale (par le stress oxydant induit par les LDLox) ou l'activation des domaines de la mort (notamment par le TNF α) eux même déclenchant l'apoptose quand trop importants ou prolongés. Notamment, l'inactivation du facteur de transcription C/EBP homologous protein (CHOP) (Thorp E. et al, *Cell Metab* 2009), effecteur du stress du RE, diminue la taille des lésions et surtout la surface de leur corps nécrotique.

Cependant, une étude de notre laboratoire, utilisant un modèle de souris où la durée de vie des macrophages a été spécifiquement reprogrammée, a démontré qu'il y avait un effet phase dépendant. L'apoptose a un effet athéroprotecteur dans les phases précoces du développement de la maladie (Gautier EL. et al, *Circulation* 2009 ; Arai S. et al, *Cell Metab* 2005): d'autres phagocytes de l'intima, en particulier les macrophages M2, vont reconnaître et internaliser les cellules apoptotiques ; ce mécanisme, l'efférocytose, a en plus la particularité de diminuer la production de cytokines pro-inflammatoires (Maderna P. et al, *Biochim Biophys Acta* 2003).

Chez l'humain cependant, des analyses révèlent que des macrophages apoptotiques sont souvent présents dans les sites de ruptures des chapes fibreuses des plaques d'athérome (Kolodgie FD. Et al, *Am J Pathology* 2000). Dans les plaques avancées, l'efférocytose n'est pas assez efficace pour éliminer les cellules apoptotiques, trop nombreuses (Shearn AI. et al, *ATVB* 2012). Il en résulte une accumulation délétère de macrophages apoptotiques dans la plaque, non « nettoyée », qui empêche la résolution de

l'inflammation et conduit à une nécrose, associée au relargage des médiateurs toxiques et oxydants dans l'environnement et à la déstabilisation de la plaque. Les mécanismes à l'origine de cette inefficacité de l'efferocytose sont partiellement identifiés et toujours sous investigation. Les LDLox en trop grande quantités entrent en compétition au niveau des phagocytent avec les ligands « find me » (« trouve moi ») sécrétés par les cellules apoptotiques. L'inflammation sans cesse augmentée polarisera davantage de macrophages en M1, exprimant peu les acteurs de l'efférocytose (Schrijvers DM., ATVB 2005).

L'apoptose des CML a également un rôle important dans la déstabilisation de la plaque. En effet, elle provoquera une diminution de la sécrétion de protéines de la matrice, et donc un amincissement de la chape fibreuse, une augmentation de l'inflammation et de la proportion du cœur lipidique (Clarke MC. Et al, Nat Med 2006). L'apoptose des CMLs est provoquée par plusieurs facteurs, dont l'inflammation via le TNF (Boyle JJ. Et al, ATVB 2003) ou la perte de l'interaction avec d'autres CMLs ou la matrice décrite ci-après (Williams H. et al, Cardiovasc Res 2010).

Ainsi, dans la lésion avancée, l'apoptose des CMLs et la nécrose des macrophages apoptotiques due à une efferocytose insuffisante sont autant de facteurs aggravants pour l'expansion d'un « cœur nécrotique » et la fragilisation de la plaque.

c) Métabolisme du collagène et rupture

L'inflammation chronique a également un impact sur l'intégrité de la couche fibreuse de matrice qui recouvre la plaque.

En effet, des études ont détecté des matrix métalloprotéinases (MMPs), des enzymes catalysant la collagenolyse dans la matrice, in situ dans des plaques d'athérome humaines, notamment MMP-1, MMP-8 et MMP-13 (Nikkari ST. Et al, Circulation 1995 ; Galis ZS. Et al, Proc Natl Acad Sci USA 1995). Les cytokines pro-inflammatoires augmentent l'expression de certaines de ces MMPs par les macrophages (Dollery CM. Et al, Cardiovasc Res 2006). *In vivo*, les souris apoE^{-/-} MMP-13^{-/-} développent des plaques d'athérome plus stables et contenant davantage de collagène comparé aux apoE^{-/-} (Deguchi JO. Et al, Circulation 2005).

Les macrophages expriment une grande variété de MMPs : les MMP-1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 et 14. En particulier, l'expression des MMP-1, 2, 5, 7, 9, 11, 12, 14 semble être

stimulée par la différenciation de monocytes en macrophages in vitro. Les MMP 1, 3 et 8 semblent elles être stimulées par l'activation de l'inflammation par NF-κB. Les régulations de l'ensemble de ces protéines sont cependant toutes complexes (Newby AC., ATVB 2008).

Des inhibiteurs endogènes des MMPs, les TIMPs (Tissue Inhibitor of Metallo-Proteinases), TIMP1, 2 et 3 sont exprimées et sécrétées par le macrophage. L'hydrolyse de la matrice dépend également d'une balance entre TIMPs et MMPs. En effet, l'inflammation et notamment un traitement par le LPS induit la sécrétion par le macrophage de TIMP1. Ces TIMPs inhibent toutes les MMPs à l'exception des gélatinases MMP-2 et 9 (Fabunmi RP. Et al, Circ Res 1998 ; Xu XP. Et al, Circulation 1999 ; Chase A. et al, ATVB 2002).

De plus, cette inflammation inhibe également la synthèse de collagène par les CMLs. Des études in vitro ont montré que l'IFNγ inhibe l'expression des gènes du collagène et la production de celui-ci par les CMLs (Amento EP. Et al, ATVB 1991). La MMP-7, chez la souris et l'humain, clive également les jonctions N-cadhérines cellule-cellule des CMLs et provoque indirectement leur apoptose (Williams H. et al, Cardiovasc Res 2010). Cette apoptose peut également être favorisée par l'accumulation dans la matrice de produits clivés comme le collagène dégradé (von Wnuck Lipinski K. et al, Circ Res 2006).

L'inflammation prolongée dans la plaque médie donc l'amincissement de la chape fibreuse de la plaque d'athérome par un double effet sur le métabolisme du collagène : elle diminue sa synthèse par les CMLs et induit sa dégradation par les MMPs.

2. Rupture et thrombose

L'érosion ou la rupture de la chape fibreuse des plaques d'athérome fragilisées sont à l'origine de la majorité des conséquences cliniques de l'athérosclérose.

Après la rupture de cette chape fibreuse, le collagène sous-endothélial, le cœur lipidique et nécrotique ainsi que des facteurs pro-coagulants relargués de la plaque vont être exposés à la circulation, tel le facteur tissulaire (Tissue Factor TF) des macrophages, qui activera le facteur VII de la cascade de coagulation plaquettaire (Marius Barstad R. et al, ATVB 1995). Les plaquettes sanguines vont rapidement adhérer à la paroi des artères, suite à la stimulation d'une cascade de signalisation intracellulaire. Ceci va entraîner un processus

de coagulation intra-vasculaire. Le « caillot » ainsi formé ou thrombus pourra interrompre le flux sanguin, ou se détacher et être entraîné par la circulation, phénomène appelé embolie.

La conséquence directe de l'interruption du flux artériel sera l'ischémie du territoire en aval du caillot, qui aura des symptômes spécifiques de l'organe où elle a lieu. Si elle est prolongée, l'ischémie finit par provoquer un accident vasculaire. S'il a lieu dans les coronaires, il s'agit d'un infarctus du myocarde, souvent mortel, dans les artères cérébrales, un AVC ou accident vasculaire-cérébral. Ce sont les conséquences cliniques majeures du développement de l'athérosclérose. (Rauch U. et al, Ann Intern Med 2001).

Page suivante : Tableau 1 – Cellules et facteurs impliqués dans le développement de la plaque d'athérome

Les mécanismes chronologiquement responsables du développement de la plaque d'athérome jusqu'à l'accident vasculaires ont été listés, avec les cellules et facteurs clés correspondant à chacun d'entre eux. **En bleu, les facteurs athéroprotecteurs ; en rouge, les facteurs athérogènes ; en violet, des facteurs pouvant avoir les deux effets.**

Etape	Type cellulaire	Facteurs
Hypercholestérolémie	Multifactoriel	
Stress endothélial	Cellules endothéliales	eNOS IκB KPL2/4
Recrutement de monocytes	Cellules endothéliales Monocytes	CCL5 CCR5
Rolling	Cellules endothéliales Monocytes	ICAM-1, VCAM-1 LFA1, VLA4
Transmigration	Cellules endothéliales Monocytes	CCL2/5, CX ₃ CR1 CCR2/5, CX ₃ CR1, IL-8
Emigration	Monocytes	CCR7
Différenciation des monocytes		MCS-F
Internalisation des LDL	Macrophages	LDLr CD36 SR-A1 LOX-1 LRP1 Pinocytose
Stockage du cholestérol	Macrophages	ACAT-1 nCEH
Inflammation	Macrophages	TLR2/4/5 MyD88 NF-κB NLRP3 IFNα, β, γ IL-1, TNF IL-6 IL-1Ra IL-10
Polarisation des macrophages	Lymphocytes T	IFNγ IL-4
Stress oxydatif	Macrophages	NADPH MPO
Recrutement des CMLs	MACrophages	
Formation de la chape fibreuse	CMLs	col1A1
Retention cellules		netrin-1
Prolifération des leucocytes	Macrophages	SR-A
Apoptose des macrophages (anti apoptose)	Macrophages	CHOP, cJun pathways TNFR1 Caspase-8, 9 et 3 p38, BclX, Bcl2, PI3K, AKT
Apoptose des CMLs	Macrophages	MMP-7 TNF
Efferocytose	Macrophages	MERTK TG2 Megf8 C1qa, C1qb
Dégradation de la matrice	Macrophages	MMP-1, 7, 8, 13
Formation dt thrombus	Macrophages Plaquettes	TF facteur VII, thrombine

III. Homéostasie lipidique, RCT & LXR

Le développement de cellules spumeuses, gorgées de cholestérol et inflammatoires, marque un tournant dans le développement de l'athérosclérose. En effet, ce sont les premiers acteurs cellulaires de la plaque, se comportant de manière pathologique et entamant un cercle vicieux aggravé par l'excès de LDL. Une dérégulation de la gestion de l'homéostasie lipidique intracellulaire sont donc au cœur du développement de la maladie ; dans mes travaux de recherche, nous avons pris le contrepied des stratégies de réduction du LDL-C plasmatique, en émettant l'hypothèse qu'agir sur les voies de signalisation du macrophage pourrait prévenir la formation de cellule spumeuse indépendamment de la cholestérolémie.

Ainsi, il est primordial de connaître en détail les différents facteurs régulant l'homéostasie lipidique du macrophage, en situation normale comme pathologique. En particulier, la stimulation de l'efflux cellulaire de cholestérol, le mécanisme par lequel le cholestérol libre est exporté sur des lipoprotéines anti-athérogènes, est une option envisagée pour empêcher la dégénérescence en cellule spumeuse, initier la lipidation de l'ApoA-I et la formation de HDL et promouvoir le retour du cholestérol cellulaire vers le foie où il sera excrété (Reverse Cholesterol Transport RCT). Ce chapitre est consacré aux mécanismes de maintien de l'homéostasie du cholestérol du macrophage, à l'état normal ou spumeux :

- Au niveau cellulaire, et de la prise en charge du cholestérol par les organites
- Au niveau moléculaire, et de la gestion de la transcription ou de l'activation des différents partenaires de ces mécanismes

A. Le cholestérol intracellulaire

1. Esters de cholestérol & Cholestérol libre

Le cholestérol libre intracellulaire étant cytotoxique et pouvant rompre les membranes, la cellule a mis en place des voies de signalisation sophistiquées pour gérer son entrée et sa sortie. L'internalisation et l'efflux de cholestérol sont en effet régulés par le taux de cholestérol lui-même afin de maintenir une concentration constante dans les membranes (Maxfield FR., Nature 2005). L'internalisation du LDL-récepteur après la détection d'une trop forte quantité de cholestérol libre cellulaire en est un exemple.

L'activation des Liver X Receptors (LXRs) par des formes oxydées de cholestérol, stimulant l'efflux cellulaire de cholestérol en est une autre et a fait l'objet de la partie IIC.

a) ACAT-1 et gouttelettes lipidiques

Lors de la transformation en cellule spumeuse, le métabolisme du cholestérol est saturé par l'internalisation non régulée de lipoprotéines : les mécanismes compensatoires échouent. Afin d'éviter l'enrichissement excessif des membranes en cholestérol et préserver les fonctions cellulaires, celui-ci est estérifié au niveau du RE par un enzyme situé sur celui-ci : l'acyl-coenzyme A cholesterol acyl transferase 1 (ACAT-1). Les esters de cholestérol sont inertes et stockés dans des gouttelettes lipidiques, des organelles intracellulaires atypiques ; elles ont un cœur hydrophobe de lipides neutres entouré d'une monocouche de phospholipides, présentant des protéines spécifiques. Notamment, la famille de protéines PAT (perilipin, adipophilin, TIP47, S3-12 and OXPAT) fait partie du « manteau » des gouttelettes lipidiques, et est impliquée dans leur formation, stabilité et interaction avec d'autres protéines. Par exemple, l'inactivation totale ou macrophage spécifique de l'adipophiline chez la souris empêche la formation de cellule spumeuse et est athéroprotectrice (Paul A. et al, Circ Res 2008). La périlipine a également un rôle structurel important dans la stabilisation des gouttelettes lipidiques (Brasaemle DL. et al, J Lipid Res 2007). Des enzymes impliqués dans le métabolisme du cholestérol tels l'ACAT-1 ou les

cholesterol hydrolases (CEHs) abordées ci-après sont retrouvées sur la membrane de ces organelles.

Si la forme sous laquelle le cholestérol est stocké peut varier de manière cellule-dépendante, les macrophages accumulent bien des esters de cholestérol physiologiquement lorsqu'ils sont exposés à des lipoprotéines modifiées, comme des LDLac non physiologiques, des LDLox ou des LDL agrégées, dans des gouttelettes lipidiques recouvertes en majorité d'adipophiline. Ce traitement augmente également l'expression des gènes codant pour les protéines de la famille PAT, impliquant l'activation moléculaire de la formation des gouttelettes lipidiques au cours de l'athérosclérose (Persson J. et al, *Biochem Biophys Res Commun* 2007).

De plus, l'estérification du cholestérol est physiologiquement nécessaire au maintien de l'homéostasie lipidique. En effet, l'inhibition pharmacologique macrophage-spécifique de l'ACAT-1 chez le lapin ou la souris augmente la formation de plaques d'athérome (Perrey S. et al, *Atherosclerosis* 2000), même si ces données sont controversées. En effet, les souris *LDLr^{-/-}* ou *apoE^{-/-}* déficientes en ACAT-1 accumulent du cholestérol libre dans la peau et le cerveau (Accad M. et al, *J Clin Invest* 2000) et développent moins d'athérosclérose (Yagyu H. et al, *J Biol Chem* 2000). Ceci suggère bien qu'une déficience en ACAT-1 a des effets délétères dus à l'accumulation de cholestérol libre toxique, et que son inhibition n'est pas une option thérapeutique.

b) L'hydrolyse neutre des esters

Le cholestérol stocké dans les gouttelettes lipidiques sous forme d'ester ne peut cependant pas être recruté par les acteurs de l'efflux : pour être exporté hors de la cellule, il devra être ré-hydrolysé. Afin d'assurer que du cholestérol libre soit disponible continuellement à la membrane, il va subir un cycle permanent d'estérification/hydrolyse (Figure 7).

La cholestérol ester hydrolase neutre (nCEH), cytoplasmique, a été identifiée comme l'enzyme associée aux gouttelettes lipidiques chez l'humain qui catalyse cette hydrolyse des esters en cholestérol libre (Igarashi M. et al, *Circ Res* 2010). In vivo chez la souris, son invalidation macrophage-spécifique empêche l'hydrolyse, augmente l'accumulation d'esters

et le développement de la plaque d'athérome (Sekiya M. et al, Cell Metab 2009). Egalement, dans le macrophage humain, il a été démontré qu'une chute de l'activité CEH empêche la mobilisation du cholestérol libre à partir des gouttelettes pour l'efflux de cholestérol cellulaire (Ouimet M. et al, ATVB 2008).

Si ces résultats peuvent sembler en contradiction avec ce qui est observé pour l'ACAT-1, il semble que l'hydrolyse neutre présente des propriétés athéroprotectrices par l'augmentation de la biodisponibilité du cholestérol libre pour l'efflux cellulaire du cholestérol via notamment le transporteur ABCA1. Cette biodisponibilité peut être augmentée par une inhibition de l'ACAT-1, mais dans ce cas le taux cholestérol libre est non régulé et peut avoir des propriétés cytotoxiques, comme proposé [figure 7](#).

Dans le macrophage, il existe cependant une autre voie d'hydrolyse des esters, nCEH indépendante, et étudiée plus récemment : l'autophagie.

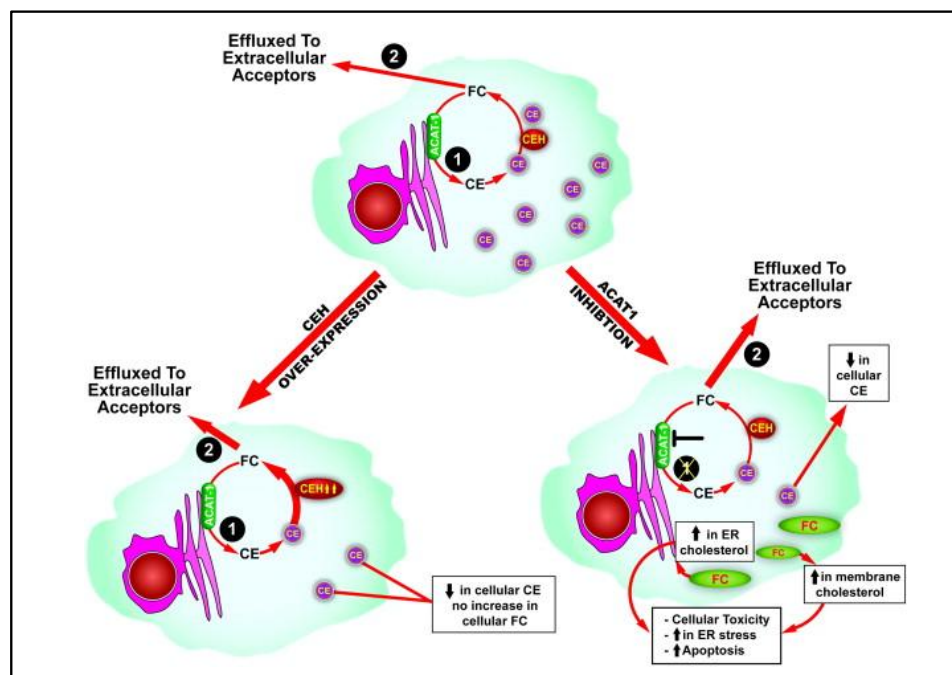


Figure 7 – Le cycle estérification/hydrolyse du cholestérol dans le macrophage

(Ghosh S. et al, Vascular Pharmacolgy 2010)

Le cycle estérification/Hydrolyse neutre est nécessaire à la biodisponibilité du cholestérol. C'est ce dernier critère qui est fondamental pour l'efflux, comme le démontre l'inefficacité de l'inhibition de l'ACAT-1 à résoudre les problèmes d'accumulation de cholestérol.

2. Mobilisation du cholestérol et autophagie

a) L'autophagie

L'autophagie est un très vieux mécanisme, conservé au cours de l'évolution, qui consiste en la délivrance du contenu de compartiments intracellulaires de trafic dans les compartiments de lyse où il sera dégradé. Elle joue un rôle important dans la dégradation des protéines ou organelles endommagées, ainsi que dans l'immunité innée. L'entrée dans le lysosome peut se faire de 3 manières différentes :

- La prise en charge d'une protéine isolée par une chaperonne.
- L'internalisation par invagination de la membrane du lysosome et internalisation d'un composé isolé « microautophagie »
- La séquestration de vésicules par un « cargo », devenant ainsi un « autophagosome » dont la membrane va donc aller fusionner avec le lysosome ou « macroautophagie ».

C'est ce dernier mécanisme qui est responsable de l'« hydrolyse acide » des esters de cholestérol dans le macrophage, ou lipophagie. En effet, la fusion d'un autophagosome contenant des gouttelettes lipidiques (le « cargo ») avec la membrane du lysosome va induire la dégradation de ces gouttelettes par les lipases de celui-ci (Singh R. et al, Nature 2009). L'enzyme responsable de leur dégradation est la lysosomal acid lipase (LAL), son inhibition pharmacologique dans des macrophages spumeux abolissant la lipolyse acide et l'efflux de cholestérol, notamment par ABCA1, en découlant (Le Guezennec X. et al, Cell Metab 2012).

b) La lipophagie dans le macrophage spumeux

L'intérêt s'est alors porté sur la capacité de la lipophagie qui est, à l'instar des cholestérol hydrolases neutres, capable d'hydrolyser les esters et rendre le cholestérol ainsi disponible pour l'efflux (Ouimet M. et al, Cell metabolism 2011 and ATVB 2012). De plus, elle est activée par la charge en cholestérol et protège d'une estérification excessive du celui-ci (Mei S. et al, J biol chem 2012). Si l'autophagie semble être progressivement inactivée au cours du développement de l'athérosclérose chez la souris apoE^{-/-}, il a également été

démonstré qu'elle a un effet athéroprotecteur (Razani B. et al, Cell Metab 2012 ; Liao X. et al, Cell Metab 2012).

Ces études sont récentes et cherchent toujours à décrypter les mécanismes et les acteurs de cette athéroprotection par l'autophagie, et ses autres potentiels rôles dans le développement de la maladie. En effet, si l'effet protecteur de la stimulation de l'efflux par l'autophagie est indéniable, il a été démontré qu'une autophagie fonctionnelle est un pré-requis pour la différenciation de monocytes en macrophages (Jacquel A. et al, Blood 2012). Egalement, la perte de l'autophagie induit l'activation de l'inflammasome dans les macrophages – un autre mécanisme dépendant du trafic vésiculaire (Razani B. et al, Cell Metab 2012 ; Saitoh T. et al, Nature 2008). Ce résultat est controversé (Crisan TO. Et al, PLoS One 2011) et les mécanismes sous-tendant ce lien ne sont pas clairs. L'autophagie aurait aussi un effet protecteur en réduisant la sécrétion de ROS, du stress RE et de l'apoptose (Liao X. et al, Cell Metab 2012).

Nous avons donc détaillé deux mécanismes très différents, l'hydrolyse neutre par une enzyme et l'hydrolyse acide par autophagie. Chacun a une part équivalente dans la mobilisation du cholestérol pour l'efflux, et est essentiel. Les différences entre les deux systèmes lipolytiques ne sont toujours pas claires : les gouttelettes sont hydrolysées en masse pendant la lipophagie, la nCEH reconnaît-elle des protéines spécifiques sur les organelles ?

Une fois le cholestérol libéré, il se trouve à la membrane des gouttelettes/lysosomes. Il ne peut pas encore être exporté hors de la cellule car doit avant être acheminé dans certaines zones spécifiques de la membrane plasmique.

3. Le trafic du cholestérol

Dans la cellule, les différentes membranes ont, malgré les échanges constants entre les différentes organelles, des compositions en lipides différentes et spécifiques. En particulier, il existe un gradient de stérols. Ces derniers sont très peu

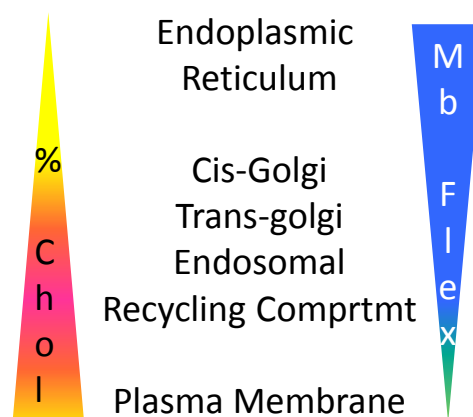


Figure 8 – Gradient du Cholestérol membranaire

présents dans le réticulum endoplasmique (5%) et abondants dans la membrane plasmique (30% chol) par exemple. En effet, ces stérols, famille de molécules rigides et atypiques dont le cholestérol est de loin le plus représenté dans l'organisme (**Figure 9**), ont la particularité d'augmenter la rigidité et l'imperméabilité des membranes, et d'empêcher le « flip-flop », la capacité de passer d'un feuillet de la bicouche

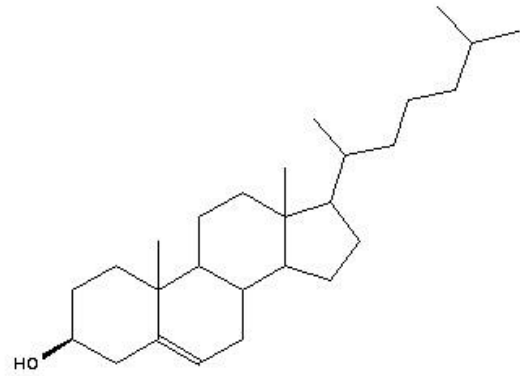


Figure 9 – Structure du cholestérol

lipidique à l'autre. Il existe donc un gradient de concentration en stérols entre ces différentes organelles qui maintient leur hétérogénéité structurale et fonctionnelle (**Figure 8**) (Maxfield FR. et al, Curr Opin Cell Biol 2006).

Afin de maintenir ce gradient, le transport entre les différentes organelles est nécessaire. Les stérols sont très insolubles en phase aqueuse. Ainsi, son transport intracellulaire d'un organelle de la cellule à un autre peut se faire de deux manières différentes :

- Par le trafic vésiculaire
- Grâce à des « protéines de transfert de lipides » (LTPs) solubles

a) Le trafic vésiculaire

Le trafic vésiculaire emprunte des routes bien particulières. Il est en majorité coordonné par les protéines Rab, une famille de protéines GTPases comprenant au moins 70 membres chez l'humain, qui est une des plus conservées et développées de l'évolution. Elles contrôlent chaque étape de ce trafic : la formation de la vésicule à partir de la membrane de l'organelle, son transport dans le cytoplasme en faisant l'intermédiaire avec le cytosquelette d'actine ou de tubuline le long desquels elle se déplace, et enfin sa fusion avec la membrane de l'organelle cible. Extrêmement diverses, leur expression peut être ubiquitaire ou cellule-spécifique (Novick P. et al, Curr Opin Cell Biol 1997).

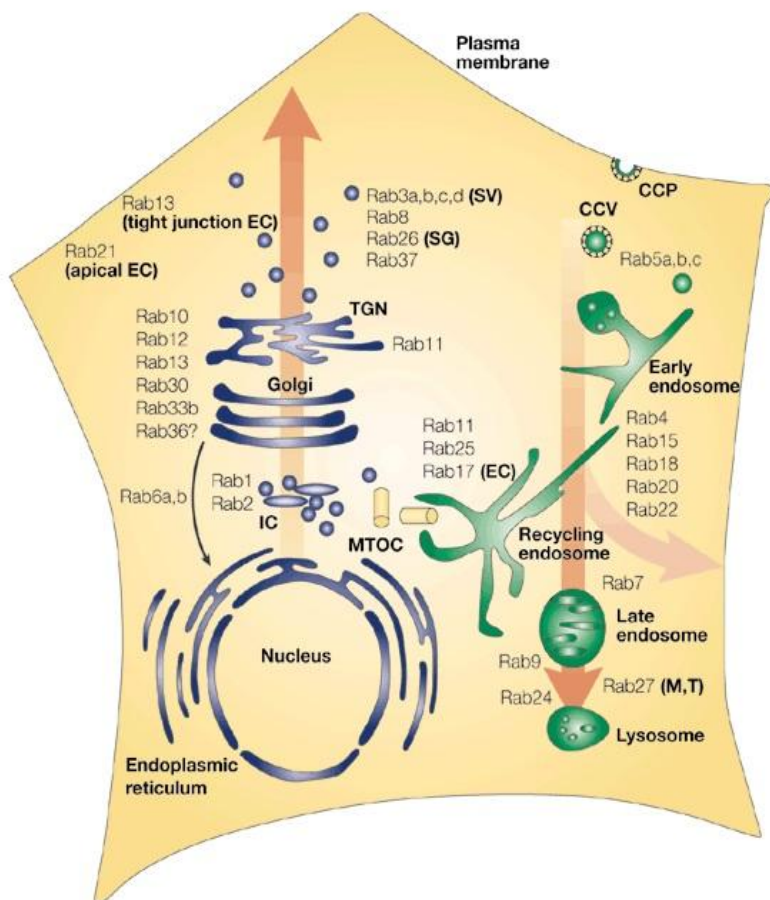


Figure 10 – Trafics vésiculaires et Rabs
(Zerial M. et al, Nature Rev Mol cell biol 2001)

Deux grandes voies de trafic vésiculaire dans la cellule : la voie de l'endocytose, de la membrane plasmique au lysosome et la voie de synthèse, du RE à la sécrétion. Chaque étape de chacune de ces voies est spécifique, car permis par un lot de protéines Rab spécifiques elles-aussi. Ces protéines sont des cargos transportant les vésicules sur le cytosquelette cellulaire.

Les Rabs lient et hydrolysent le GTP en GDP. Leur fonction dépend de leur cycle de passage de leur forme liée au GDP à leur forme liée au GTP, considérée comme active et capable de lier la vésicule. Les différentes Rab lieront des vésicules spécifiques ainsi que des co-acteurs leur permettant de fusionner la vésicule avec un organe donné ou de « marcher » sur le cytosquelette. Chaque Rab est ainsi cellule-spécifique, fonction spécifique et organe spécifique : le nombre et la diversité de leur co-acteurs, protéines membranaires des vésicules, des organes ou encore molécules de transport sur le cytosquelette, sont par conséquent très importants, puisque ce sont eux qui déterminent cette hétérogénéité fonctionnelle. (Figure 10).

La spécificité de la fusion d'une vésicule à son organe de destination est également médiée par la famille des protéines SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion

attachment protein (SNAP) receptors), présentes sur la membrane des vésicules (« vesicular » v-SNAREs) et de la cible (« target » t-SNAREs). Lorsqu'elles se retrouvent à moins de 10nm grâce à la liaison de la Rab portant la vésicule à son co-acteur de l'organite, elles vont interagir et médier la liaison des membranes de ces derniers. Chez l'homme, il existe 36 membres de cette famille ; v-SNAREs et t-SNAREs sont complémentaires 2 à 2 pour que la vésicule fusionne avec l'organite appropriée (Zylbersztejn K. et al, FEBS 2011).

Ainsi, deux « trajets » vésiculaires majeurs sont déterminés par la spécificité moléculaire des protéines effectrices (Figure 10) :

- La voie de l'endocytose : endosome primaire – de recyclage – tardif – lysosome
- La voie de synthèse des protéines : noyau – RE – cisGolgi – transGolgi – exocytose

Ces deux voies peuvent être connectées par le compartiment de recyclage endosomal : toutes les molécules internalisées ne sont pas acheminées et dégradées dans le lysosome.

Le trafic vésiculaire est un mécanisme clé, mais trop peu étudié, de la gestion du cholestérol cellulaire, et notamment de sa biodisponibilité, importante pour l'efflux et la régression des cellules spumeuses. Par exemple, le traitement de macrophages humain par le dynasore, inhibiteur de la dynamine indispensable pour l'endocytose, arrête ce trafic, provoque l'accumulation de cholestérol libre dans les endosomes, et inactive les facteurs senseurs comme SREBP2 ainsi que l'efflux cellulaire de cholestérol (Girard E. et al, PLoS ONE 2011). L'inactivation de Rab7 provoque elle une rétention des LDL dans les endosomes, desquels ils sont spécifiques (Girard E. et al, Traffic 2014).

Ces voies vésiculaires vont en général dans le sens du gradient de cholestérol et ont donc peu de rôle dans son maintien. Elles ne connectent pas non plus tous les organites, la mitochondrie est par exemple absente de leur réseau. Ainsi, les LTPs doivent assurer un transport du cholestérol non-vésiculaire pour les routes « non-conventionnelles ».

b) Les LTPs : NPC-1 et NPC-2

L'équilibration des concentrations en stérols entre les membranes des organelles est orchestrée par des LTPs, et en particulier par l'interaction entre la membrane plasmique et

le réticulum endoplasmique. C'est à ce niveau que se fait la régulation de l'homéostasie du cholestérol libre dans les cellules via un système senseur – effecteur.

Le senseur du cholestérol SCAP (SREBP cleavage-activating protein) va détecter un taux trop faible dans le RE, va en conséquence se libérer d'INSIG (Insulin Induced Gene), la protéine qui séquestre le complexe SCAP/SREBP2 (sterol regulatory element binding protein 2) au niveau du RE. Ce complexe sera ainsi transporté dans le Golgi et clivé (Brown MS. Et al, *J Lipid res* 2009). Sa partie effectrice, SREBP2 sera libérée dans le cytoplasme et transloquée dans le noyau pour activer la transcription de gènes impliqués dans la synthèse (3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase ou *HMGCoA-R*) et l'uptake du cholestérol (*LDLr*). *Insig1* sera également induit, les SREBP ayant la capacité de s'autoréguler (Yabe D. et al, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002).

L'activation de SREBP2 activera également la transcription de *STARD4* (Horton JD. Et al, *Proc Natl Acad Sci* 2003). Ce gène appartient à la famille START (StAR-related lipid transfer), dont les 15 membres ont la particularité de lier des lipides (Alpy F. et al, *J Cell Sci* 2005). *STARD4* transporte du cholestérol de la membrane plasmique au RE, où il pourra également activer l'ACAT (Rodriguez-Agudo D., *J Lipid Res* 2008).

Une autre famille de protéine, les Osh (Oxysterol binding homology protein), peuvent également être activées par des variations plus fines de la composition des membranes subcellulaires, notamment les phosphoinositides, et vont transporter des stérols particuliers. Les études sont nombreuses et leur fonction toujours peu comprise, mais leur inactivation cause une accumulation de stérols dans les organites intracellulaires (Beh CT. Et al, *Genetics* 2001 and *J Cell Sci* 2004). Si elles sont hétérogènes fonctionnellement, des études proposent une fonction commune et partagée : transférer les stérols nouvellement synthétisés du RE à la membrane plasmique (Sullivan DP., *Biochem Soc trans* 2006 ; Beh CT. Et al, *Mol Cell Biochem* 2009).

Cependant, dans le macrophage et encore davantage dans la cellule spumeuse, la grande majorité du cholestérol n'est pas synthétisée mais provient de l'internalisation. Le cholestérol libre internalisé par les récepteur Scavengers ou hydrolysé à partir des esters des gouttelettes lipidiques se trouve donc dans des vésicules internes de l'endosome tardif ou du lysosome. Dans le cadre de cette dérégulation du métabolisme, les études se sont focalisées sur les mécanismes sous-tendant la sortie du cholestérol de ces compartiments, et

son transport jusqu'à des zones de la membrane plasmique accessibles aux transporteurs médiant l'efflux vers les lipoprotéines.

L'étude de la maladie de Niemann-Pick chez l'humain, une dysfonction héréditaire et létale du stockage lysosomal, a permis d'identifier les gènes *NPC-1* (Niemann-Pick C-1 protein) et *NPC-2* (Pentchev PG., *Biochim Biophys Acta* 2004). Leurs protéines présentent un domaine liant le cholestérol, NPC-2 transportant le cholestérol des vésicules internes du lysosome jusqu'à NPC-1, ancré dans sa membrane (Kwon HJ. Et al, *Cell* 2009 ; Xu S. et al, *J Biol Chem* 2007) ([Figure 11](#)). L'étape suivante, la sortie du cholestérol de l'endosome tardif ou lysosome, n'a toujours pas été décryptée ; cependant NPC-1 présente un domaine SSD «sterol sensing domain » en commun avec les protéines SCAP, qui semble donc être liée à leur fonction d'export (Davies JP et al, *J Biol Chem* 2000). (Mesmin B. et al, *Biochim Biophys Acta* 2009)

L'ensemble de ces voies de signalisation et d'adressage, intégrés au macrophage spumeux, synthétisant des esters en excès, est présenté [figure 11](#).

(Légende figure 11) Dans la cellule spumeuse, le cholestérol en excès provenant des LDL internalisé par les récepteurs Scavengers et le LDLr est estérifié puis stocké sous forme de gouttelettes lipidiques dans les endosomes et les lysosomes. Si le cycle estérification/hydrolyse est efficace, les esters seront hydrolysés par les CEHs et l'autophagie. Le cholestérol libre en excès sera détecté dans la membrane du réticulum endoplasmique ou il pourra activer l'expression de gènes de LTPs pouvant le transporter à la membrane. Egalement, le cholestérol hydrolysé par autophagie dans les lysosomes pourra être transporté à la membrane plasmique jusqu'à des zones spécifiques d'où il pourra être exporté par le transporteur ABCA1 (voir [figure 12](#) suivante)

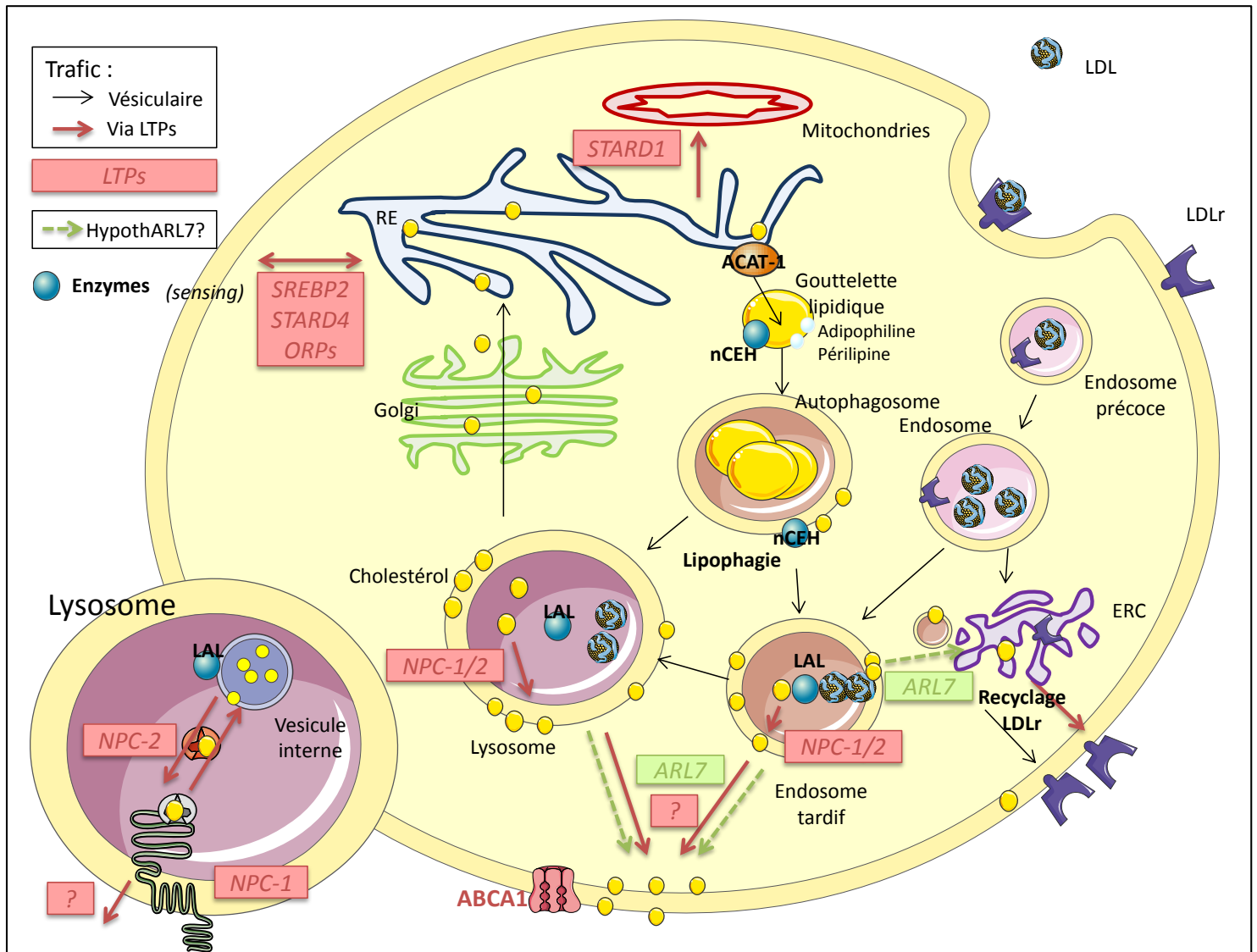


Figure 11 – Transport vésiculaire et non-vésiculaire du cholestérol dans la cellule spumeuse

c) L'hypothèse ARL7

Les familles de protéines ARF (ADP-ribosylation factors) et ARL (ARF-like) sont des GTPases impliquées dans le trafic intracellulaire et le transport de vésicules. ARL7 est un membre de cette famille identifié comme une protéine de transport entre organites cellulaires (Jacobs S. et al, FEBS letters 1999). Si le mécanisme exact n'a toujours pas été identifié, des études plus récentes ont démontré qu'ARL7 est impliqué dans le transport du cholestérol libre de compartiments intracellulaires jusqu'à ABCA1. En effet, la transfection d'une forme inactive d'ARL7 diminue l'efflux vers apoA-I (Engel T. et al, FEBS 2004). De plus,

son expression est dépendante de l'activation LXR, qui stimule l'efflux de cholestérol cellulaire (Hong C. et al, J Lipid res 2011).

Ainsi, dans la première des études présentées ici, nous avons émis l'hypothèse qu'ARL7 pourrait médier le transport du cholestérol entre l'endosome tardif ou le lysosome et la membrane plasmique, partiellement ou totalement (**hypothèse verte** sur la **figure 11**)

Une autre étude démontre qu'ARL7 interagit avec l' α -tubuline, une protéine des microtubules, part du cytosquelette, et transporterait des vésicules de l'endosome tardif au compartiment de recyclage endosomal (Wei S. et al, Biochem Biophys Res Commun 2009). Si le cholestérol est transporté dans ce compartiment, il pourra être retourné à la membrane via le même mécanisme qui recycle le LDLr internalisé (**figure 11**).

4. Le cholestérol à la membrane

a) Les radeaux lipidiques

La membrane plasmique est composée de structures hétérogènes structurellement et fonctionnellement. Les radeaux lipidiques sont des domaines spécialisés riches en sphingolipides et en cholestérol. Ils sont des « ilots » rigides et ordonnés, dans une membrane plus fluide, et contiennent un set de protéine spécifique.

Ainsi ces structures sont impliquées dans certaines fonctions précises du macrophage, parmi lesquelles la présentation d'antigène (Korzeniowski M. et al, Biochemistry 2003), la phagocytose (Kwiatkowska K. et al, J Cell Sci 2003) et l'efflux de cholestérol (Gaus K. et al, FASEB 2004).

Ces domaines comprennent ainsi deux types de structures :

- Les cavéoles, invaginations de la membrane plasmique contenant notamment la protéine de structure cavéoline-1
- Les radeaux lipidiques « non cavéolaires »

L'implication de ces structures dans le développement de l'athérosclérose est actuellement au centre de l'attention, pas seulement au niveau du macrophage. En effet,

elles contiennent de nombreuses protéines impliquées dans l'adhésion, la migration et la transduction de signaux divers (Simons K. et al, Nat Rev Mol Cell Biol 2000).

Notamment, le rôle des cavéoles dans le développement de la plaque d'athérome est mitigé. Les souris apoE^{-/-} déficientes pour la cavéoline-1 sont protégées contre le développement de l'athérosclérose (Frank PG. Et al, ATVB 2004) ; les cavéoles joueraient un rôle important dans l'expression endothéliale des molécules d'adhésion des monocytes et l'inhibition de l'eNOS (Fernandez-Hernando C. et al, Cell Metab 2009 and Am J Pathol 2010). Par contre, il semblerait que l'expression de la cavéoline-1 stabilise la plaque d'athérome, notamment en empêchant l'activité de la MMP-9 (Rodriguez-Feo JA. Et al, PLoS ONE 2008).

Egalement, la déplétion en cholestérol des radeaux lipidiques induite par l'ApoA-I et les HDL est une hypothèse sérieuse pour expliquer leurs propriétés anti-inflammatoires (Bursill CA. Et al, ATVB 2010). En effet, certains récepteurs PRR responsables du déclenchement de l'inflammation comme CCR5 ou CD40 se trouveraient dans ces domaines en particulier (Yin K. et al, J Atheroscler Thromb 2012 ; Cardaba CM. Et al, Cell Signal 2008). Le lien entre l'inflammation et l'homéostasie lipidique serait donc en partie médié par les radeaux lipidiques (Haas MJ. Et al, Curr Opin Infect Dis 2011).

b) Radeaux lipidiques, efflux de cholestérol et inflammation

Une étude récente a en effet démontré que l'export du cholestérol sur les lipoprotéines dérivées de l'apoA-I par les cellules spumeuses, un mécanisme athéroprotecteur détaillé dans la partie B, nécessite une interaction de ces dernières avec les radeaux lipidiques (Gaus K. et al, FASEB J 2004).

Plus précisément, les cavéoles se lient à l'apoA-I mais ne participent pas à l'efflux cellulaire de cholestérol (Le Lay S. et al, PLoS ONE 2011). Les radeaux non-cavéolaires, par contre, semblent jouer un rôle important. Ces derniers ont été séparés en plusieurs fractions en fonction de leur résistance à divers détergents, afin d'étudier l'hétérogénéité de la répartition des protéines et donc des fonctions biologiques. Il semble qu'ABCA1, transporteur responsable de l'efflux, soit bien exprimé dans la fraction résistante au lubrol, d'où il exporte le cholestérol vers l'apoA-I mais aussi les HDL en interagissant avec leur enzyme de surface paraoxinase-1 (PON-1) (Berrougui H. et al, Free Rad Biol Med 2012).

Cette interaction avec les radeaux lipidiques est indispensable pour « initier » l'efflux cellulaire de cholestérol dit « rapide », car le premier à survenir dans le temps, soit dans les 3 premières heures suivant le contact avec les lipoprotéines acceptrices. Sans celui-ci, pas d'efflux de cholestérol « lent » possible, 4 heures plus tard, qui exporte une quantité bien plus importante de cholestérol provenant des autres zones de la membrane plasmique (Gaus K. et al, Biochemistry 2001).

L'incubation des macrophages avec des ApoA-1 et HDL déplete la membrane plasmique en cholestérol, en particulier les radeaux lipidiques qui sont donc les premières « cibles » de l'efflux. Notamment, il a été démontré que l'enzyme PON-1, clairement impliqué dans ce mécanisme, diminue l'oxydation des lipides et la synthèse de ROS (Marsillach J. et al, Lipids Health Dis 2010 ; Rozenberg O. et al, Atherosclerosis 2005), l'internalisation des LDLox par CD36 (Fuhrman B. et al, Atherosclerosis 2002), la sécrétion de MCP-1 (Watson AD. Et al, J Clin Invest 1995) et plus généralement diminue le développement des plaques chez la souris (Tward A. et al, Circulation 2002). L'interaction entre la PON-1 des HDL et ABCA1 permettrait l'export du cholestérol des radeaux lipidiques via le transporteur, déplaçant en cholestérol et destabilisant ainsi le radeau lipidique, qui ne pourrait alors plus contenir autant de protéines fonctionnelles pour transduire un signal oxydatif qu'avant.

Les radeaux lipidiques auraient donc un double rôle dans le développement de la cellule spumeuse :

- Premièrement, la présence du cholestérol en abondance en leur sein est un pré-requis au déclenchement de l'efflux de cholestérol par les lipoprotéines
- Ensuite, ils sont le point d'attache à la membrane de protéines impliquées dans le stress oxydatif (NADPH oxydase), la transduction de certains signaux inflammatoires (CD40, TLRs) et même l'internalisation des LDLox (CD36), participant ainsi à la formation de la cellule spumeuse. Leur déplétion en cholestérol présente également un volet athéroprotecteur.

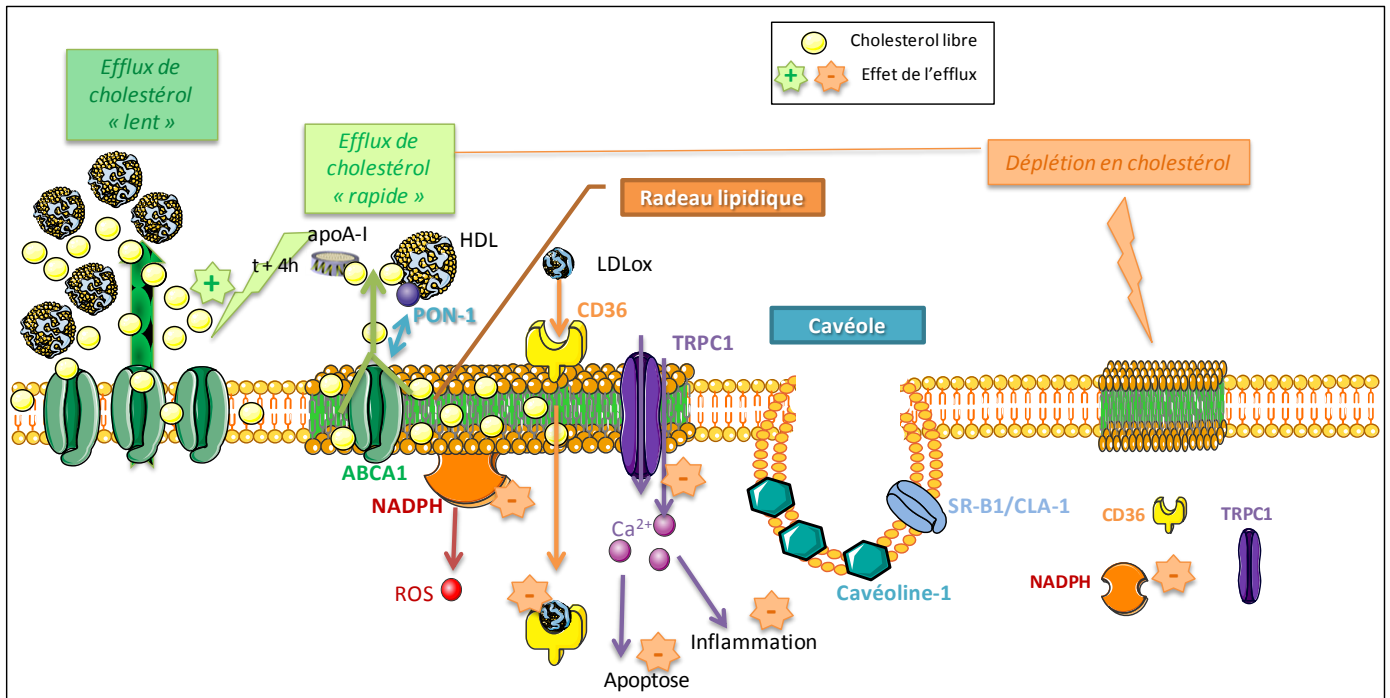


Figure 12 – Les radeaux lipidiques et l’efflux de cholestérol

Les radeaux lipidiques sont des zones structurales et fonctionnelles bien particulières de la membrane plasmique : leur conformation leur permet de « contenir » plusieurs protéines et canaux responsables notamment de l’initiation de l’efflux de cholestérol cellulaire et de la transduction du signal inflammatoire.

B. Le cholestérol dans l'organisme

Ainsi, le macrophage, comme d'autres types cellulaires, répond à l'accumulation excessive de cholestérol en activant des voies de signalisation qui vont promouvoir l'export de ce dernier vers des lipoprotéines, les ApoA-I et les HDL en particulier. L'importance de l'efflux de cholestérol cellulaire des cellules spumeuses vers les apoA-I et HDL dans la protection contre les maladies cardiovasculaires a été démontrée. Il est la première et plus importante étape du Retour du Cholestérol des Tissus périphériques vers le Foie, où Transport Inverse du Cholestérol (Reverse Cholestérol transport RCT). Du foie le cholestérol pourra être excrété via la bile (Khéra, Cuchel et al, 2011). L'idée du RCT a été initiée il y a maintenant presque 50 ans (Glomset JA. Et al, Biochim Biophys Acta 1964, J Lip Res 1968). Aujourd'hui, il reste largement étudié car il contribue au rôle athéroprotecteur des HDL.

Afin de comprendre mieux l'athéroprotection conférée par ce mécanisme, le cycle complet du cholestérol sera décrit dans cette partie :

- Les 2 voies d'absorption et de transport du cholestérol (et des lipides plus largement), entéro-hépatiques :
 - la voie exogène d'absorption post-prandiale
 - la voie endogène de synthèse hépatique
- Le transport inverse du cholestérol, divisé en 2 parties :
 - l'efflux de cholestérol cellulaire, son étape d'initiation. Cette étape, en particulier dans le macrophage spumeux, sera particulièrement détaillée ici, puisque ma première étude s'est centrée sur son analyse
 - le transport-retour des lipides et en particulier du cholestérol des tissus périphériques (macrophages compris) vers le foie, ou RCT jusqu'à son excrétion dans les fèces

1. Absorption et transport des lipides dans le plasma

La lésion d'athérome et les macrophages qu'elle contient sont donc en interface avec la circulation sanguine, et plus précisément avec le plasma sanguin contenant les lipides. Molécules hydrophobes, celles-ci nécessitent d'être « solubilisées » et transportées par des complexes multiprotéiques, les lipoprotéines.

Ces lipoprotéines sont des assemblages précis et proportionnés de différents lipides et de protéines structurantes, les apolipoprotéines. Leur surface est hydrophile est composé de phospholipides (amphiphiles), de cholestérol libre et de ces apolipoprotéines, tandis que leur cœur hydrophobe contient les triglycérides (TG) et esters de cholestérol (CE).

Il existe une grande hétérogénéité tant structurale que fonctionnelle de ces lipoprotéines plasmatiques, résumée dans le [tableau 2](#).

Type de lipoprotéines	Densité	Taille (nm)	Demi Vie	Proportion EC/TG	Apolipoprotéines (principale)	Fonction majeure (Athérosclérose)
Chylomicrons	0,93	75-1200	10 min	1/19	B48, C, E	Transport Lipides Post prandiaux Exogènes
VLDL	0,93 - 1,006	30-80	4 - 6 h	1/3,3	B100, C, E	Transport Lipides hépatiques endogènes
IDL	1,006-1,019	27-35		1/3,5	B100, E	
LDL	1,019 - 1,063	18-27	< 4 jours	1/0,23	B100	Transport Cholestérol endogène / RCT
HDL	1,063 - 1,21	7 -12	4 jours	1/0,2	AI, AII, C, E	RCT

Tableau 2 – Caractérisation des lipoprotéines humaines

a) Les chylomicrons, lipoprotéines post-prandiales

Les chylomicrons sont les premières lipoprotéines à prendre en charge les lipides venant de l'alimentation ; elles sont de grande taille, de faible densité, et leur composante protéique formée de l'ApoB tronquée, l'ApoB-48, est stabilisée par l'enzyme MTP puis sécrétée, uniquement par les entérocytes, cellules de l'épithélium intestinal. Elles assurent le

transport des lipides de l'alimentation, en grande majorité des TG jusqu'au foie. Sécrétées au pôle basolatéral des entérocytes, elles passent tout d'abord dans le système lymphatique puis dans la circulation sanguine générale. Les TG des CM sont très rapidement hydrolysés en acides gras dans le plasma, notamment dans les capillaires, par la Lipoprotéine Lipase (LPL), ce qui diminuera leur cœur lipidique, modifiera leur structure et libèrera une partie de leurs éléments de surface (CL, PL, protéines). Les TG et CE des résidus de chylomicrons sont ensuite hydrolysés dans l'espace de Disse par la lipase hépatique (LH) et captés par les cellules hépatiques via le LDLr ou la lipoprotein-receptor related protein (LRP), reconnaissant notamment l'ApoE, entrant dans la composition des chylomicrons. Ce métabolisme est très rapide, leur demi-vie n'excédant pas les 10 minutes ; il correspond à l'apport exogène de lipides par l'alimentation. (Hussain MM. Et al, Biochim biophys Acta 1996)

b) La voie endogène d'apport

Ou transport des lipides du foie vers les tissus périphériques.

Le foie sera ensuite capable de synthétiser ses propres lipoprotéines endogènes, les lipoprotéines de très faible densité (very-low-density-lipoproteins VLDL) en tout premier lieu, et leur composante principale l'ApoB100. Ceux-ci sont constitués en grande majorité de triglycérides resynthétisés à partir des acides gras mais également d'une quantité minime d'esters de cholestérol, dépendante de l'activité ACAT et du niveau de cholestérol hépatique.

Les VLDL subiront ensuite le même traitement que les CM : la LPL et la LH hydrolyseront leurs triglycérides, réduisant leur cœur lipidique, et augmentant la proportion d'esters de cholestérol qu'ils contiennent, formant transitoirement des particules IDL lipoprotéines de densité intermédiaire (Intermediate Density Lipoprotein IDL), toujours riches en TG, et enfin les LDL, lipoprotéines riches en esters de cholestérol. Chez l'homme, ce processus est accéléré par l'action de la protéine de transfert des esters de cholestérol (Cholesteryl-Ester Transfer Protein CETP), qui transfère les esters de cholestérol des HDL aux LDL en formation. Chez des espèces comme la souris ou le rat, l'activité CETP est absente et l'incorporation des esters est uniquement dépendante de l'ACAT hépatique ; ce qui souligne

une différence majeure de gestion de l'homéostasie lipidique générale entre l'Homme et les rongeurs, très utilisés pour la recherche dans le domaine de l'athérosclérose.

La captation de ces lipoprotéines à partir du compartiment plasmatique est toujours possible, que ce soit par le foie ou les tissus périphériques (incluant les macrophages de la plaque). Dans le cas de ces derniers elle se fait par les récepteurs VLDLr, LDLr, LRP et également apoER2, le récepteur de l'ApoE. Le rôle pathologique des récepteurs scavengers dans la captation des LDL modifiées a été évoqué chapitre I. Un seul d'entre eux, SR-BI/CLA-1, peut se lier aux VLDL/IDL/LDL pour capter leur cholestérol, toutefois avec une affinité bien moindre qu'aux HDL (Gilotte-Taylor K. et al, J Lipid Res 2001).

2. L'efflux cellulaire de cholestérol

L'efflux de cholestérol cellulaire est avant tout rendu possible par le transport à la membrane de cholestérol libre non-estérifié. Dans le macrophage, même spumeux, les mécanismes décrits précédemment s'assurent de la biodisponibilité de ce cholestérol, même s'ils s'enrayent au fur et à mesure de la progression de la maladie. Ainsi, même déconnecté du RCT, l'efflux de cholestérol retarde la progression de l'athérosclérose et est un rempart de plus contre l'acquisition du phénotype cellule spumeuse. Des études récentes démontrent également qu'il est étroitement lié à l'inflammation.

Ce mécanisme est complexe, et fait intervenir plusieurs voies. La contribution relative de chacune de ces voies est différente premièrement entre les macrophages murins et humains, ce qui complique l'analogie faite encore très couramment entre modèles humains *in vitro* et animaux *in vivo* ; deuxièmement, entre les macrophages et les cellules spumeuses gorgées d'esters.

Nous nous intéresserons particulièrement au décryptage des mécanismes sous-tendants la stimulation de l'efflux de cholestérol cellulaire du macrophage spumeux et humain dans la première étude.

a) La diffusion passive

Il existe premièrement une diffusion passive du cholestérol libre de la membrane plasmique dans l'environnement du macrophage, qui est une phase aqueuse. Elle peut avoir lieu grâce à un gradient de cholestérol entre les cellules et les accepteurs (Philips MC. Et al, J Biol Chem 1987). Mécanistiquement, elle résulte de la collision entre les molécules de cholestérol libre à la surface de la membrane et les HDL présentes dans l'espace extracellulaire, indépendamment de leur taille, structure ou composition (Davidson WS. Et al, J Biol Chem 1995). Ce mécanisme est également bidirectionnel (il est également être responsable de la captation de cholestérol par le macrophage).

La diffusion passive est considérée comme inefficace dans le contexte de l'efflux de cholestérol cellulaire de la cellule spumeuse, murine comme humaine. (Adorni MP. Et al, J Lipid Res 2007).

b) Le transporteur ABCA1

Le transporteur ABCA1 est une protéine composé de 2 motifs, comportant chacun 6 domaines transmembranaires, une boucle extracellulaire et d'un domaine cytosolique de liaison à une molécule d'ATP, source d'énergie pour effectuer un transport actif de lipides cellulaires et membranaires vers des transporteurs extracellulaires (Figure 13). Son gène, porté par le chromosome 9 au locus 31, est exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme.

Son rôle est de faciliter l'export du cholestérol libre vers les ApoA-I, pauvres en lipides mais également les HDL (Duong PT. Et al, J Lipid res 2006).

En effet, in vivo, l'invalidation d'ABCA1 spécifiquement dans les lignées myéloïdes de souris apoE^{-/-} ou LDLr^{-/-} augmente significativement la taille des lésions développées suite à un régime riche en graisse, sans

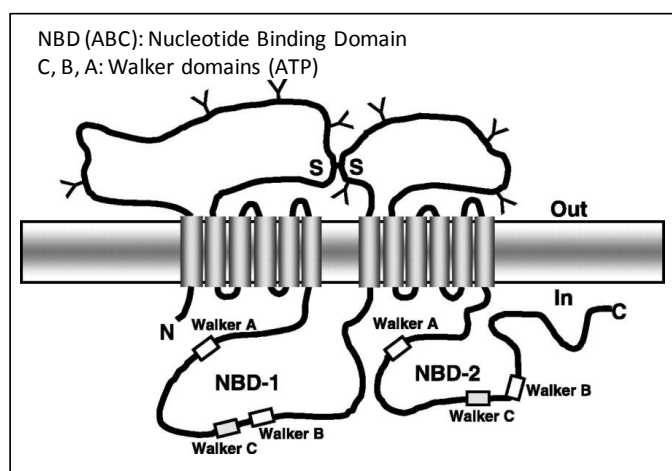


Figure 13 – Le récepteur ABCA1
(Oram JF et al, Physiol Rev 2005)

augmentation du taux de HDL-C (Aiello RJ. Et al, ATVB 2002 ; van Eck M. et al, Proc Natl Acad Sci U S A 2002). Egalement, les souris LDLr^{+/-} transplantées avec de la moëlle osseuse ABCA1^{-/-} accumulent des cellules spumeuses dans le péritoine, et une augmentation la taille des lésions est également observable (Yvan-Charvet L. et al, J Clin Invest 2007). Tout ceci démontre qu'ABCA1 dans le macrophage est capable de protéger, via sa fonction d'efflux de cholestérol cellulaire, de l'accumulation de cellules spumeuses et du développement de lésion d'athérome.

Chez l'homme de nombreuses études sur ABCA1 ont pu être menées grâce à de nombreuses mutations du gène. Premièrement, des mutations à l'état hétérozygote ont été connectées à une modulation modérée du taux de HDL-C systémique (Frikke-Schmidt R. et al, J Clin Invest 2004), et caractérisées fonctionnellement (Singaraja RR. Et al, Circ Res 2006). Ensuite, les mutations à l'état homozygote existent et sont responsables de la maladie de Tangier, un syndrome rare caractérisé par des taux de HDL très faibles. Les mutations perte de fonction empêchent le transporteur de lipider l'ApoA-I native, première étape de la formation des HDL matures (Rust S. et al, Nat Genet 1999). En effet, les macrophages issus de patients Tangier ont une capacité à exporter le cholestérol vers l'ApoA-I nulle et réduite pour les HDL (Larrède S. et al, ATVB 2009). Ainsi, chez l'homme, ABCA1 seul a un rôle prépondérant dans le mécanisme de lipidation de l'ApoA-I ; sa perte de fonction n'est pas compensée et entraîne une incapacité à initier la formation des HDL.

Les mécanismes sous-tendant l'efflux cellulaire de cholestérol sont ainsi différents entre les deux modèles humain et murin, ainsi que la contribution relative de chaque « voie » à participer à ce dernier. Notamment chez l'homme, la voie ABCA1 semble être prépondérante. La première étude de mon projet a visé à clarifier davantage ces mécanismes chez l'humain spécifiquement et décrit un mécanisme uniquement ABCA1 dépendant.

Ainsi, les régulations sous-tendant l'expression et la présence du transporteur ABCA1 à la membrane des cellules spumeuses ont été - et sont toujours largement - au centre de l'attention. L'internalisation de LDLox et l'accumulation d'esters vont augmenter la présence dans le cytosol d'oxystérols, cholestérol oxydé et cytotoxique, détectés par le récepteur nucléaire et facteur de transcription LXR. Ce dernier est responsable de l'activation de la transcription des gènes des transporteurs ABCA1, ABCG1, et de l'apolipoprotéine E dans le macrophage humain. LXR est donc l'intermédiaire entre la charge en cholestérol et son

oxydation dans le macrophage et l'augmentation de l'efflux cellulaire de cholestérol, chez l'homme et la souris (Naik SU. Et al, *Circulation* 2006). Le décryptage de la régulation LXR a été au centre de mes études et sera décrite plus en détail dans la partie C.

L'inflammation a également un impact controversé sur l'expression d'ABCA1. Il a été démontré que les cytokines pro-inflammatoires IFN γ diminue la transcription du gène, et que la cytokine anti-inflammatoire IL-10 protège contre cette inhibition et diminue la formation d'esters de cholestérol (Mei CL. Et al, *Cell Biol Int* 2007). Cette étude démontre également que TNF α réprime ABCA1, alors qu'une autre montre au contraire la capacité de la cytokine à la capacité d'induire l'expression du transporteur via NF- κ B dans le macrophage (Gerbode-Giannone MC., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007) Une étude de notre équipe a récemment démontré qu'IL-6, cytokine plutôt décrite comme pro-inflammatoire, induit l'expression d'ABCA1 et protège le macrophage contre l'accumulation de cholestérol (Frisdal E. et al, *J Biol Chem* 2011).

Le stress oxydant (Marcil V. et al, *Cardiovasc Res* 2006) et une hyperglycémie (Tang C. et al, *J Lipid Res* 2010 ; Mauterer R. et al, *Exp Mol Med* 2009) sont d'autres facteurs qui réduisent l'expression du transporteur. Ainsi, ces facteurs de risques responsables de la formation de la lésion comme le stress oxydant et le diabète semblent empêcher l'expression d'ABCA1 à la membrane et ainsi promouvoir un cercle vicieux aboutissant à la formation de la plaque. L'implication de l'inflammation est plus complexe et diverse.

D'autres études s'intéressent à la régulation d'ABCA1, et plusieurs modèles ont été proposés pour son expression à la membrane. Notamment, ABCA1 semble être également exprimée à la surface des endosomes où il faciliterait également la mobilisation du cholestérol. Les Macrophages Tangier montrent une accumulation de cholestérol et de NPC-1 à la membrane des endosomes tardifs (Neufeld EB. Et al, *J Bio Cell* 2004). Egalement, sa liaison avec de l'ApoA-I fonctionnelle est nécessaire pour empêcher sa dégradation après internalisation dans la cellule et promeut un recyclage rapide à la membrane, une fois l'ApoA-I enrichie en lipides (Lu R. et al, *ATVB* 2008) ; ce mécanisme n'est pas indispensable en conditions normolipidémiques mais est requis pour l'efflux de cholestérol à partir de cellules spumeuses (Azuma Y. et al, *Genes Cells* 2009). L'activation de la Janus Kinase 2 (JAK2) concomittante à la liaison ApoA-I/ABCA1 facilite la lipidation de la lipoprotéine en augmentant sa liaison au transporteur ; un mécanisme également important pour l'efflux via ABCA1, et qui serait également important pour la répression de l'inflammation induite par la

liaison de l'ApoA-I et l'activation d'un axe ABCA1/JAK2/STAT3 (Tang C. et al, J Biol Chem 2009 ; Vaughan AM. Et al, J Lipid Res 2009).

c) Le transporteur ABCG1

ABCG1 est un transporteur qui présente, comme ABCA1, un domaine N-terminal cytosolique capable de lier l'ATP, source d'énergie, et des domaines transmembranaires responsables de son ancrage à la membrane (Figure 14). L'expression de son gène est ubiquitaire chez l'homme, bien qu'à des niveaux variés : il est présent notamment dans le cerveau, les poumons, le foie, les surrénales et les macrophages. Il code pour 3 isoformes de la protéine, dont une majeure de 678 acides aminés.

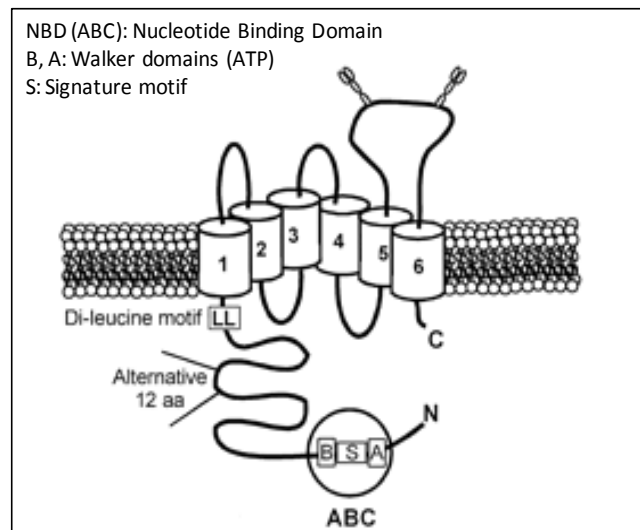


Figure 14 – Le récepteur ABCG1
(Schmitz G. et al, J Lipid Res 2001)

Le transporteur ABCG1 a pour rôle de médier l'efflux de cholestérol cellulaire vers les particules HDL matures, sans pour autant les lier comme ABCA1 (Wang N. et al, Proc Natl Acad Sci 2004). Les macrophages de souris ABCG1^{-/-} sont incapables de promouvoir ce mécanisme, ces souris accumulant des macrophages spumeux dans plusieurs tissus, dont le foie et les poumons ; cependant, elles ne présentent aucune altération des profils lipidiques et des lipoprotéines dans le plasma – ce qui remet en question l'importance physiologique de l'efflux ABCG1 (Kennedy MA. Et al, Cell Metabolism 2005). Enfin, l'impact de l'inactivation d'ABCG1 dans les lignées myéloïdes sur le développement de lésions d'athéromes est controversé dans la bibliographie.

- Deux études démontrent que l'inactivation d'ABCG1 spécifiquement dans les lignées myéloïdes de souris LDLr^{-/-} ou apoE^{-/-} diminue significativement la taille des lésions d'athéromes (Baldan A. et al, ATVB 2006 ; Ranalletta M. et al, ATVB 2007).

- D'autres études démontrent elles l'effet inverse sur l'athérosclérose (Out R. et al, ATVB 2006).

- Dans une autre étude la délétion spécifique d'ABCG1 ne semble elle n'avoir aucun effet ni sur la cholestérolémie ni sur le développement de lésions, confirmant la controverse (Out R. et al, ATVB 2008). Les souris LDLr^{+/-} transplantées avec de la moëlle osseuse ABCG1^{-/-} accumulent également bien des cellules spumeuses dans le péritoine, sans aucun impact cependant sur la taille des lésions (Yvan-Charvet L. et al, J Clin Invest 2007).

Il semble cependant que le transporteur ABCG1, comme l'apoptose, ait un rôle protecteur dans les phases précoces de l'athérosclérose et délétère dans les phases tardives (Out R. et al, ATVB 2007 ; Meurs I. et al, Atherosclerosis 2012). En effet, il a en effet été démontré qu'ABCG1 a la capacité d'activer l'apoptose dans le macrophage humain (Seres L. et al, Biochim Biophys Acta 2008)

Afin d'expliquer cette hétérogénéité, il a également été proposé l'hypothèse d'une synergie entre ABCA1 et ABCG1 : l'expression du premier pourrait être augmentée pour compenser l'absence du second. Les effets in vivo sur le développement de lésions seraient proportionnels à l'hypercholestérolémie induite secondairement (Gelissen IC. Et al, ATVB 2006).

Chez la souris, la double délétion ABCA1/ABCG1 entraîne une hypercholestérolémie sévère, une accumulation de cellule spumeuse dans les tissus, l'incapacité des macrophages à promouvoir l'efflux cellulaire de cholestérol et une diminution du RCT (Out R. et al, Circ Res 2008). L'invalidation combinée des deux transporteurs dans les lignées myéloïdes a également été étudiée. La greffe de moëlle osseuse ABCA1/G1^{-/-} dans des souris LDLr^{+/-} bouleverse le phénotype des macrophages, désormais également incapables de médier l'efflux cellulaire de cholestérol, gorgés de lipides, présentant une très forte réponse inflammatoire (Westerterp M. et al, Circ Res 2013) et accélérant le développement de lésions (Yvan-Charvet L. et al, J Clin Invest 2007). Dans une autre étude la même transplantation de moëlle osseuse ABCA1/G1^{-/-} chez des souris LDLr^{-/-} induit la même accumulation drastique de cholestérol dans les macrophages tissulaires, mais n'a que peu d'effet sur la cholestérolémie et les lésions, en particulier en comparaison des modèles ayant reçu des moelles osseuses ABCA1^{-/-}. (Out R. et al, ATVB 2008).

Dans les macrophages péritonéaux murins, ABCG1 est décrit comme localisé à la membrane des endosomes et absent de la membrane plasmique, lui conférant davantage un

rôle dans le transport intracellulaire des lipides (Tarling EJ et al, Proc Natl Acad Sci 2011) ; une autre étude démontre que sa relocalisation à la membrane plasmique est induite par l'activation LXR (Wang N. et al, ATVB 2006).

Chez l'humain, le rôle d'ABCG1 dans le développement de l'athérosclérose, l'efflux de cholestérol du macrophage spumeux sont controversés. En effet, des études du polymorphisme du gène ABCG1 n'ont détecté aucune corrélation de l'expression du gène chez ces patients avec les niveaux de lipides/lipoprotéines dans le plasma (Furuyama S. et al, J atheroscl Thromb 2009). Par contre, il semblerait que les individus porteurs d'un génotype diminuant l'expression d'ABCG1 dans le macrophage montrent un risque moins important de développer des MCV (Xu Y. et al, Atherosclerosis 2011). En effet, une étude récente de notre laboratoire a démontré que dans le macrophage humain, ABCG1 est bien exprimé mais ne participe pas à l'efflux de cholestérol cellulaire vers les HDL (Larrère S. et al, ATVB 2009). Ces résultats ont été confirmés par une autre étude (Chinetti-Gbaguidi G. et al, Circ res 2011). L'étude publiée la plus récente de notre équipe, a permis d'identifier le rôle réel d'ABCG1 dans la biodisponibilité de la lipoprotéine lipase (LPL) et la formation de la cellule spumeuse ; ce qui appuie l'idée d'un ABCG1 pro-athérogène chez l'humain (Olivier M. et al, ATVB 2012).

d) Le récepteur SR-B1/CLA-1

Le récepteur SR-B1/CLA-1 est un membre de la famille des Scavenger receptors présentée précédemment, et présente 30% d'homologie de séquence avec les autres scavengers (Figure 5). Sa forme murine est appelée Sr-b1 (Scavenger receptor type B1) alors que son homologue humain est SR-B1/CLA-1 (CD36 and LIMPII analogous-1). Leur gène *Scarb1* (murin) ou *SCARB1* (humain) est fortement exprimé dans le foie, mais également les tissus stéroïdogènes et le macrophage. Il présente une large boucle extracellulaire ancrée dans la membrane plasmique par ses deux extrémités N et C-terminales (Figure 15).

Cette structure lui permet de faciliter le flux bidirectionnel de cholestérol libre entre les membranes cellulaires et les lipoprotéines, notamment HDL, dans le sens du gradient. De plus, il ne peut initier l'efflux de cholestérol vers les apolipoprotéines seules (notamment ApoA-I) car la présence de phospholipides sur les particules cibles est un pré-requis (De la Llera-Moya M. et al, J Lipid Res, 1999). Son rôle a été décrit très en détail dans le foie, où il va aider à la recaptation du cholestérol libre des HDL circulantes, qu'il lie avec une forte affinité, une étape critique du transport inverse du cholestérol

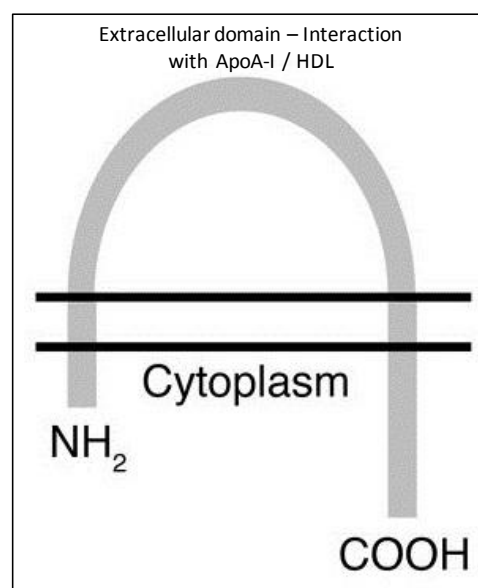


Figure 15 – Le récepteur SR-B1/CLA-1
(Assanasen C. et al, J Clin Inv 2005)

(RCT). En effet, sa surexpression réduit sensiblement le taux plasmatique de HDL-C et augmente la sécrétion biliaire de cholestérol – diminuant l'athérosclérose – (Ueda Y. et al, J Biol Chem 2000) alors que son inactivation a l'effet inverse (Huby T. et al, J Clin Invest 2006). De plus, la CETP (Cholestérol Ester Transfer Protein), transférant le cholestérol des HDL vers les LDL, lorsqu'on reconstitue son expression chez la souris, atténue fortement les effets de la déficience hépatique en SR-B1 sur le RCT et l'athérosclérose. Les animaux CETP-transgéniques présentent en effet bien plus de LDL-C, revenant au foie par la voie LDLr – diminuant l'impact de la voie HDL-SR-B1 (El Bouhassani M. et al, J Biol Chem 2011). Cette étude souligne également le caractère espèce-dépendant des régulations relatives à l'homéostasie générale du cholestérol et la nécessité de confirmer les résultats murins chez l'humain ou chez des animaux « à profil humanisé ».

In vivo chez la souris, les expériences de transfert de moelle osseuses SR-B1^{-/-} augmentent et accélèrent le développement des lésions, sans pour autant avoir un impact sur l'efflux cellulaire macrophage-spécifique (Zhang W. et al, Circulation 2003 ; Covey SD et al, ATVB 2003 ; Brundert M. et al, J Lipid Res 2006 ; Wang et al, J Clin Inv 2007). Une autre étude montre que le rôle myéloïde-spécifique de SR-B1 dans le développement de l'athérosclérose est phase-dépendant chez les souris LDLr^{-/-} : SR-B1 est pro-athérogène dans les phases précoces, et athéroprotecteur dans les phases tardives (van Eck M. et al, Am J Pathol 2004).

Il a été démontré que SR-B1 se situe majoritairement au niveau des cavéoles dans la membrane plasmique (Graf GA. Et al, J Biol Chem 1999), ce qui peut expliquer cette absence d'effet puisqu'on a vu précédemment l'absence d'effet de ces domaines membranaires dans l'efflux (Le Lay S. et al, PLOS ONE 2011 ; Schéma 12). Cependant, SR-B1 a un rôle dans l'organisation du cholestérol et sa distribution au sein de la membrane plasmique (Kellner-Weiber G. et al, Biochemistry 2000). Le récepteur SR-B1 va également, en réponse à la liaison avec un HDL, transduire un signal via la protéine PDZK1 (interagissant avec le récepteur par son domaine PDZ), notamment en activant une cascade de signalisation PKC/MAPK, qui jouera un rôle important dans le RCT et la fonction endothéliale, notamment dans l'angiogénèse et la synthèse de NO par l'activation de l'eNOS (Assanasek C. et al, J Clin Invest 2005 ; Mineo C. et al, Circ Res 2006). Tous ont des propriétés athéroprotectrices. Cependant, SR-B1 inhibe l'efflux de cholestérol ABCA1 et ABCG1-dépendant (Chen W. et al, J Biol Chem 2000 ; Yvan-Charvet L. et al, J Lipid Res 2007). Ainsi, des études s'intéressent au potentiel rôle anti-athérogénique de SR-B1 dans d'autres types cellulaires découlant des lignées myéloïdes, telles les plaquettes (Ma Y. et al, Blood 2010).

Il a également été démontré que SR-B1 joue un rôle anti-inflammatoire, notamment via la formation des HDL matures mais aussi par leur capacité à lier et internaliser le lipopolysaccharide (LPS), responsable de l'activation de l'inflammation dans des leucocytes, en particulier macrophages, via le récepteur TLR4 (Vishnyakova TG. Et al, J Biol Chem 2003). En effet, SR-B1 a une action anti-inflammatoire dans le macrophage, en réduisant sensiblement l'activation de NF- κ B TLR4-dépendante, également impliquée dans l'athérosclérose (Cai L. et al, J Lipid Res 2012).

Le rôle du récepteur SR-B1/CLA-1 chez l'humain dans l'efflux de cholestérol du macrophage et l'athérosclérose est très peu voire pas décrit. La première mutation perte de fonction du gène SCARB1 identifiée, P297S, a été décrite par Vergeer et al : ses porteurs présentent des taux élevés de HDL-C plasmatique, et une capacité réduite à promouvoir l'efflux de cholestérol cellulaire (Vergeer M. et al, NEJM 2011).

e) L'apolipoprotéine E

L'implication de l'apolipoprotéine E (ApoE) dans l'athérosclérose et les mécanismes d'efflux et de RCT chez la souris ne fait aucun doute, puisque les souris apoE^{-/-} sont un des deux modèles murins majeurs développant des lésions d'athéromes et permettant l'étude de celle-ci. Cette lipoprotéine, présente en quantité non négligeable dans le plasma humain comme murin est importante dans l'homéostasie lipidique plasmatique : les souris apoE^{-/-} ont une cholestérolémie élevée. Elle présente également des propriétés anti-oxydantes, et anti-inflammatoires, notamment en inhibant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme IL-12, TNFα ou IFNγ (Curtiss LK. Et al, Curr Opin Lipidol 2000 ; Kamilah A. et al, Circ Res 2005). De plus, l'étude de souris transgéniques pour l'ApoE a démontré que de celle-ci améliore la promotion de l'efflux cellulaire de cholestérol libre par le macrophage (Annema W. et al, J Lipid Res 2012). L'injection d'adénovirus surexprimant l'apoE humaine à des souris apoE^{-/-} induit la régression totale de leurs plaques d'athérome, démontrant l'importance du gène dans le développement de ces dernières (Desurmont C. et al, ATVB 2000).

Notamment, le macrophage humain est capable de sécréter l'ApoE. Celle-ci est capable d'agir immédiatement avec ABCA1 afin de promouvoir l'efflux cellulaire de cholestérol libre, de manière analogue à l'ApoA-I. Ce mécanisme a une importance dans l'initiation du RCT, puisque le macrophage sera capable de synthétiser et sécréter lui-même des accepteurs pour son cholestérol libre en excès (von Eckardstein A. et al, FASEB J 2001). L'expression et la sécrétion de l'ApoE sont régulées par de nombreuses voies dans le macrophage : notamment les voies LXR (Mazzone T. et al, J Lipid Res 1998), PPARγ (Galletto R. et al, Biochem J 2001) et de manière plus générale par la charge de la cellule en cholestérol (Lucic D. et al, J Lipid Res 2007), mais également potentiellement par l'inflammation (Duan H. et al, J Clin Invest 1995). Plusieurs mécanismes post-traductionnels ont été décrits par le labo de Wendy Jessup dans le macrophage humain : une voie liée au transporteur ABCA1, déterminant la sécrétion basale d'apoE ; sécrétion diminuée dans des macrophages provenant de patients Tangier (von Eckardstein A. et al, FASEB J. 2001). D'autres voies de sécrétion, indépendantes d'ABCA1, expliquent l'induction de la sécrétion d'apoE par l'ApoA-I (Knokx M. et al, J Biol Chem 2004) : ces voies sont dépendantes de l'activation de la protéine kinase A (PKA), d'une signalisation dépendante du Calcium

intracellulaire, qui serait impliquée dans le transport post-Golgi de l'apoE (Knokx M. et al, Circ Res 2007), et de la protéine phosphatase 2B (PP2B), elle régulant en amont le transport du RE au Golgi (Knokx M. et al, J Biol Chem 2009)

Le rôle de l'ApoE ne semble pas limité à déclencher l'efflux de cholestérol cellulaire, même si c'est une des ses propriétés principales. Sa présence sur les HDL augmente leur catabolisme significativement (Hannuksela ML. et al, Atherosclerosis 2002). Egalement, l'apoE joue via son récepteur apoER2 et le VLDLr sur la polarisation des macrophages, inhibant le phénotype M1 et stimulant le phénotype M2 anti-inflammatoire. La liaison de l'ApoE à ces récepteurs inactive en effet les voies pro-inflammatoires STAT1 et NF- κ B via la Map-Kinase p38 (Baitsch D. et al, ATVB 2011). Egalement, l'ApoE est capable de réguler la monocytose athérogène entraînée par l'hypercholestérolémie (Murphy AJ. Et al, J Clinical Invest 2011) ainsi que l'expression de molécules pro-inflammatoires par les monocytes et l'endothélium (Gaudreault N. et al, ATVB 2012), soit deux étapes précoces du développement de la lésion.

Enfin, la sécrétion de l'apoE par les macrophages au niveau de la plaque a un fort potentiel athéroprotecteur. La greffe de moëlle osseuse apoE^{+/+}/LDLr^{-/-} dans des souris apoE^{-/-}/LDLr^{-/-} diminue drastiquement la taille des lésions (Fazio S. et al, J Lipid Res 2002). L'expression de l'apoE par les lignées myéloïdes chez des souris apoE^{-/-} à également été provoquée à différents stades de la maladie par l'injection de moelles osseuses traitées avec un rétrovirus exprimant constitutivement l'apolipoprotéine : l'athéroprotection a été confirmée, en revanche le traitement n'a pas pu faire régresser les lésions avancées (Hasty AH. Et al, Circulation 1999).

Ainsi, l'ApoE a des fonctions multiples dans l'athéroprotection, à différents stades de la maladie. Son inactivation chez les modèles murins confère un phénotype drastique d'animal développant la maladie où nombre de voies sont dérégulées. C'est pourquoi au cours de l'étude nous avons privilégié l'emploi de modèle LDLr^{-/-} autant que possible.

3. Le transport inverse du cholestérol

Les tissus périphériques, ainsi capables d'internaliser du cholestérol, sont pourtant incapables de le cataboliser, ce qui est la cause première de l'initiation de l'athérosclérose. Le foie est le seul organe qui pourra éliminer le cholestérol en excès, soit en l'excrétant dans la bile, soit en le métabolisant en acide biliaire. La voie de retour au foie, ou RCT, dont l'efflux est la première étape, est donc d'une importance capitale pour la protection contre la formation de lésions.

a) ApoA-I et la formation des HDL

L'ApoA-I est la protéine principale des HDL (70% de leurs protéines de structure). Elle est synthétisée par le foie et par l'intestin. Sa forme monomérique est constituée de 10 hélices α . Sa lipodation, ajout de cholestérol libre et de phospholipides, par le récepteur ABCA1 et l'efflux de cholestérol cellulaire des tissus périphériques, macrophages en particulier, initie la formation de HDL matures.

Suite à cela, deux molécules d'ApoA-I se dimériseront, adopteront une conformation en « solar-flare » et formeront une particule ainsi une particule pré β -HDL, très faiblement lipidée. Des résidus renvoyés à l'extérieur de la structure formeront le site d'interaction avec l'enzyme lecithyl-cholesterol acyl-transferase (LCAT). Celle-ci estérifie le cholestérol libre présent sur la pré β , la transformant en HDL sphérique. Cette particule a donc la capacité de s'enrichir progressivement en phospholipides et cholestérol libre :

- Via - encore - l'efflux de cholestérol cellulaire provenant des tissus périphériques.
- Via les enzymes LPL et phospholipide tranfert protein (PLTP) qui ajoutent les composantes de surface provenant des VLDL/IDL/LDL.

(Wu Z. et al, Nat Struct Mol Biol 2007)

La CETP, décrite précédemment, va enfin « remodeler » ces HDL, en les enrichissant en TG et les appauvrissant en CE ; enfin, les LPL/HL vont hydrolyser ces TG, retransformant les grandes HDL en particules plus petites, libérant de l'ApoA-I pouvant entrer dans le cycle à nouveau. L'ApoA-I non lipidée ou ayant dépassé sa demi-vie plasmatique (48 à 72 heures) sera catabolisée par le rein (Lewis GF. Et al, Circ Res 2005).

Ainsi, il existe une grande hétérogénéité des particules HDL, structurellement mais aussi fonctionnellement. En effet, elles n'ont pas toutes la même capacité à effectuer l'efflux de cholestérol cellulaire du macrophage, vidant celui-ci de ses esters et initiant le RCT. La compréhension des mécanismes et facteurs sous-tendant cette hétérogénéité est un des challenges actuels, puisque les stratégies d'augmentation du HDL-C pour réduire l'athérosclérose ont été pour l'instant un échec (Kontush A. and Chapman MJ., *Pharmacol Rev* 2006).

Notamment, un déficit en HDL (ou hypo-alpha-lipoprotéinémies ; HDL-C < 40 mg/dL) est détecté chez des patients présentant des mutations du gène de l'ApoA-I (Santos RD. Et al, *J Lipid Res* 2008). Une mutation dans la partie interagissant avec la LCAT empêche la formation d'HDL mature et impacte très négativement la capacité du plasma à stimuler l'efflux. L'oxydation de l'ApoA-I dans la plaque par la MPO empêche également la particule d'être un accepteur pour l'efflux (Huang Y. et al, *Nat Med* 2014). Enfin, une étude de notre équipe a démontré l'impact de polymorphismes de l'ApoA-I sur la capacité du plasma humain à stimuler l'efflux du macrophage humain indépendamment du taux de HDL-C – suggérant que l'apolipoprotéine a un rôle dans la structure et la fonction des HDL matures en plus de leur formations (Villard EF. et al, *ATVB* 2013).

b) Autres composantes des HDL

Ainsi, la composition des HDL est importante pour déterminer leur capacité à promouvoir l'efflux cellulaire, et ainsi une relative athéroprotection.

Leur composition en phospholipides est premièrement une donnée importante. En effet, celles-ci augmenteront la taille et surface des HDL ; et incidemment leur capacité à stimuler l'efflux via SR-B1, ciblant plutôt des grosses lipoprotéines. Egalement, leur composition est importante structurellement : on parle du rapport sphingomyéline (SM) sur phosphatidylcholine (PC) SM / PC, inversement proportionnel à la fluidité de la surface des HDL. Une augmentation de la quantité de PC augmente la capacité des HDL à augmenter l'activité LCAT (Sabbaiyah PV. Et al, *J Biol Chem* 1993) et l'efflux de cholestérol (Yancey PG. Et al, *J Biol Chem* 2000 ; Tchoua U. et al, *Atherosclerosis* 2010). Une étude effectuée au sein de notre laboratoire a démontré que les propriétés anti-oxydantes, anti-thrombotiques, anti-

apoptotiques des HDL et leur capacité à stimuler l'efflux de cholestérol chez des macrophages humains était associées de manière prédominante avec les HDL de petite taille, riches en protéine et de faible densité (HDL3). Egalement, certains composants lipidiques des HDL, en particulier les phosphatidylsérines, ont été corrélées avec leurs fonctionnalités athéroprotectrices et associées avec les petites HDL3. (Camont L. et al, ATVB 2013).

D'autres apolipoprotéines, en plus de l'ApoA-I, peuvent s'ajouter à la structure des HDL. Notamment, l'ApoA-II est leur composant secondaire, puisqu'elle représente environ 20% de leurs protéines. Celle-ci, située plus en profondeur, dans le cœur lipidique des HDL, les rend plus stables. En conséquence, elle diminue la dissociation de l'ApoA-I et la formation de nouvelles préβ-HDL, le remodelage des HDL par la CETP et la PLTP, et les activités LPL, HL et LCAT. Cependant, le rôle de l'ApoA-II et du ratio HDL-APOA-I/A-II dans la promotion de l'efflux de cholestérol cellulaire est controversé et semble très complexe ; son implication dans l'athérosclérose chez l'homme est toujours peu étudiée et on ne sait pas si elle est pro ou anti-anthérogène (Chan DC et al, Ann Med 2012).

Les ApoE (décrite précédemment) et ApoA-IV entrent également dans la composition des HDL, mais pas spécifiquement : elles sont également présentes sur les lipoprotéines contenant de l'ApoB. L'ApoA-IV favorise également le remodelage des HDL (Rader DJ. Et al, J Clin Inv 1993) et améliore la capacité des plasmas à stimuler l'efflux de cholestérol (Fournier N. et al, ATVB 2000). Il a également été démontré que les taux d'ApoA-IV sont inversement corrélés avec l'incidence des MCV (Kronenberg F. et al, J Am Coll Cardiol 2000).

De nombreuses autres protéines et enzymes se trouvent à la surface des HDL, au moins une cinquantaine, et sont responsables de nombreuses autres activités des lipoprotéines.

c) Autres propriétés des HDL

En effet, en plus de leur fonction d'accepteur du cholestérol et d'initiation du RCT, les HDL présentent de nombreuses autres propriétés anti-athérogéniques, qui les ont encore davantage mis sur le devant de la scène de la recherche contre l'athérosclérose.

L'activité anti-oxydante des HDL est notamment responsable d'une inhibition de l'oxydation des LDL et de la génération des ROS, à la base du développement de l'athérosclérose. Les apolipoprotéines présentent elles-même des propriétés anti-oxydantes : l'ApoA-I est capable de capter et d'enlever les lipides oxydés de la surface des lipoprotéines ; les ApoA-II, ApoA-IV, ApoE et ApoJ diminuent également le stress oxydant de manière distincte.

Les enzymes majeurs présents à la surface des HDL ont également des activités anti-oxydantes. L'enzyme PON-1, évoqué précédemment pour sa capacité à améliorer l'efflux ABCA1, hydrolyse également les PL oxydées de la surface des LDL ; l'interaction avec l'ApoA-I est néanmoins nécessaire pour cette fonction. La LCAT elle-même est capable de catalyser la même réaction. Enfin, l'enzyme GSPx est capable de réduire des résidus ou lipides oxydés sur les lipoprotéines. L'importance relative des réductions médiées par les HDL dans le cadre du développement de l'athérosclérose est cependant toujours étudiée.

Egalement, partiellement en conséquence de ces propriétés anti-oxydantes, les HDL ont un rôle anti-inflammatoire, notamment sur les cellules endothéliales et les macrophages. Elles empêchent l'activation des premières en inhibant l'expression des molécules d'adhésion ICAM1 et VCAM1, ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires TNF, IL-1 et IL-6. Cet effet passe en partie par la dégradation des LDLox, elles-mêmes activatrices de ces voies, par la liaison au récepteur SR-B1/CLA-1, et par la réduction de la charge cellulaire en lipides dans le cas des macrophages spumeux. L'ensemble des mécanismes n'est pas encore défini. Chez l'Homme, il existe une corrélation inverse entre les taux circulants de HDL-C, de CRP et d'ICAM1.

Enfin, les HDL inhibent l'apoptose des cellules endothéliales et macrophages en diminuant son induction par les LDLox et le TNF α notamment. Elles stimulent aussi la production de NO via la mobilisation de Ca²⁺ et la phosphorylation activatrice de la NOS par l'ApoA-I ; ce mécanisme s'associe à une vasodilatation et à une inhibition de l'agrégation plaquettaire, conférant des propriétés anti-thrombotiques aux HDL.

(Kontush A. and Chapman MJ., Pharmacol Rev 2006)

d) Le retour et l'excrétion du cholestérol

Même si l'efflux de cholestérol cellulaire, et en particulier des macrophages spumeux, n'est qu'un petit contributeur de l'ensemble du cholestérol porté par les HDL, celui-ci ainsi que le HDL-C est inversement corrélé avec l'incidence des MCV, et restent des marqueurs importants du RCT.

Le cholestérol des HDL sera recapté par le foie via le récepteur SR-B1, ce qui constitue la voie directe de RCT, responsable de seulement 10% du mécanisme chez l'homme. L'implication d'un autre récepteur dans cette captation des HDL, P2Y₁₃ (purinergic receptor P2Y, G protein-coupled 13) ou ectoF-ATPase, a été démontré (Martinez LO. Et al, Nature 2003 ; Pons V. et al, Cell Mol Life Sci 2013). La voie indirecte, bien plus importante, fait intervenir la CETP : après transfert des esters de cholestérol des HDL sur les LDL, ils seront reconnus par le LDLr et le LRP hépatiques. Chez la souris, l'absence d'activité CETP ne permet pas la mise en place de cette voie indirecte ; il est donc une fois de plus difficile de comparer les deux modèles et les études de RCT in vivo sont le plus souvent faites sur des modèles murins dits « humanisés », les souris apoB100/CETP Tg, présentant un profil lipoprotéique « à fort LDL » et une activité CETP plasmatique.

Ainsi, chez l'Homme, le LDLr joue un rôle capital au niveau hépatique de la RCT et l'excrétion du cholestérol en excès, en particulier le LDL-C. Sa présence à la surface des hépatocytes est capitale pour la régulation de la cholestérolémie chronique, ainsi que pour la protection contre le développement de l'athérosclérose et des MCV sous-jacentes. De manière intéressante, il est régulé de manière post-transcriptionnelle par la « proprotéine convertase subtilisine/kexin type 9 » (PCSK9), qui le lie, altère sa stabilité et ainsi induit son transport vers le lysosome. Le blocage de PCSK9 dans le foie par un anticorps induit le LDLr hépatique et diminue significativement le LDL cholestérol plasmatique. Après sa découverte en 2003 par Abifadel et al. (Nat Genet, 2003), de nombreux variants du gène de PCSK9 ont été étudiés dans des populations atteintes d'hypercholestérolémie familiale comme chez des patients normolipidémiques ; ces études confirmant une chute du LDL-C associée avec une perte de fonction de PCSK9. Son expression est augmentée notamment par l'activation du facteur de transcription SREBP-2, l'insuline et la déplétion en cholestérol ; ainsi les statines peuvent augmenter l'expression de PCSK9 dans le foie, et contrecarrer leur propre

effet. Il fut suggéré qu'un co-traitement statine/inhibiteur de PCSK9 serait la stratégie thérapeutique idéale pour diminuer le LDL-C encore davantage et durablement. Ainsi, de nombreuses boîtes pharmaceutiques ont procédé à des études cliniques et actuellement, deux anticorps ciblant et inhibant PCSK9 sont testés cliniquement en phase III chez l'Homme. Comme évoqué dans le préface, cette stratégie thérapeutique a de grandes chances d'aboutir à un nouveau traitement important contre les MCV (Abifadel M. et al, *Curr Atheroscler Rep* 2014).

Egalement dans l'hépatocyte, l'enzyme cytochrome P450 7A1 (CYP7A1) catalyse les réactions de transformation du cholestérol libre en acides biliaires, principaux composants de la bile dans lequel le cholestérol en excès pourra être excrété. Le cholestérol des acides biliaires provient des VLDL/LDL, acheminé et dégradé dans le lysosome, alors que le cholestérol excrété dans celle-ci provient des HDL, et est dirigé directement vers les canicules biliaires. Il est sorti de l'hépatocytes via transport actif par l'hétérodimère ABCG5/ABCG8 (Graf GA. Et al, *J Biol Chem* 2003).

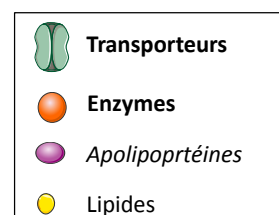
Enfin, l'intestin joue un dernier rôle dans le RCT avant l'excrétion finale du cholestérol dans les fécès. Les entérocytes sont en effet capable de réabsorber le cholestérol lors de son passage dans l'intestin, processus largement dépendant de Newmann-Pick C1 Like-1 (NPC1L1), située à la membrane apicale des cellules. En fonction de l'état d'activation de la cellule, notamment des facteurs de transcription LXR/SREBP2/PPAR α (cf partie suivante) et donc du taux de cholestérol, le cholestérol libre pourra avoir plusieurs devenir :

- estérifié par l'ACAT2 intestinale, il sera ensuite utilisé pour la synthèse et sécrétion dans la lymphe de nouveaux chylomicrons
- à la membrane basolatérale, il sera exporté via ABCA1 sur de l'ApoA-I nouvellement synthétisée par l'entérocyte lui-même dans le compartiment intersticiel. C'est la réabsorption intestinale du cholestérol, partie intégrante du RCT et contribuant de manière non-négligeable à la formation de nouvelles HDL.
- Immédiatement re-transporté dans la lumière intestinale par ABCG5/G8, situé à la membrane apicale de l'entérocyte.

La protéine NPC1L1 est centrale dans le phénomène d'absorption entérocytaire du cholestérol. Exprimée dans l'intestin et le foie chez l'homme, uniquement dans le foie chez la souris, son inactivation chez des souris apoE^{-/-} protège quasiment complètement contre le développement de lésions (Davis Jr HR. Et al, *ATVB* 2007). Une étude clinique testant le

bénéfice de l'inactivation ciblée de NPC1L1 dans l'intestin par l'ézetimibe chez des patients atteints de MCV a également eu lieu (Gotto Jr AM., Am J Cardiol 2012). Un traitement supplémentaire par l'ézetimibe de patients déjà traités avec des statines diminue davantage le LDL-C, mais l'impact sur les MCV n'est pas évident (Kastelein JJ, et al. *N Engl J Med* . 2008). De manière opposée, les souris transgéniques pour ABCG5/G8 absorbent moins de cholestérol, en excrètent plus et sont moins prônes à développer l'athérosclérose (Wilung KR. *J Lipid Res* 2004). (Lee-Rueckert M. et al, *Prog lip Res* 2013)

(Légende figure 11) Les voies complètes d'apport et de retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, sont illustrées ici. Les différents organes ainsi que les principaux facteurs moléculaires et lipidiques sont également énumérés.



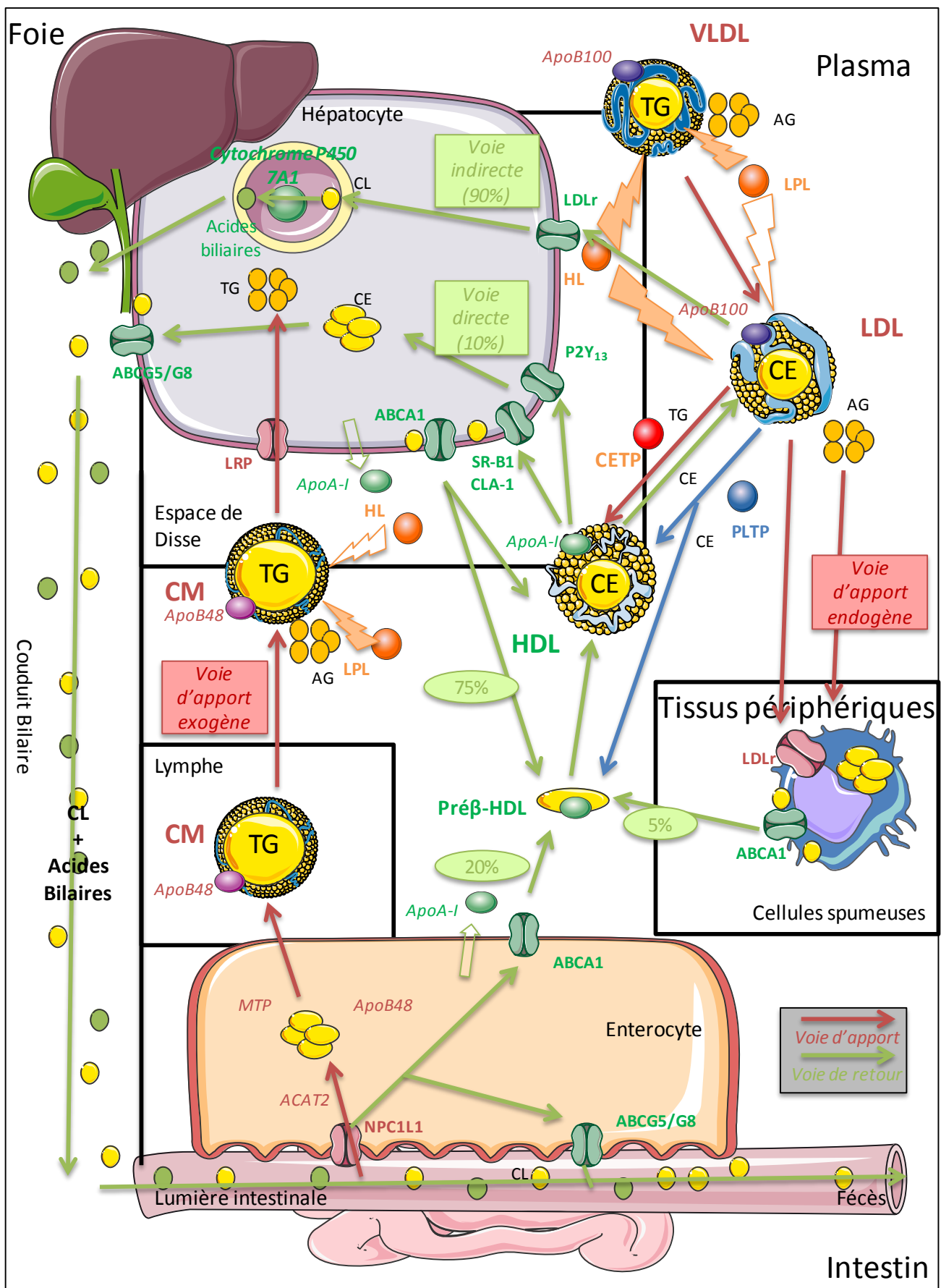


Figure 16- Le transport extracellulaire du cholestérol

C. Régulations moléculaires

Les macrophages sont impliqués dans l'initiation du RCT et de la régression de l'athérosclérose. Il s'agit en réalité d'une population hétérogène soumise aux différents stimuli de leur environnement. Au sein de chaque cellule, les différentes voies de signalisation sont régulées et contrôlées par des récepteurs nucléaires, également facteurs de transcription. Dans les macrophages sont exprimés les récepteurs aux hormones stéroïdiens, comme le récepteur aux glucocorticoïdes (GR), à d'autres ligands non-stéroïdes, comme le récepteur à l'acide rétinoïque (RXR), mais aussi des récepteurs activés par des produits du métabolisme lipidique comme les Peroxysome-Proliferation Activators PPARs, et les Liver X Receptor LXR. Ces derniers sont des chefs d'orchestre de la régulation de l'homéostasie lipidique dans le macrophage (comme dans d'autres types cellulaires), ainsi que des répresseurs de l'inflammation.

C'est pourquoi nous détaillerons ici le mode d'action et les fonctions attribués aux LXRs, la première étude de mon travail de recherche ayant pour but de décrypter son rôle dans l'efflux de cholestérol et l'inflammation dans des modèles de macrophages humains. LXR, en effet actuellement considéré comme une cible thérapeutique majeure dans le cadre de la régression de l'athérosclérose, a été bien moins étudié chez l'Homme que chez la souris (Lund EG. Et al, ATVB 2003).

1. Les Liver X Receptors α et β

a) Mécanisme

Les LXR – LXR α (ou NR1H3) et LXR β (ou NR1H2) – sont des récepteurs nucléaires et facteurs de transcription activés par des stérols, en particulier les oxystérols, forme oxydée du cholestérol, et certains métabolites intermédiaires de voies de biosynthèse du cholestérol, comme le desmostérol (Peet DJ . et al, Curr Opin Genet Dev 1998 ; Spann NJ. Et al, Cell 2012).

Les deux isoformes présentent une forte homologie de séquence (envion 65%), en particulier dans leur domaine de liaison au ligand ; ce qui rend le développement de

molécules isoforme-spécifiques très complexe. Elles ne sont cependant pas exprimées de façon équivalente : alors que LXR β est ubiquitaire, LXR α est exprimé en forte quantité dans les tissus participant à l'homéostasie générale du cholestérol, soit le foie, l'intestin, le tissu adipeux et surtout les macrophages (Repa JJ. et al, Annu Rev Cell Dev Biol 2000).

La stimulation de l'activité transcriptionnelle des LXR dépend également de leur hétérodimérisation avec RXR, le partenaire obligatoire de LXR. L'hétérodimère LXR/RXR est constamment lié sur une zone particulière du promoteur de ses gènes cibles, aussi appelé LXR-response element (LXRE). Ce LXRE est une zone de répétition directe de séquences 'AGGTCA' séparées par 4 nucléotides (ou motif DR4). En l'absence de ligand, LXR est acétylé et lié à des co-répresseurs – nuclear co-repressor 1 (NCOR1) ou silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor (SMRT) – facteurs réprimant l'activation de la transcription des gènes en liant une histone déacétylase (HDAC). La liaison au ligand provoque un changement de conformation dans le domaine C terminal des récepteurs, qui va induire le relargage des co-répresseurs. Un autre changement de conformation intervient, qui va piéger le ligand dans sa poche de liaison et va augmenter l'affinité et provoquer la liaison avec des molécules activatrices de transcription comme NCOA1 (nuclear receptor co-activator 1), ASC2 (activating signal co-integrator 2) ou GPS2 (G protein pathway suppressor 2). Le récepteur sera également déacétylé par la sirtuine 1, ce qui participera à son activation mais également à son ubiquitinylation et dégradation, augmentant ainsi son turnover et son expression. Ce dernier mécanisme a cependant uniquement mis en évidence chez la souris. (Hu X. et al, Mol Endocr 2003 ; Wagner BL. et al, Mol Cell Biol 2003 ; Lazar MA., Nucl Recept Signal 2003, Li X. et al, Mol Cell 2007, Jakobsson T. et al, Cell 2009).

Un mécanisme alternatif de transrépression a également été mis en évidence par l'équipe de CK. Glass. Lorsque lié à certains promoteurs spécifiques, en particulier des promoteurs de gènes inflammatoires et lié à l'activation TLR, la liaison des agonistes par LXR entraîne une réaction de SUMOylation (ajout d'une protéine SUMO – Small Ubiquitin-like Modifier) des récepteurs qui vont ancrer les co-répresseurs NCoR et SMRT aux promoteurs de ces gènes et empêcher leur expression. Ce mécanisme alternatif, qui explique que LXR puisse à la fois activer des gènes de l'homéostasie du cholestérol et réprimer d'autres de l'inflammation, n'a cependant pas non plus été confirmé chez des modèles humains (Ghisletti S. et al, Cell 2007 and Genes Dev 2009). (Figure 17)

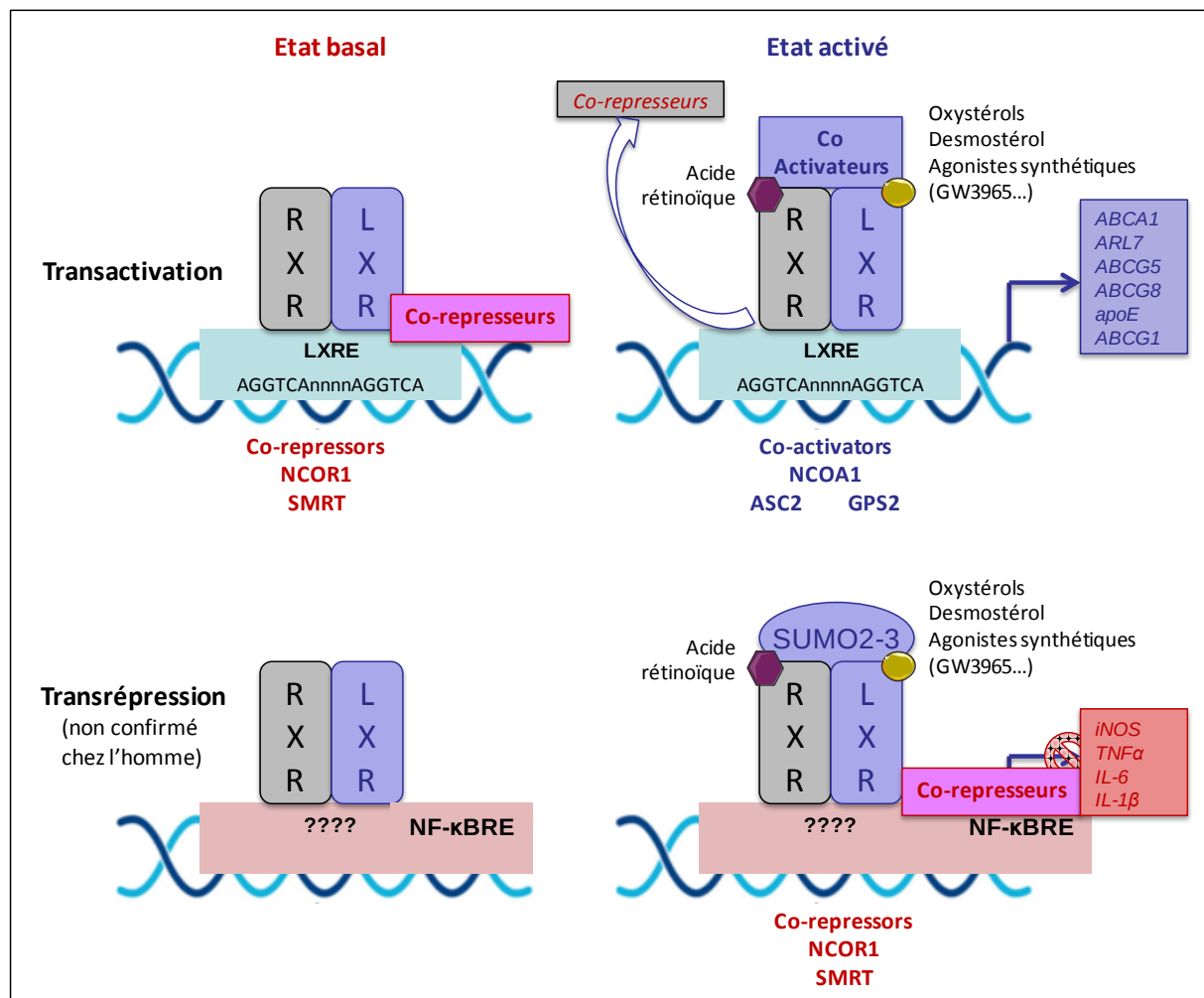


Figure 17 – Mécanisme d'activation des LXR dans le noyau des macrophages

Les récepteurs LXR/RXR, constamment fixés sur les LXRE de leurs gènes cibles, vont une fois activés par leur ligands lier un co-activateur et promouvoir la transcription de ces gènes. Un mécanisme alternatif a été mis en évidence, notamment impliqué dans la répression des gènes NF-κB dépendants chez la souris : la liaison avec l'agoniste provoque le recrutement d'un SUMO et d'un co-répresseur inhibant l'expression d'autres gènes-cibles.

b) LXR, RCT et athérosclérose

Chez l'humain comme chez la souris, les LXRs vont ainsi agir comme senseurs du cholestérol et leur stimulation activera la transcription de facteurs impliqués dans le RCT à tous les niveaux. Dans le macrophage murin, il induira l'expression des transporteurs ABCA1,

ABCG1 et de l'apoE, mécanisme qui participera activement à la promotion de l'efflux de cholestérol vers l'apoA1 et les HDL. Ils seront également impliqués dans d'autres organes : dans le foie l'induction de l'expression de l'enzyme CYP7A1 sera LXR-dépendante. Les transporteurs ABCA1, ABCG5 et ABCG8, importants pour le RCT dans l'entérocyte et l'hépatocyte, voient leur expression augmentée par les agonistes (Naik, S. U. et al, *Circulation* 2006).

Des souris apoE^{-/-} et LDLr^{-/-}, développant l'athérosclérose spontanément sous régime surgras, ont été traitées par les agonistes synthétiques LXR TO901317 ou GW3965 ; ceci a diminué significativement le développement de plaques d'athérome, soulignant l'effet clairement protecteur de l'activation LXR (Tangirala RK. Et al, *PNAS* 2002). Le même traitement chez des souris transplantées avec de la moelle osseuse de donneurs LXR KO ne produit aucun effet, une augmentation des lésions basales étant même observable. Ceci indique clairement que l'effet athéro-protecteur de l'activation LXRα/β est macrophage dépendant (Levin N. et al, *ATVB* 2005 ; [Figure 18](#)).

Egalement, il a été démontré par des analyses sur des modèles de souris invalidées sélectivement pour LXRα ou LXRβ que les deux isoformes ont des fonctions non redondantes. Notamment, chez les modèles LDLr^{-/-}, l'activation de LXRα semble être requise pour exercer la fonction antiathérogénique des récepteurs, LXRβ étant incapable de compenser l'invalidation de l'autre isoforme. Cet effet serait dû à une meilleure stimulation de l'efflux de cholestérol dans les macrophages par l'isoforme LXRα (Bischoff ED. et al, *J Lipid Res* 2010 ; [Figure 18](#)). Ces résultats sont cependant controversés. Dans les modèles apoE^{-/-}, les résultats sont différents : l'activation isolée de LXRβ semble capable de diminuer la formation de lésions (Bradley MN. Et al, *J Clin Inv* 2007). D'autres études ont démontré que l'activation de LXRα comme celle de LXRβ stimulent l'efflux de cholestérol des macrophages murins (Quinet EM et al, *Mol Pharmacol* 2006 ; Lund EG. Et al, *Biochem Pharmacol* 2006).

En effet, la stimulation de LXR dans le foie in vivo conduit à une hypertriglycéridémie et à une stéatose hépatique chez la souris, toutes deux délétères. Cet effet est dû uniquement à l'activation de l'isoforme LXRα dans les hépatocytes, qui contrôle l'expression de SREBP1c, et active les enzymes de la lipogénèse Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) et Fatty-Acid Synthase (FAS) (Bischoff ED. et al, *J Lipid Res* 2010 ; [Figure 18](#)). La question est donc de savoir si une activation isolée de LXRβ serait efficace ; cependant, cette isoforme étant ubiquitaire, son activation peut avoir de nombreux effets divers dans les différents organes,

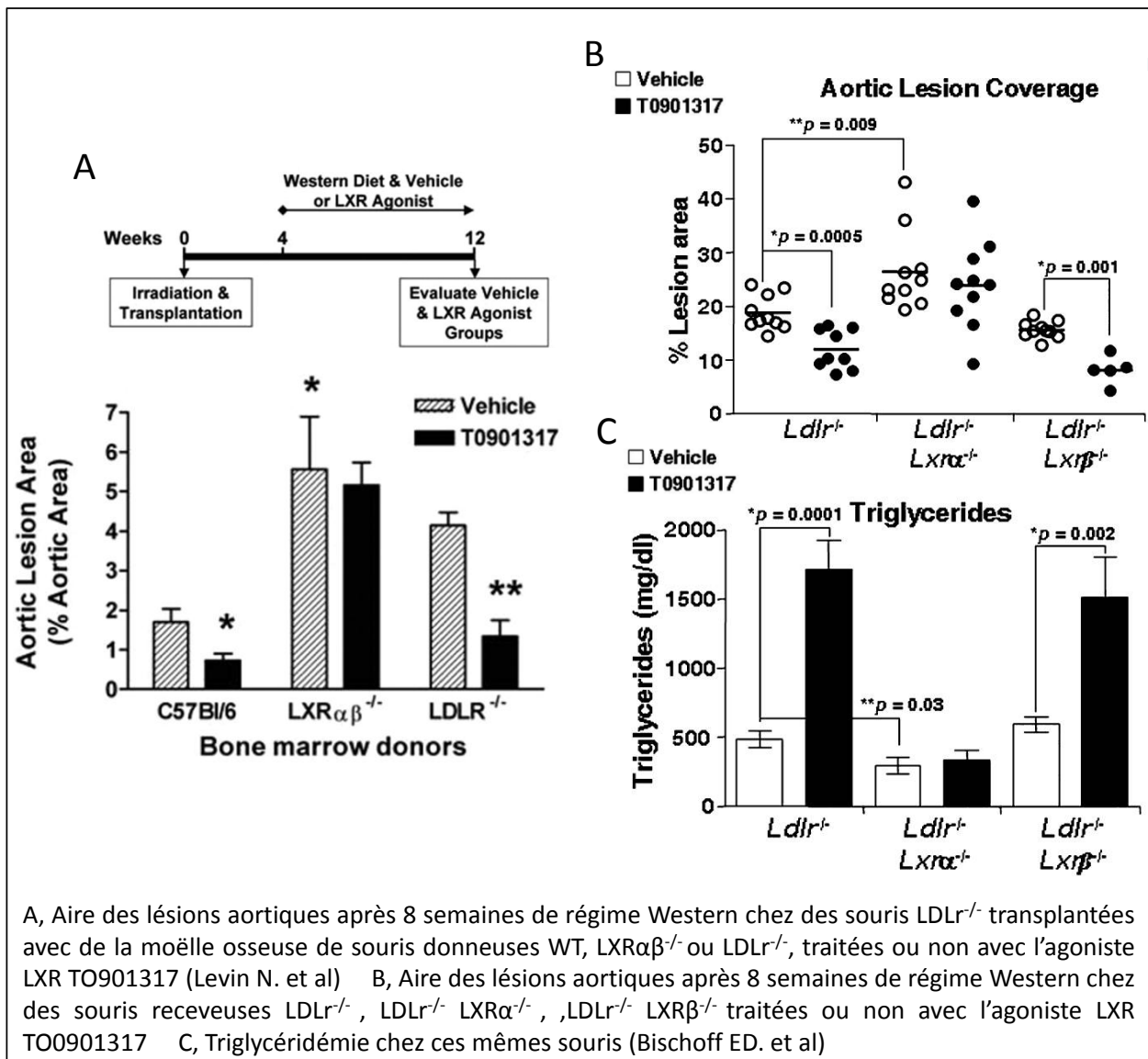


Figure 18 – Traitement LXR in vivo, macrophage, athéroprotection et hypertryglicéridémie

potentiellement délétères. Le développement de stratégies cellule spécifique est à l'ordre du jour : c'est ce qu'ont expérimenté Li et al., en introduisant spécifiquement dans les macrophages un vecteur induisant une surexpression de LXR α (Li G. et al, Gene Ther 2011). Sont également étudiés actuellement des « modulateurs » LXR, agonistes spécifiques qui induisent l'efflux de cholestérol dans le macrophage et protègent contre l'athérosclérose sans induire l'expression de SREBP1c et la lipogénèse au niveau hépatique (Kratzer A. et al, J Lipid Res 2009 ; Miao B. et al, J Lipid Res 2004 ; Peng D. et al, J Pharmacol Exp Ther ; Jun H. et al, Bio Med Chem Let 2012).

La stimulation de l'efflux de cholestérol cellulaire dans les macrophages ne serait pas la seule manière de diminuer la formation de plaques d'athérome en ciblant directement ces cellules. En plus de ce premier effet bénéfique, les agonistes LXR ont également la capacité de diminuer l'inflammation dans ces cellules. Une étude récente du laboratoire d'Alan Tall démontre l'effet athéroprotecteur des agonistes LXR chez la souris $LDLr^{-/-}$ invalidée pour ABCA1 et ABCG1 spécifiquement dans les cellules myéloïdes. Ces deux transporteurs étant responsables de la majorité de l'efflux de cholestérol cellulaire dans le macrophage murin, les auteurs suggèrent que la répression des cytokines pro-inflammatoires est suffisante pour ralentir le développement de l'athérosclérose lorsque la voie de l'efflux est absente (Kappus MS. Et al, ATVB 2014). Enfin, d'autres études démontrent que les agonistes LXR peuvent induire la régression de plaques pré-existantes, ce qui n'est pas sans intérêt dans le traitement de la maladie chez l'homme (Feig JE. Et al, J Clin Inv 2010 ; van der Stoep M. et al, Biochem Pharmacol 2013).

Enfin, une étude a mis en évidence une autre cible de LXR dans l'hépatocyte et le macrophage, l'ubiquitine ligase Mylip. Cette dernière ubiquitinye spécifiquement le LDLr, conduisant ainsi à sa dégradation ; il a d'ailleurs été également nommé « Inducible degrader of the LDLr » ou Idol. En effet, son induction par les agonistes LXR augmente l'ubiquitinylation de LDLr, sa dégradation, et diminue ainsi la liaison et l'internalisation des LDL dans les cellules. L'inactivation d'Idol par RNA interférence à l'effet inverse et augmente cette internalisation (Zelcer N. et al, Science 2009). Le mécanisme a été décrit plus précisément par la suite : si l'internalisation des LDL par le récepteur est clathrine-dépendant, la dégradation du LDLr par Idol est elle indépendante de la clathrine, mais aussi des cavéoles, de la microautophagie et de la dynamine : le mécanisme est spécifiquement dirigé contre les LDLr présents dans les radeaux lipidiques, par un mécanisme non-encore complètement identifié faisant intervenir notamment la voie des épsines (Sorrentino V. et al, J Lipid Res 2013). Si ce mécanisme peut avoir un impact important dans le foie, où il confère d'autres propriétés délétères à l'activation de LXR, il est peu probable qu'il puisse jouer un rôle dans le macrophage au niveau de la formation de cellules spumeuses. Ce mécanisme est en majorité dû aux récepteurs Scavenger et l'implication du LDLr, autorégulé, est inexistante lorsque la cellule est gorgée d'esters de cholestérol. Enfin, les études n'ont jamais confirmé la présence d'Idol dans le macrophage humain.

c) LXR dans le macrophage humain

Malgré toutes ces études, il apparaît difficile de faire un parallèle entre l'humain et la souris concernant la stimulation de l'efflux de cholestérol par les agonistes LXR, et plus largement les autres mécanismes liés aux récepteurs nucléaires. En effet les voies de signalisation moléculaires de l'homéostasie lipidiques comme de l'inflammation diffèrent sensiblement entre les deux espèces (Rigamonti E. et al, ATVB 2008 ; Larrède S. et al, ATVB 2009). L'importance relative des isoformes LXR α et LXR β dans la régulation des différents gènes-cibles est également espèce-dépendant, comme le suggère l'auto-régulation par LXR du promoteur de LXR α – et non LXR β – chez l'Homme (Laffitte BA. Et al, Mol Cell Biol 2001).

La fonction principale des LXR, maintenir l'homéostasie du cholestérol, est pourtant bien conservée chez l'Homme. En particulier, sa capacité à stimuler l'expression des transporteurs ABCA1 et de l'apolipoprotéine E entraînant une augmentation de l'export du cholestérol cellulaire vers l'ApoA-I et les HDL est conservée ; les mêmes mécanismes sous-jacents ne sont pourtant pas impliqués. En effet, le gène le plus stimulé par l'activation LXR par les oxystérols, ABCG1, n'a pas de rôle dans l'export du cholestérol (Olivier M. et al, ATVB 2012). Egalement, la stimulation LXR augmente l'expression des transporteurs NPC-1 et NPC-2 et la quantité de cholestérol libre disponible pour l'efflux à la membrane ; une régulation humain-spécifique (Rigamonti E. et al, Circ Res 2005). Une augmentation LXR-dépendante des rafts et de la sécrétion d'ApoE va induire l'uptake des esters de cholestérol des HDL secondaire, en augmentant la surface et la capacité d'interaction de ces zones membranaire, et notamment de leurs protéoglycanes, avec les HDL. L'activité de l'ACAT1 sera pourtant diminuée ainsi que la quantité d'esters dans les gouttelettes lipidiques par les agonistes LXR, sans impact sur l'expression d'ACAT1. Ces résultats montrent qu'en plus de stimuler l'expression des transporteurs médiant sélectivement l'étape d'export du cholestérol, déjà sous forme libre et dans les pools accessibles de la membrane plasmique, la stimulation LXR chez le macrophage humain « accélère » l'ensemble du « cycle de transport » du cholestérol, de la captation des esters contenus dans les HDL jusqu'à l'efflux initié dans les radeaux lipidiques (Bultel S. et al, ATVB 2008). Mon étude a voulu davantage préciser ces mécanismes chez l'humain en identifiant ceux qui sont vraiment limitants et en

identifiant un nouveau facteur impliqué dans le transport du cholestérol libre des endosomes aux radeaux lipidiques, ARL7 (Superville A. et al, submitted paper ATVB).

La contribution spécifique de LXR α et de LXR β dans la stimulation de l'efflux est également peu décrite. Dans le macrophage humain comme dans tous les tissus responsables de l'homéostasie du cholestérol l'isoforme LXR α est plus fortement exprimée et présente, comme mon étude l'a confirmé. Egalement, nous avons confirmé plusieurs études démontrant un rôle prépondérant de l'activation isolée de l'isoforme LXR α par un agoniste synthétique dans la stimulation de l'expression d'ABCA1 et de l'efflux de cholestérol vers l'ApoA-I, les HDL et du plasma total. Ces études soulignent également l'absence d'impact de l'inactivation de l'isoforme LXR β dans ces mécanismes (Ishibashi M. et al, Biochem Pharmacol 2013 ; Chinetti-Gbaguidi G. et al, Circ Res 2011).

Deux hypothèses pouvant expliquer ce phénomène :

- LXR β et LXR α se fixent aux mêmes promoteurs de manière non discriminée mais le premier n'est pas assez exprimé en comparaison du dernier pour que son inactivation ait un effet significatif sur l'expression des cibles et incidemment sur le mécanisme
- LXR β , par sa différence de structure, ne se fixe pas aux promoteurs contrôlant l'homéostasie lipidique, cette spécificité lui conférant d'autres rôles dans la cellule. En effet, Hozoji-Inada et al. (J Biol Chem 2011) proposent qu'à l'état inactivé, LXR β se lie à ABCA1 et le séquestre à la membrane plasmique, l'empêchant d'activer l'export du cholestérol, et le relâchent après liaison d'un ligand, mettant en évidence un rôle post-traductionnel plutôt que transcriptionnel pour cet isoforme chez l'Homme.

Le mécanisme est pourtant controversé. Une autre étude démontre que l'activation de LXR β par les agonistes va elle-même activer la transcription du gène de LXR α alors capable d'agir en aval (Boyle JJ. Et al, Circ Res 2012). Une autre étude va jusqu'à défendre l'idée d'une encore plus forte hétérogénéité structurelle des LXR, au sein de l'isoforme LXR α , due à un épissage alternatif, mécanisme très important chez l'humain. Quatre isoformes de la protéine LXR α humaine ont été identifiées, et détectées. Le traitement par un ligand synthétique a été capable d'induire une expression différentielle cellule-dépendante. Les isoformes ayant des profils fonctionnels différents, certains tournés davantage vers la

transactivation ou la transrépression, la liaison de promoteurs ou de ligands serait également dépendante de chaque isoforme. Afin de comprendre mieux le profil de l'activation LXR, il serait intéressant d'étudier fonctionnellement et indépendamment chacune de ces isoformes dans le macrophage humain pour affiner la description des régulations sous-jacentes (Endo-Umeda K. et al, Mol Pharmacol 2011).

L'implication des récepteurs LXR dans la régulation de l'inflammation a également été démontrée et étudiée spécifiquement dans le macrophage humain par plusieurs études, même si le mécanisme précis de transrépression n'a pas été identifié chez l'homme. Notamment, l'activation LXR par les agonistes réprime l'induction de gènes pro-inflammatoires stimulés par des traitements LPS, $TNF\alpha$ ou $IL-1\beta$, parmi lesquels $TNF\alpha$ et $IL-1\beta$ eux même, $IL-6$, $MCP-1$ $iNOS$ ou $MMP-9$. Aucun LXRE n'ayant été identifié dans les promoteurs de tels gènes, l'hypothèse est que de manière similaire à ce qui est observé chez la souris, LXR activé peut inhiber leur activation par NF- κ B au niveau du noyau, l'agoniste LXR n'ayant un effet sur leur régulation qu'en présence d'un stimulus provoquant la translocation dans le noyau de NF- κ B. Une partie de mon travail a partiellement validé ce mécanisme.

Des résultats contradictoires démontrent que l'activation LXR joue un rôle différent dans l'immunité innée en induisant l'expression du récepteur au LPS TLR4, potentialisant ainsi la réponse inflammatoire, et celle de la NADPH oxydase, stimulant la génération de ROS. L'activation LXR a un rôle dans la réponse bactérienne en amplifiant sa détection et l'élimination des pathogènes par les ROS, néanmoins en contrôlant et diminuant la sécrétion de cytokine sous-jacente, pour résoudre l'inflammation (Fontaine C. et al, Circ Res 2007). La détection d'oxystérols intracellulaires par le macrophage humain pourrait donc promouvoir une inflammation aiguë transitoire et vite résolue ; cette hypothèse est soutenue par une étude de l'équipe de Bart Staels identifiant le récepteur Rev-erb α comme une cible de LXR, ce récepteur ayant pour particularité de réguler négativement secondairement à l'activation LXR le gène du récepteur TLR4 (Fontaine C. et al, Mol Endocrinol 2008). Egalement, il a été démontré que le traitement de modèles de macrophages humains par un agoniste synthétique des LXR, le TO901317 augmente l'expression et l'activité de LPCAT3 (lisophosphatidylcholine acyltransferase 3), qui lui-même va augmenter la fraction acide arachidonique dans les phosphatidylcholines. Ce mécanisme augmentera la sécrétion d'eicosanoïdes, dérivés de l'acide arachidonique, par les macrophages humains, qui sont des

modulateurs de la réponse inflammatoire (Ishibashi M. et al, ATVB 2012). Afin de préciser le rôle de l'activation LXR dans l'inflammation chez le macrophage humain, la seconde partie de mon travail a visé à préciser l'implication de l'activation LXR dans l'activation d'une autre voie pro-inflammatoire, celle de l'inflammasome NLRP3.

L'expression des LXRs et de facteurs sous-jacents ont été quantifiés comparativement dans différentes sous-populations de macrophages humains, en particulier les macrophages CD68⁺ MR⁺, ou macrophages alternatifs M2, polarisés par activation de la voie IL-4-STAT6. Les M2 ont une capacité réduite à effectuer l'efflux cellulaire de cholestérol vers l'ApoA-I et les HDL, corrélée à une expression réduite de LXR α et d'ABCA1 (mais pas de LXR β) et à une augmentation du stockage des esters de cholestérol ; soit une diminution générale de la « circulation » du cholestérol dans la cellule. Par contre, ces macrophages M2 présentent une nette augmentation de leur capacité à phagocyter les cellules apoptotiques, leur conférant des propriétés athéroprotectrices en plus de leur phénotype anti-inflammatoire. L'ensemble de ces résultats ont été validés dans des macrophages isolés directement de la plaque humaine (Chinetti-Gbaguidi G. et al, Circ Res 2011). De manière analogue il a été démontré que l'efférocytose est également augmentée par les agonistes LXR dans les monocytes et macrophages humains – démontrant une autre propriété athéroprotectrice de ceux-ci. La stimulation de l'expression de la transglutaminase 2 (TGM2) qui permet la liaison avec des composants membranaires des cellules apoptotiques serait responsable de ce mécanisme (Rebé C. et al, Circ Res 2009).

La fonction athéroprotectrice LXR-dépendante la plus récemment découverte est la gestion du fer. Des anomalies dans l'homéostasie ferrique des macrophages entraînent en effet l'accumulation de celui-ci dans la plaque et un stress oxydant pouvant modifier les protéines et lipoprotéines. La gestion du fer par les macrophages résulte en un équilibre entre l'internalisation de l'hémoglobine en présence et son export via la ferroportine. Les macrophages M2, en présence de fer, sont capables d'accumuler ce dernier. Une fois chargés, ils adopteront un phénotype différent promouvant le recyclage via la ferroportine. L'activation de gènes correspondant à ce nouveau phénotype, comme notamment le facteur de transcription NRF2 se fait de manière LXR α dépendante, lui-même certainement activé par l'oxydation induite par l'accumulation de fer (Bories G. et al, Circ Res 2013). Ce mécanisme peut se révéler d'importance dans les phases tardives de l'athérosclérose, où peut se produire une « hémorragie intraplaque », infiltration d'hématies pouvant devenir

apoptotiques et libérer leur hémoglobine chargée en fer. A leur contact, les macrophages acquièrent un phénotype alternatif « Mhem » (voir [Figure 6](#)) spécialisé dans la gestion du fer et caractérisés par l'activation du facteur de transcription ATF-1 contrôlant l'expression de l'hème oxygénase 1 (HO-1) et des récepteurs nucléaires LXR, normalement peu actifs dans les M2 (Boyle JJ. et al, *Circ Res* 2012).

Aussi, une immunoprécipitation de la chromatine suivi d'un séquençage à haut seuil (ChIP-Seq) a été réalisée sur des lignées de macrophages humains THP-1. Cela a permis d'identifier tous les gènes dont le promoteur lie un LXR, en présence ou en absence de l'agoniste synthétique TO901317. Au total un millier de gènes sont régulés par une action directe de LXR : ces gènes sont liés à l'homéostasie lipidique. De manière plus surprenante, un grand nombre ont un lien avec la régulation de l'apoptose mais pas de l'immunité (Pehkonen P. et al, *GMC Genomics* 2012).

Enfin, les potentielles thérapies basées sur l'activation LXR chez l'humain sont loin d'être abouties. Récemment, un composé prometteur activant sélectivement LXR α dans les macrophages spumeux a été découvert. De manière très surprenante, il n'impacte pas l'expression des gènes cibles lorsque les cellules ne sont pas chargées en esters de cholestérol (Feldmann R. et al, *PLoS ONE* 2013). Une seule molécule a été testée pour le moment testé en étude clinique chez l'homme, le composé LXR-623 – l'augmentation d'expression d'ABCA1 dans les cellules périphériques et de l'efficacité de la voie du retour du cholestérol ont par ailleurs été jugés suffisants. Cependant des effets secondaires au niveau neurologiques ont conduit à l'arrêt de cette étude dès les stades précoces (Katz A. et al, *J Clin Pharmacol* 2009). D'autres composés ont été testés en phase I d'études cliniques, mais aucun à ce jour n'a été satisfaisant (Hong C. et al, *Nat Rev* 2014).

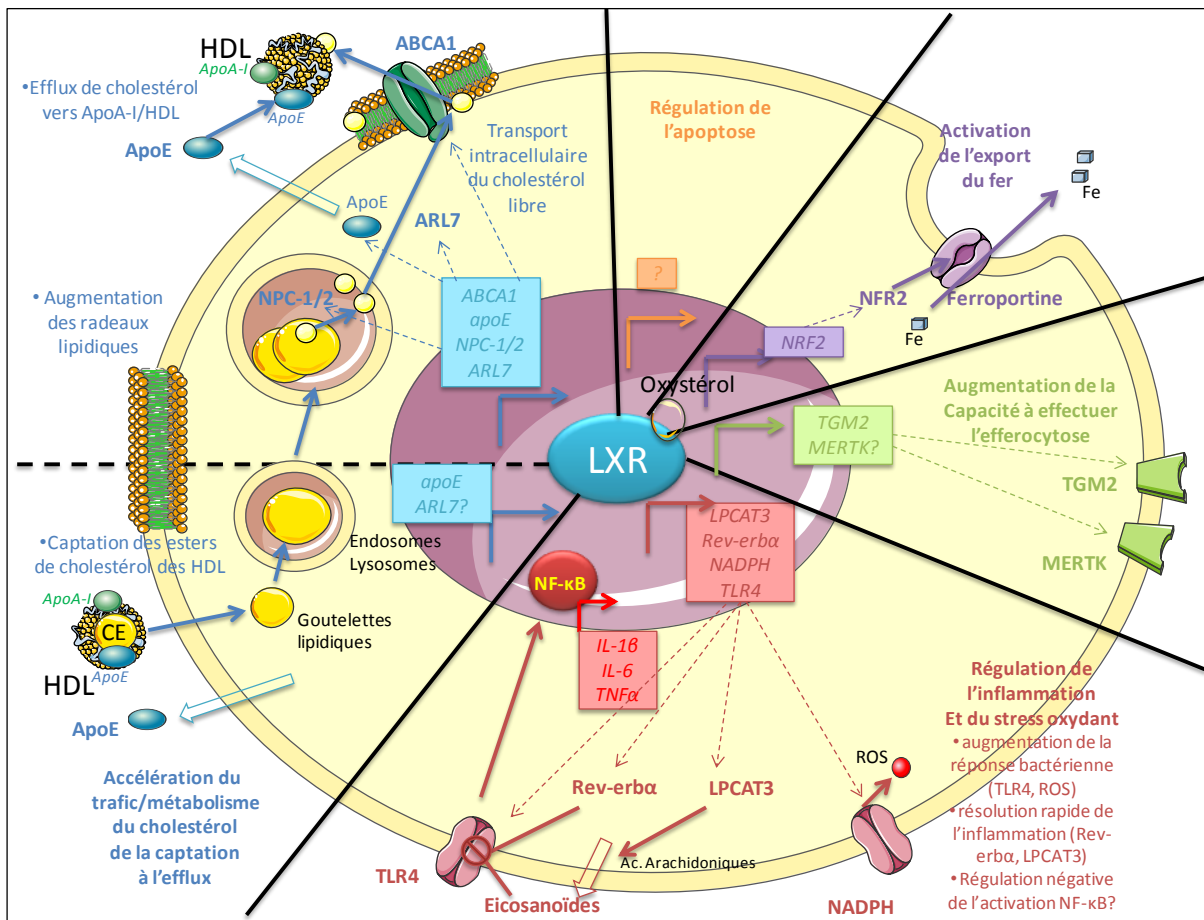


Figure 19 – L'activation de LXR dans le macrophage humain

L'effet de l'activation LXR dans la régulation de l'homéostasie lipidique, l'inflammation, le stress oxydant, l'efférocytose, l'apoptose et la gestion du fer via l'induction de ses gènes cibles dans le macrophage humain a été résumé ici.

2. Les microRNAs

Les microRNA (miRNAs) sont une classe de régulateurs post-transcriptionnels. Il s'agit de molécules d'ARN non-codants d'environ 20 – 25 nucléotides de long qui répriment l'expression de gènes cibles en se liant spécifiquement sur la région 3'UTR de leurs messagers - par complémentarité de bases (Bartel DP. Et al, Cell 2009). Depuis leur découverte récente, ils ont attiré l'attention car ils régulent des fonctions importantes de la cellule, et jouent des rôles physiologiques comme physiopathologiques. Soixante-dix maladies humaines ont une corrélation directe avec l'expression d'un ou d'une famille de mi-RNA tissu-spécifique (Soifer HS et al, Mol Ther 2007). Ici j'ai choisi de détailler uniquement quelques exemples.

- miR-33a/b

Il s'agit d'un miRNA intronique localisé dans le gène de SREBF1/2. Il est connu comme un suppresseur de l'expression d'ABCA1. Ainsi, le silencing de miR-33a chez la souris augmente l'expression d'ABCA1, le taux de HDL-C, le RCT, diminue la formation de plaques d'athérome et augmente leur stabilité (Rainer KJ. Et al, J Clin Invest 2011). Ainsi, il a été proposé comme une nouvelle cible thérapeutique.

Le parallèle avec l'humain est une fois de plus compliqué, le rongeur n'exprimant que miR-33a et pas miR33b. Une double inhibition des deux isoformes chez le singe vert africain a eu les mêmes effets d'augmentation d'ABCA1, du HDL-C et du RCT. En parallèle, une augmentation primate-spécifique de l'oxydation des acides gras, et une diminution de leur synthèse ainsi que du taux de VLDL ont été observées. Si ces régulations n'ont pas été corrélées à l'athérosclérose, l'inhibition des miR-33a et 33b est une stratégie thérapeutique prometteuse pour traiter les dyslipidémies responsables de l'athérosclérose (Rayner KJ et al, Nat Let 2011).

- miR-206

Deux études suggèrent que miR-206 réprime la lipogénèse induite par l'activation de LXRα dans les hépatocytes (Zhong D. et al, 2013, Cell sign) tout en augmentant l'expression de l'isoforme dans le macrophage humain et l'efflux de cholestérol cellulaire associé (Vinod M. et al, 2014 Bioch Bioph Acta).

- miR-26

Ce miR se lie aux régions 3'UTR des transcrits de 2 gènes spécifiques : ARL7 et ABCA1, et provoque leur dégradation. Cette inactivation annule complètement la stimulation de l'efflux de cholestérol cellulaire du macrophage humain par les agonistes LXR. Ce mécanisme est cohérent avec la première étude présentée ci-après, qui détaille le mécanisme faisant intervenir uniquement ABCA1 et ARL7 dans la stimulation de l'efflux de cholestérol cellulaire par la stimulation de LXR α (Sun D. et al, FEBS Lett 2013)

III. Inflammation & Inflammasomes

Ainsi, la composante inflammatoire de l'athérosclérose, est de mieux en mieux décrite et suscite l'intérêt croissant de la communauté scientifique. Un anticorps neutralisant le médiateur inflammatoire IL-1 β fait même l'objet d'une étude clinique, CANTOS (Ridker PM. Et al , *Circulation* 2012). Les macrophages, cellules de l'immunité innée, sont encore une fois les principaux acteurs de cette composante. Pas uniquement, comme on l'a longtemps pensé, par leur rôle de phagocytes les transformant en cellules inertes gorgées de cholestérol, mais bien en tant qu'acteurs et même initiateurs de cascades moléculaires d'inflammation dans la plaque.

Egalement, au niveau translationnel, comprendre les mécanismes de l'activation de l'inflammation dans les macrophages est important, car ils jouent un rôle dans de nombreuses pathologies dans lesquelles l'inflammation intervient, en particulier des pathologies liées au syndrome métabolique, ensemble de symptômes physiologiques menant aux MCV. Notamment, le tissu adipeux et le foie présentent des macrophages résidents, et l'inflammation chronique dans ces tissus est un marqueur respectivement de l'obésité et de la stéato-hépatite (NASH). Les macrophages contribuent également à nombres d'autres pathologies, notamment le SIDA ou les pathologies microgliales (Wynn TA. et al, *Nature Rev* 2012).

Si les macrophages sont vus comme une population de plus en plus hétérogène sur le plan de l'inflammation, et même d'autres fonctions, des voies de signalisations récurrentes entrent en jeu. Dans l'athérosclérose, l'inflammation délétère et chronique promue par les macrophages principalement est causée par un stress oxydatif au niveau de l'endothélium et les LDLox dans la plaque. Elle est ainsi complètement indépendante de pathogènes extérieurs (Wright SD. Et al, *J Exp Med* 2000). Ici seront décrites les voies principales activées, notamment celle du facteur de transcription NF- κ B déjà évoquée précédemment, ainsi que les différents médiateurs sécrétés et leurs fonctions.

En particulier, de nouveaux acteurs ont été identifiés récemment dans ces régulations inflammatoires et suscitent l'intérêt général : les complexes multi-protéiques de type « inflammasome ». Dans les 2^{ème} et 3^{ème} études présentées ci-après, j'ai tenté de moduler l'activation de l'un de ceux-ci, l'inflammasome NLRP3, dont l'implication dans l'athérosclérose et éventuellement d'autres pathologies fait débat.

A. L'inflammation classique dans le macrophage

1. Stimuli, récepteurs et populations

Les monocytes, précurseurs circulants des macrophages, ont pour fonction d'une part de veiller à l' « approvisionnement » des organes en macrophages résidents, mais aussi d'investir rapidement les tissus endommagés ou infectés (Chi S. et al, Nature Rev 2011). Ils s'y différencient en macrophages, qui vont promouvoir :

- l'immunité innée non-spécifique par la reconnaissance d'une large batterie de stimuli, les PAMPs et les DAMPs (Pathogen/Damage associated molecular patterns), phagocytter ces derniers et sécréter des cytokines déclenchant une inflammation locale et aiguë
- mais également l'immunité adaptative, réponse antigène spécifique, par leur rôle de cellule présentatrice d'antigènes (CPA). Ils pourront présenter des antigènes issus de molécules phagocytées à leur surface via le complexe d'histocompatibilité majeur de classe II (MHC-II)

Le chimiotactisme des monocytes à un site de la paroi des vaisseaux, de diapédèse et de transmigration dans l'intima a été décrit chapitre I et [figure 3](#). Notamment, les chimiokines, molécules chemoattractantes synthétisées et sécrétées par les tissus endommagés et les macrophages déjà présents sur les lieux sont impliquées ; CCL2/MCP-1, CCL5 et CX₃CL1/Fractalkine sont impliquées dans le cas des monocytes et de l'infiltration dans l'intima.

Deux molécules provoquent la différenciation du monocyte en macrophage : le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) et le M-CSF évoqué précédemment.

Si l'un ou l'autre ne déterminent en aucun cas ni le devenir ni la polarisation future des macrophages, ils les rendent plus plastiques vis-à-vis d'une voie que l'autre. Il a été démontré que la différenciation par le GM-CSF induit un phénotype davantage tourné vers l'activation de l'inflammation que la différenciation par le M-CSF (Fleetwood AJ. Et al, J Leukoc Biol 2009 and J Immunol 2007), même si ce résultat est controversé (Waldo SW et al, Am J Pathol 2008). Le GM-CSF est également responsable de la différenciation des monocytes en cellules dendritiques (van de Laar L. et al, Blood 2012).

Ensuite intervient la polarisation des macrophages par l'environnement cytokinique entre autres. Traditionnellement, ont été décrits et présentés chapitre I et figure 6 les deux populations de macrophages

- classiques inflammatoires M1
- alternatifs et anti-inflammatoires M2

Ces deux populations sont issues d'une polarisation bien particulière, puisqu'elles sont différenciées respectivement par deux cytokines sécrétées par les lymphocytes T, l'IFN γ et l'IL-4. La polarisation M1/M2 est en réalité plus un modèle pour étudier le potentiel de déclenchement et de résolution de l'inflammation d'une population de macrophages. Il existe en réalité une variété bien plus importante de profils de macrophages, chaque stimulus

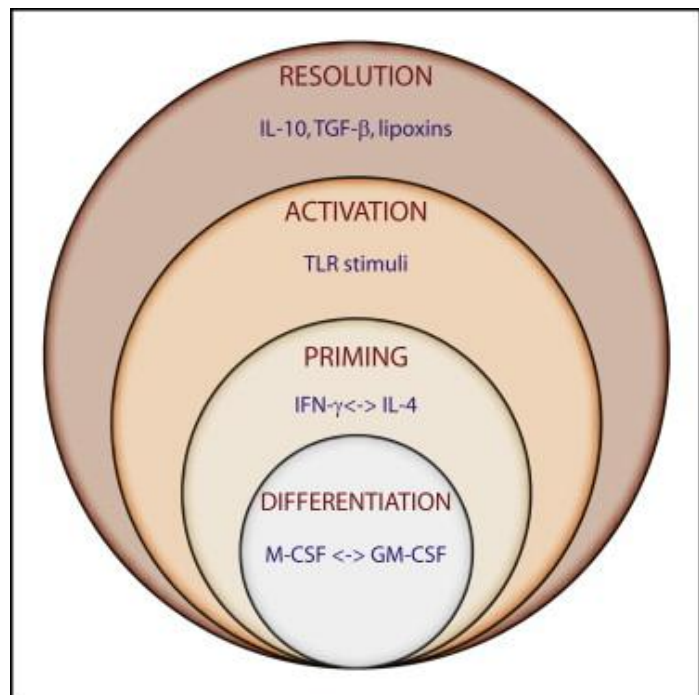


Figure 20 – De la différenciation à l'inflammation
(Gordon S. et al, Immunity 2010)

activant des voies différentes, activant elles-même un panel de fonctions différentes (Sica A et al, J Clin Inv 2012). Ainsi, par exemple, les macrophages différenciés par l'IL-4 sont comme vus précédemment, capables d'activer des facteurs de transcriptions et gènes leur conférant une forte capacité de phagocytose. Ils expriment très faiblement le récepteur nucléaire LXR, malgré son rôle anti-inflammatoire concordant avec le profil des « M2 » (Chinetti-Gbaguidi et al, 2011). Il apparaît ainsi difficile de classer les macrophages en sous-populations bien

définies, correspondant à des inflammation de type « Th », leur environnement étant souvent plus complexe qu'une signalisation binaire IFN-STAT1/IL-4-STAT6. En réalité il s'agit plutôt d'un continuum de cellules présentant des profils d'activation très divers, souvent définis par l'activité de nombreux facteurs de transcriptions ([Tableau 3](#)), le M1/M2 n'étant que les phénotypes « extrêmes » faciles à identifier, à quantifier et utilisables comme des outils pour étudier la signalisation. Ainsi, dans mes études sur l'inflammasome et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, nous avons fait le choix de polariser des modèles de macrophages cellulaires en « M1 » pour avoir une activation de l'inflammation optimum.

	M1 -classiques	M2 alternatifs
Différenciation	GM-CSF > M-CSF	M-CSF > GM-CSF
Induction	INF γ LPS - PAMPs TNF IL-1	IL-4 IL-13 IL-10
Facteurs de transcription	STAT1 NF- κ B-p65 IRF1 IRF5 NFAT5 SOCS1/3	STAT-6 NF- κ B-p65 PPAR γ Cebpb KLF2 KLF4 SOCS1 STAT3
Fonction	proinflammatoire sécrétion de ROS dégradation de matrice	anti-inflammatoire fibrose phagocytose résolution
Marqueurs	IL-12 IL-23 iNOS IL-1	Arg1 CD206 (MR) IL-10 TGF β

Tableau 3 – M1/M2, les deux phénotypes extrêmes

Caractérisation des macrophages M1 pro-inflammatoires et M2 anti-inflammatoires.

Par exemple, l'activation du facteur de transcription LXR α est indispensable pour la spécialisation des macrophages spléniques de la zone marginale de la rate, impliqués dans la croissance de cette zone, la reconnaissance d'antigènes circulants, l'immunité adaptative et notamment la réponse IgM par les lymphocytes B spléniques ; ces différenciation spécialisées correspondent bien à un programme transcriptionnel LXR-dépendant (A-Gonzales N. et al, Nat Immunol 2013).

Si la présence de lymphocytes T dans la plaque d'athérome est indéniable et fait l'objet de nombreuses études actuelles (Mallat Z. et al, J Lipid Res 2009), ils ne sont pas les seuls activateurs de l'inflammation des macrophages, présents en grand nombre. Celle-ci passe en majorité, comme décrit chapitre I, par la détection d'un stress oxydant et plus particulièrement de lipoprotéines oxydées, reconnues par les récepteurs aux DAMPs, principalement les Scavengers décrits précédemment (figure 5). Ceux-ci sont associés aux TLRs, en particulier TLR2, 4 et 6 (cf chapitre I). Ces derniers constituent une grande famille, à la base de l'immunité innée, puisqu'ils reconnaissent les PAMPs, molécules partagées par les pathogènes de manière large et non-spécifique. Les macrophages sont par ailleurs les cellules qui expriment la plus grande variété de TLR (Figure 21) (Seneviratne AN. Et al, Clin Chim Acta 2012).

Ainsi, dans mes études sur l'inflammation, j'ai choisi afin de mimer celle-ci d'activer le récepteur TLR4 avec du LPS dans mes cultures de macrophages. Largement utilisée dans la bibliographie, l'activation LPS est extrêmement efficace et induit les deux voies de réponse MyD88 et TRIF (Lu YC. Et al, Cytokine 2008). Le traitement de macrophages humain par des LDLox active la transcription de cytokines de manière analogue au LPS, via TLR2, 4 et 6 (Stewart CR. et al, Nat Immunol 2010 ; partie I). Les macrophages THP-1, déjà inflammatoires car différenciés avec du PMA, voient l'expression des gènes de l'inflammation augmenter drastiquement par un traitement LPS, même à faible dose. Les macrophages primaires naïfs acquièrent un phénotype de type M1, analogue à celui induit par un traitement via l'IFN γ , après un traitement au LPS.

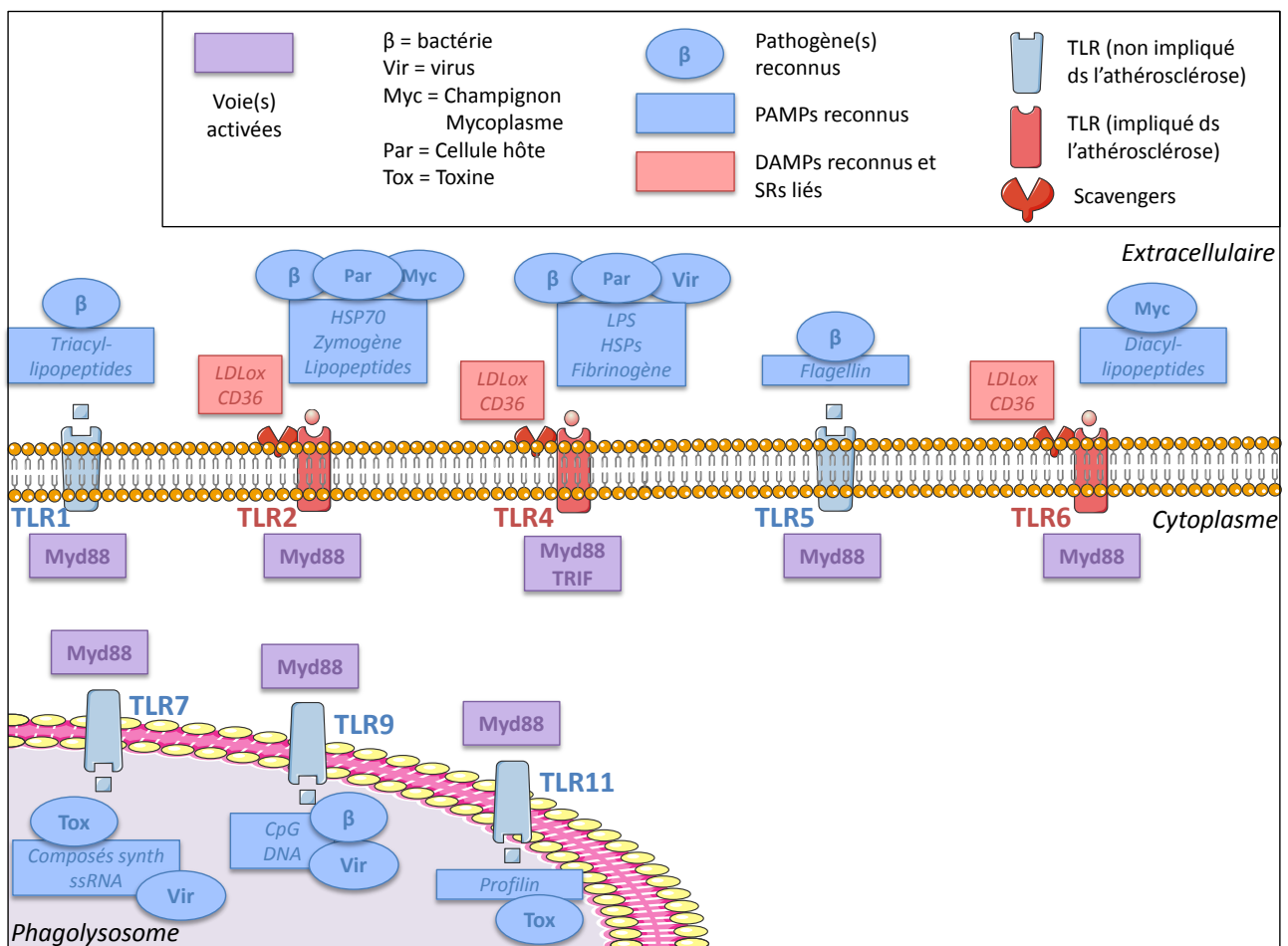


Figure 21 – Les récepteurs TLRs et l'immunité innée

Les cellules immunitaires, en particuliers les macrophages, présentent une diversité de récepteurs TLR capables de reconnaître diverses catégories de PAMPs. Certains d'entre eux reconnaissent également les DAMPs liés à l'athérosclérose et sont importants dans l'initiation de l'inflammation dans la maladie. Ils transduisent leur signal inflammatoire via les facteurs MyD88 et TRIF.

2. L'activation transcriptionnelle de l'inflammation : NF-κB

a) Les cascades de signalisation Myd88 et TRIF

L'activation de MyD88 d'une part ou de TRIF uniquement dans le cas de l'activation de TLR4 va déclencher des cascades de phosphorylations de nombreux facteurs et complexes pour aboutir à l'activation de trois facteurs de transcription :

- IRF-3 (Interferon-Regulatory factor 3), responsable notamment de l'activation de la transcription des interférons de type I, notamment l'IFNβ, impliqué dans la réponse anti-virale (Reimer T. et al, J Leukoc Biol 2008)
- AP-1, dont l'activation fait suite à une cascade de phosphorylation par des MAP-kinases, est un homodimère des protéines cJun et cFOS, transloquées dans le noyau une fois phosphorylées. Il se liera sur la séquence 5'-TGAG/CTCA-3' du promoteur de certains gènes, souvent de manière concordante avec NF-κB. C'est ce facteur qui sera notamment activé par le traitement par du PMA (Carter AB., J Biol Chem 2001)
- NF-κB sera lui aussi transloqué dans noyau. (voir ci-après)

(Figure 22)

(Légende figure 22) La liaison du LPS a son récepteur TLR4 va entraîner le recrutement intracellulaire par ce dernier de MyD88 et de TRIF. Ces deux transducteurs de signal vont initier une cascade de modification post-traductionnels aboutissant

- à la phosphorylation activatrice du complexe IKK, qui pourra lui-même promouvoir la dégradation d'IκB, la protéine qui séquestre le facteur de transcription NF-κB dans le cytoplasme.
- à l'activation du facteur de transcription AP-1 via l'activation des kinase JNK et p38
- à l'activation de l'IKKε, elle-même activatrice du facteur de transcription IRF3
- Trois facteurs de transcription, AP-1, NF-κB et IRF3, sont donc activés et transloqués dans le noyau où chacun activera son programme transcriptionnel

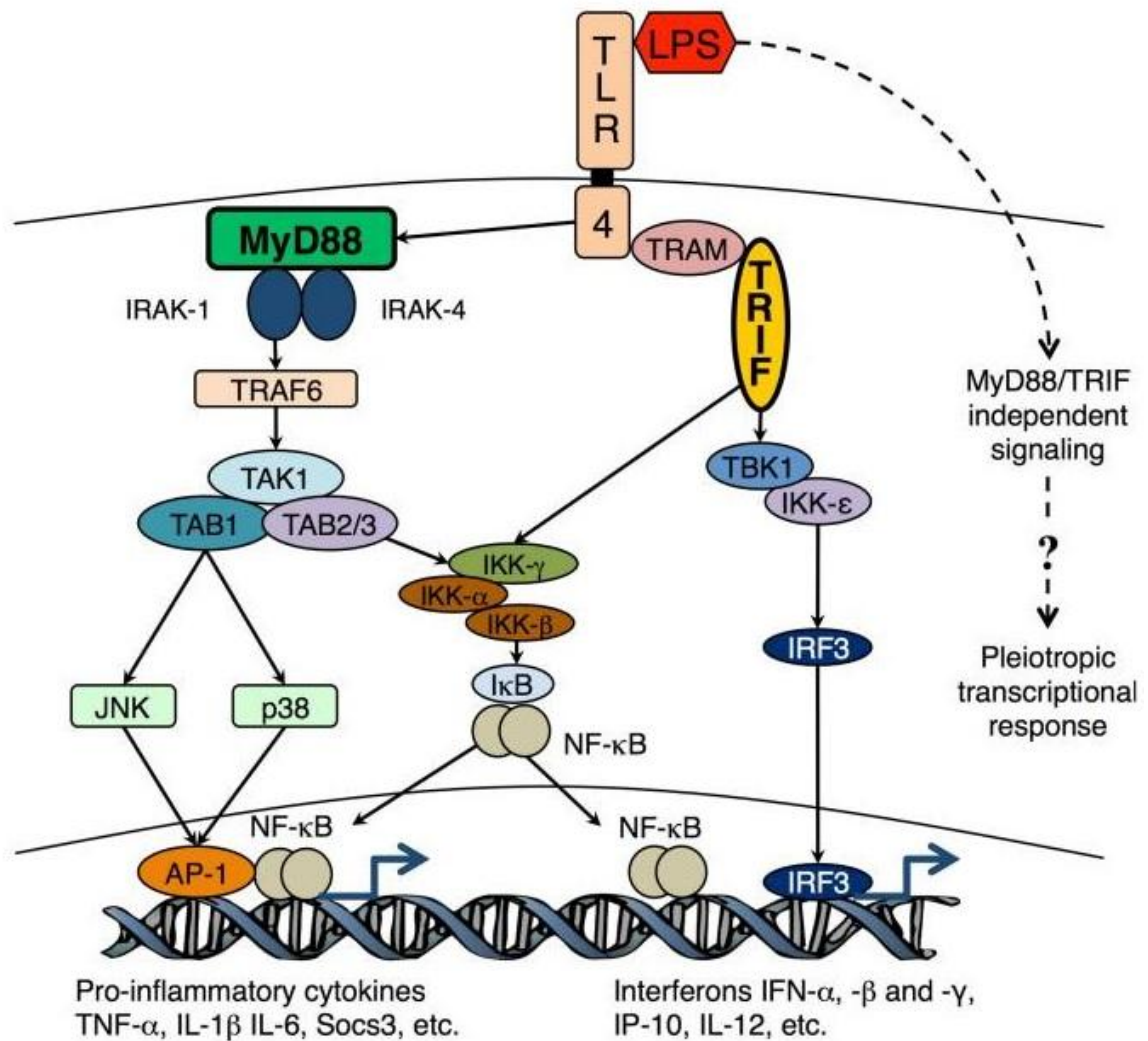


Figure 22 – La voie classique d’activation de l’inflammation dans le macrophage

(Piras V. et al, Front Immunol 2014)

Les Nuclear Factor kappa B correspondent en réalité à une famille de 5 protéines de la famille « Rel », contenant tous un « Rel-homology domain » (RHD) contenant à la fois :

- un domaine interagissant avec la protéine inhibitory kappa B (IκB)
- un signal de translocation nucléaire
- un domaine capable de lier l’ADN

(Li Q. et al, Nat Rev Immunol 2002)

Il y a 5 membres différents dans cette famille, répartis en 2 classes :

- la classe I comprend les précurseurs NF- κ B1 (ou p105) et NF- κ B2 (ou p100), métabolisés respectivement en p50 et p52.
- la classe II comprend les protéines RelA (ou p65), RelB et c-Rel, qui contiennent le domaine de transactivation dans leur région C-terminale.

(Hayden MS. Et al, Genes Dev 2004)

Dans le cytoplasme, les I κ B (I κ B α , β , ou γ) lient les NF- κ B en masquant son signal de translocation nucléaire, le séquestrant ainsi dans le compartiment et l'empêchant d'activer ses gènes cibles. Il existe 2 voies majeures d'activation de NF- κ B, hétérodimère d'une protéine de classe I et d'une protéine de classe II, qui activent spécifiquement des isoformes différentes de NF- κ B :

- la voie d'activation canonique est celle qui nous intéresse ici. En effet, c'est celle qui fait suite à un stimulus inflammatoire, notamment via TLR/MyD88, mais également via une activation du TNF-R par TNF α , de l'IL-6R par IL-6 ou de l'IL-1R par IL-1 β . La cascade de signalisation aboutit à la phosphorylation du complexe I κ B-kinase (IKK), composé des protéines IKK α , IKK β et IKK γ (ou NF- κ B essential modulator NEMO). Les deux premières ont une activité catalytique distincte, tandis que la dernière maintient le complexe. Ce complexe phosphorylera I κ B, alors ubiquitinilée et dégradée. Le facteur de transcription NF- κ B, en particulier l'isoforme p50-p65, sera alors transloqué dans le noyau puis se fixera sur les séquences du génome qu'il reconnaît, les NF- κ BRE (NF- κ B-response element). Il activera les gènes des facteurs pro-inflammatoires (*IL-1 β* , *TNF α* , *MCP-1*), des molécules d'adhésion (*ICAM-1* *VCAM-1*) ou des inhibiteurs de l'apoptose (*Bcl2*, *BclX*) (Snale ST., Nat Immunol 2011)
- La voie d'activation non-canonique, plus impliquée dans la fonction d'immunité adaptative du macrophage, fait intervenir des stimuli différents comme la lymphotoxin (LT) β , le B-cell activating factor (BAFF) ou le CD40-Ligand. S'ensuit une voie de transduction différente, aboutissant à l'activation de la NF- κ B inducing kinase (NIK), capable d'activer un homodimère IKK α -IKK α , qui va maturer la p100 en p52. Cette dernière formera un complexe avec RelB et ira activer des gènes différents, davantage impliqués dans le développement des organes lymphoïdes secondaires ou l'activation des lymphocytes B (*BAFF*, *GlyCAM-1*...) (Sun SC., Cell res 2010).

(Figure 23)

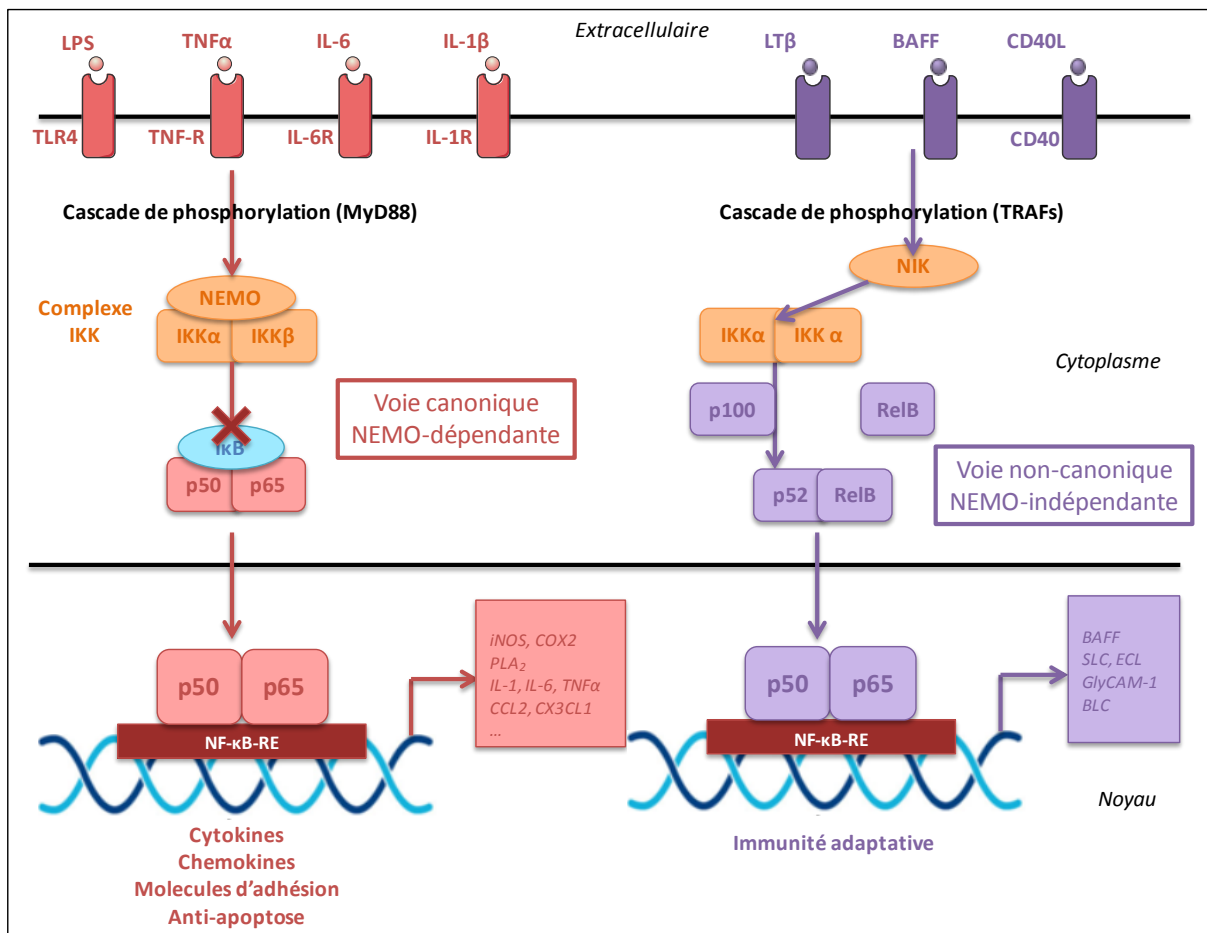


Figure 23 – Les voies d’activation NF-κB

Les deux différentes voies faisant intervenir l’activation facteur de transcription NF-κB, présentées ci-dessus, ont des stimuli et des fonctions différentes. Dans le cadre de cette étude on s’intéressera davantage à l’activation de la voie canonique, responsable de la transcription des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans l’inflammation délétère présente dans la plaque d’athérome.

L’activation simultanée des facteurs AP-1 et NF-κB induira la transcription des principales cytokines impliquées dans l’inflammation aigüe, notamment IL-1β, dont les inhibiteurs sont testés actuellement dans l’étude CANTOS.

b) Les facteurs NF- κ B dépendants

Afin de mieux comprendre le rôle pivot que joue NF- κ B dans l'inflammation chez les phagocytes et par extension dans l'athérosclérose, il faut décrire les principaux facteurs dont il a le contrôle de l'expression.

▪ Le Tumor Necrosis Factor α (TNF α)

Cette cytokine a des effets extrêmement délétères au niveau du développement de l'athérosclérose. Les modèles de souris *apoe^{-/-} TNF^{-/-}* ont une diminution du développement de lésions en comparaison avec les *apoe^{-/-}* (Ohta H. et al, Atherosclerosis 2005 ; Brånen L. et al, ATVB 2004).

En effet, TNF α est produite de manière prédominante par les macrophages, production encore augmentée chez les macrophages gorgés de cholestérol (Li Y. et al, J Biol Chem 2005). Après sa synthèse elle ne nécessite qu'une étape de clivage activateur par l'enzyme ADAM17 dans le réticulum endoplasmique. TNF active deux récepteurs distincts TNF-R1, exprimé largement, et TNF-R2, spécifique aux cellules immunitaires. Le premier, largement étudié, active la phosphorylation du complexe IKK et la voie MAPK, augmentant l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1, comme décrit précédemment. Il contient également un « domaine de la mort » FADD-proCaspase-8, qui activera une cascade menant à l'activation de la Caspase-3, responsable de l'apoptose. L'activation du TNF-R2 est également importante pour l'activation de NF- κ B avec une cinétique plus tardive, et certainement sous-estimée.

Pour conclure, l'activation TNF α du macrophage a un rôle extrêmement délétère à tous les niveaux :

- Sa sécrétion par les macrophages stimule et augmente l'expression des molécules d'adhésion par l'endothélium, ainsi que des chimiokines.
- Son rôle autocrine sur la voie NF- κ B est responsable de la perpétuation de la réponse inflammatoire chronique, extrêmement délétère dans le cas de la formation de lésions, la résolution de l'inflammation correspondant à une stabilisation de celles-ci
- Son rôle dans l'activation de l'apoptose antagonise les effets bénéfiques de NF- κ B au niveau de la survie cellulaire. Cette fonction est normalement dédiée à la lutte contre

la prolifération des tumeurs, d'où le nom de la cytokine. Dans le contexte de l'athérosclérose, l'apoptose est bénéfique durant les stades précoces, mais lorsque l'efférocytose devient déficiente dans les plaques avancées, on aura une augmentation des corps nécrotiques et une déstabilisation de la plaque (Gautier EL. Et al, Circ Res 2007).

(Parameswaran N. et al, Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2010)

▪ L'interleukine 6 (IL-6)

L'interleukine 6 a un rôle bien plus complexe dans l'inflammation et l'athérosclérose que la précédente. Elle est également produite de manière importante par les macrophages, en particulier les cellules spumeuses (Li Y. et al, J Biol Chem 2005). En effet, des études ont corrélé le taux d'IL-6 plasmatique avec le risque de développer des MCV chez l'homme (Ridker PM. et al, Circulation 2000). Aucun élément ne permet cependant de relier les deux facteurs causalement. De plus, les études chez la souris ont des résultats contradictoires. L'injection d'IL-6 à des doses supraphysiologiques augmente la formation de lésions chez des souris C57BL/6 et *apoE*^{-/-} (Huber SA., ATVB 1999), mais les souris *apoE*^{-/-} *IL-6*^{-/-} développent plus d'athérosclérose que le *apoE*^{-/-} sous régime surgras (van Leiten B. et al, J Biol Chem 2001) ou normal (Schieffer B. et al, Circulation 2004). L'inactivation d'IL-6 dans les souris *LDLR*^{-/-} n'a eu aucun effet sur la taille des lésions (Song L. et al, Atherosclerosis 2004).

Cette variabilité est probablement due au double rôle pro-inflammatoire/anti-inflammatoire de l'IL-6. L'activation du IL-6R et de son partenaire gp130 (CD130) va, par une cascade de signalisation JAK/STAT, aller activer les deux facteurs de transcription STAT1 et STAT3. Le premier, caractéristique de la polarisation M1 « classique », sera responsable de l'activation de gènes pro-inflammatoires. STAT3 cependant sera responsable de la sécrétion de l'IL-10, caractéristique de la résolution de l'inflammation, et capable d'auto-activer STAT3 lui-même. L'activation d'IL-6 sera ainsi capable de réprimer la signalisation IL-1 par la sécrétion d'IL-1Ra (Interleukine 1 récepteur antagonist) et la signalisation TNF par l'expression de TNF-R soluble. Les médiateurs de l'inflammation sont cependant capables également d'inhiber la signalisation IL-6 via l'expression du facteur SOCS3 ; il s'agit donc d'un effet contrebalancé (Yoshimura A., Nat Rev Immunol 2007).

Une étude de notre équipe a confirmé ces mécanismes dans le macrophage humain. Un traitement par l'IL-6 stimule chez celui-ci l'expression d'ABCA1 et l'efflux de cholestérol

via ce dernier par l'intermédiaire de STAT3. Egalement, le traitement aboutit à une meilleure efferocytose, à l'augmentation de la sécrétion d'IL-4 et IL-10 et à la diminution de celle de IL-1 β . Tous ces effets allant vers une polarisation de type M2 des macrophages par le traitement IL-6 : dans ce modèle, l'activation STAT3 semble avoir pris le pas sur celle de STAT1 (Frisdal E. et al, J Biol Chem 2011). De plus, un traitement IL-6 augmente l'expression de PON-1, enzyme permettant l'efflux ABCA1 vers les HDL dans les hépatocytes (Cheng CC. Et al, Biochem Biophys Res Commun. 2013).

▪ La famille IL-1

Elle est composée de 11 protéines qui partagent une forte homologie de séquence : IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33, IL-37 en font partie. Il existe une hétérogénéité fonctionnelle, IL-1 α , β et IL-18 étant pro-inflammatoire et athérogènes et IL-1Ra, IL-33 et IL-37 étant anti-inflammatoires.

La maturation post-traductionnelle et sécrétion des IL-1 β et IL-18 est régulée par l'inflammasome NLRP3 – leurs rôles et signalisations seront décrits dans la partie IIIB.

L'IL-1Ra est un antagoniste endogène du récepteur à l'IL-1 β , IL-1R. Il est exprimé et sécrété par les macrophages « M2 », son rôle anti-inflammatoire ayant des propriétés athéroprotectrices démontrées chez les souris apoE^{-/-} et LDLr^{-/-} (Elhage R. et al, Circulation 1998 ; Devlin CM. Et al, Proc Natl Acad Sci U S A 2002 ; Merhi-Soussi F. et al, Cardiovasc Res 2005).

Les IL-33 et IL-37 ont été plus récemment découvertes et décrites comme anti-inflammatoires. La première induit une réponse immunitaire générale de type Th2, la seconde diminue fortement la production de IL-1 β et de TNF α . IL-33 est athéroprotectrice chez la souris (Miller AM., J Exp Med 2008). L'expression d'IL-37 est significativement augmentée chez les patients à risque pour les MCV, sans lien causal mis en évidence (Ji Q. et al, Mediators Inflamm).

▪ Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1 ou CCL2)

La chimiokine responsable de l'attraction et l'infiltration des monocytes LY-6C^{high} au niveau de la lésion d'athérome a été bien décrite. Comme vu précédemment, l'étude reportant la quasi-absence de lésions chez les souris apoE/MCP-1 KO a fait partie de celles

établiant le rôle clé du macrophage dans le développement de l'athérosclérose (Boring L, Charo IF, Nature 1998). Les macrophages inflammatoires de la plaque étant eux-même capable de sécréter ce facteur, il sera responsable d'un recrutement toujours augmenté et perpétuel de cellules immunitaires et du développement de la maladie. Une inactivation spécifique du récepteur CCR-2 dans les lignées myéloïdes par une greffe de moëlle osseuse chez des souris apoE3-Leiden, développant l'athérosclérose, inhibe la formation de lésions dès les premiers stades (Guo J. et al, ATVB 2003). Cependant on ne sait pas si la sécrétion endogène de la chimiokine CCL-2/MCP-1 par les macrophages de la plaque eux même est indispensable pour la progression de la maladie ; ceux-ci sont en effet une source majeure de cette chimiokine (Yoshimura T. et al, J Immunol 1989).

▪ L'interleukine 10 (IL-10)

L'induction de l'IL-10 par NF- κ B est toujours discutée. Il semble cependant que sa transcription soit bien régulée par l'activation canonique de la voie et le facteur p50/p65 (Cao S. et al, J Biol Chem 2006). Cependant, la sécrétion de cytokine n'est pas abolie chez les animaux NF- κ B1^{-/-}, d'autres facteurs de transcription entrant en jeu dans son expression, dont l'activation est complexe et multi-factorielle (Lucas M ; et al, J Immunol 2005). Ces résultats confèrent une régulation plus originale que prévue à NF- κ B, qui serait donc capable de réguler sa propre activation, et de résoudre l'inflammation qu'elle active, contrastant avec son rôle de stimulation d'une inflammation durable et chronique.

L'IL-10 possède clairement des propriétés athéroprotectrices, (Mallat Z. et al, Circ res 1999) mises en évidence dans de nombreuses études. Les souris apoE^{-/-} IL-10^{-/-} voient leur athérosclérose augmenter (Caligiuri G. et al, Mol Med 2003). Chez l'homme, un taux élevé d'IL-10 dans le sérum est corrélé à un pronostic favorable pour le développement de maladies cardiaques (Heeschen C. et al, Circulation 2003). La sécrétion importante par les macrophages, en particulier les M2, est responsable de ces effets anti-athérogènes : une expression d'IL-10 augmentée spécifiquement dans les macrophages de souris LDLr^{-/-} diminue le développement de plaques d'athérome. Il en résulte une diminution de l'apoptose et de l'inflammation dans la plaque, ainsi qu'une augmentation de l'internalisation et l'efflux de cholestérol par les cellules spumeuses via l'activation de STAT3 (Han X. et al, Faseb J 2010).

En effet, l'interleukine 10 semble jouer sur plusieurs tableaux dans le macrophage pour réduire l'athérosclérose : contrôle de l'homéostasie de cholestérol et en particulier stimulation de l'efflux par l'augmentation de l'activité LXR et PPAR γ , diminution de l'activation NF- κ B, de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, des MMPs, sécrétion de l'IL-1Ra, et répression de l'apoptose (Han X. et al, J Biol Chem 2009).

▪ Cyclo-oxygénase-2 (COX-2)

Les cyclo-oxygénases sont des enzymes impliqués dans la formation des eicosanoïdes, une famille de médiateurs lipidiques de différentes réponses physiopathologiques. Leur précurseur, l'acide arachidonique, est premièrement détaché de la membrane plasmique par la phospholipase A₂ (PLA₂) ; il pourra par la suite être métabolisé par plusieurs enzymes, dont COX-1 et COX-2 : celles-ci catalysent la réaction de transformation de l'acide arachidonique en prostaglandines (PG) G₂ et H₂ en particulier. PGH₂ est ensuite transformé en différents médiateurs lipidiques, en fonction d'enzymes exprimés de manière cellule-spécifique.

Contrairement à COX-1, COX-2 est un enzyme inductible exprimé dans les cellules inflammatoires, en particulier les macrophages. Dans ces derniers, il agit avec l'enzyme prostaglandine E synthase (PGES) pour générer de la PGE₂, un médiateur lipidique de l'inflammation. Elle a donc un rôle pro-inflammatoire.

En effet, il a été démontré que COX-2 est exprimée dans les lésions d'athérome murines comme humaines, son expression étant de plus placée sous le contrôle du facteur NF- κ B. Cette promotion de la sécrétion de médiateurs lipidiques de l'inflammation par NF- κ B a un impact négatif sur l'athérosclérose. En effet, des plaques d'endartériectomie de patients considérés comme « symptomatiques » pour les MCV présentent des niveaux plus élevés de COX-2 comparés aux patients « asymptomatiques ». L'expression de COX-2 est localisée dans le cœur lipidique des plaques, ainsi que dans les macrophages activés (Cipollone F. et al, Circulation 2001). Cependant, l'effet des LDLox sur l'expression de cette dernière est controversé : les résultats divergent (Cipollone F. et al, Pharmacol Ther 2008). Enfin, l'inhibition pharmacologique de COX-2 par le rofecoxib, ou son invalidation spécifique dans les lignées hématopoïétiques, dans des souris LDLr^{-/-}, réduit l'athérosclérose dans les phases précoces (Burleigh ME. Et al, Circulation 2002), soulignant donc l'effet délétère de l'activité COX-2 et des PGE₂ dans l'initiation de la formation de la plaque.

L'implication d'autres facteurs NF- κ B-dépendants dans l'inflammation et l'athérosclérose a été étudiée. Ils seront décrits plus rapidement :

- L'interleukine 8 (IL-8) est une chimiokine humaine responsable de l'attraction des neutrophiles mais qui a également un rôle dans la migration et la prolifération des CML. Elle est sécrétée en majorité par les macrophages, sa sécrétion étant augmentée par les LDLox. Chez l'homme, on détecte une augmentation de cette cytokine dans artères athérosclérotiques comparées aux artères saines. Son homologue murin, CXCL1, a été inactivé dans des souris LDLr^{-/-} : son absence réduit le développement de lésions. L'inactivation de l'homologue murin de son récepteur, CXCR2, spécifiquement dans les lignées myéloïdes de souris LDLr^{-/-} réduit la taille des lésions et leur contenu en macrophages. Tout ceci va vers un rôle pro-athérogène de l'IL-8 (Apostolakis S. et al, Cardiovasc Res 2009)
- L'interleukine 12 (IL-12), marqueur privilégié des macrophages M1, est une cytokine pro-inflammatoire responsable de l'induction de la polarisation Th1. L'IL-12p35 et l'IL-12p40 peuvent s'associer ou former d'autres hétérodimères sécrétables avec par exemple l'IL-23p19. Sécrétée, elle agit notamment sur les lymphocytes T où elle promeut la sécrétion d'IFN γ via le facteur T-bet. Sa déficience chez les apoE^{-/-} diminue l'athérosclérose, alors que les injections d'IL-12 l'augmentent chez le même modèle. Les souris LDLr^{-/-} vaccinées contre l'IL-12 voient également leur développement de lésions diminuer drastiquement. (Ait-Oufella et al, ATVB 2011)
- iNOS, enzyme du macrophage, est stimulée de manière différente de l'eNOS constitutive et activée par le calcium, est également responsable de la production de NO. Contrairement à son homologue endothéliale, elle produit du NO en grande quantité et de manière transitoire, augmentant la cytotoxicité afin de détruire les pathogènes. Sa présence inappropriée dans les plaques d'athérome humaines est corrélée avec le stress oxydant et plusieurs facteurs d'instabilité (Depré C. et al, Cardiovasc Res 1999) et son inactivation dans des souris apoE^{-/-} diminue l'athérosclérose, le stress oxydant et la peroxydation des lipides circulants (Kulencordt PJ. Et al, Circulation 2001).
- MMP-9, matrix metalloprotéase, et Bcl2/BclX, facteurs anti apoptotiques, sont également NF- κ B dépendants.

c) Inhibition de NF- κ B et athérosclérose

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent un rôle délétère de l'activation NF- κ B dans le macrophage dans le développement de la maladie. La présence de ce dernier sous forme activée a été confirmée dès la fin des années 90 dans des lésions athérosclérotiques humaines (Brand K. et al, J Clinical Invest 1996). Le forme active de p65 a été détectée dans les noyaux de cellules endothéliales, de macrophages et de CMLs dans les intima des vaisseaux de cochons hypercholestérolémiques (Wilson SH. Et al, Atherosclerosis 2000). Enfin, chez la souris, l'activation NF- κ B est plus forte dans les régions artérielles exposées au « Shear stress », prône à développer l'athérosclérose (Hajra L. et al, Proc Natl Acad Sci U S A 2000).

L'activation de facteurs promouvant une inflammation chronique par la voie NF- κ B devrait donc contribuer au développement de plaques faisant suite à une hypercholestérolémie. En effet, les LDLox sont capable d'activer eux-même la signalisation TLR et le facteur de transcription et les facteurs sécrétés sont capables de s'auto-réguler de manière NF- κ B dépendante.

Ainsi, il est indéniable que l'activation de ce facteur joue un rôle crucial dans l'initiation de l'athérosclérose, notamment dans les cellules endothéliales. L'inactivation totale de la voie canonique (délétion de NEMO) spécifiquement dans ces dernières protège les souris apoE^{-/-} du développement de la maladie (Gareus R. et al, Cell Metab 2008). En effet, p50-p65 stimule l'expression de MCP-1, mais aussi des molécules d'adhésion ICAM-1/VCAM-1, des P et E-selectines. Egalement il induit l'expression de la PLA₂ (group IIa secretory phospholipase A2), qui va participer à la modification des LDL et à leur enrichissement en lipides inflammatoires (Ivandic B., ATVB 1999).

De manière plus ou moins surprenante, les études inactivant l'ensemble de la voie de signalisation canonique NEMO-dépendante ont des résultats contrastés sur le développement de l'athérosclérose et suggèrent un rôle plus sophistiqué de cette dernière dans le développement des lésions faisant intervenir des mécanismes différents, propre à l'initiation de l'athérosclérose, la progression de la formation de la plaque ou la résolution dans celle-ci.

Deux expériences de greffe de moëlle osseuse chez des souris LDLr^{-/-} de l'équipe de Menno de Winther ont conduit à des résultats divergeants :

- l'incactivation directe de NF-κB1 dans les lignées myéloïdes entraine une baisse de l'athérosclérose, confirmant le rôle athérogénique de l'activateur. Bizarrement, les plaques sont plus petites mais présentent une inflammation bien plus importante, notamment TNFα (Kanters E. et al, Blood 2004)
- l'inactivation myéloïde-spécifique de IKKβ, acteur indispensable de la voie canonique, aboutit elle à une augmentation du développement des lésions. Ces lésions se développent plus rapidement, et sont plus instables notamment à cause d'une augmentation de la nécrose. La sécrétion de TNFα est cette fois diminuée, ainsi que celle de l'IL-10 (Kanters E. et al, J Clin Inv 2003).

D'autres études menées afin d'élucider le rôle de NF-κB dans le développement de l'athérosclérose ont également conduit à des résultats contradictoires :

- la surexpression d'IkBα sous le contrôle du promoteur macrophage spécifique de SR-A dans des macrophages murins et humains induit la diminution des cellules spumeuse (Ferreira V. et al, Atherosclerosis 2007)
- la surexpression de p65, l'effecteur de la voie canonique, spécifiquement dans les macrophages de souris apoE^{-/-} provoque une diminution de l'athérosclérose et de l'inflammation, (Ye X et al, Am J Physiol Ento Met 2013).
- L'augmentation du stress oxydant et de NF-κB de manière concordante chez des souris LDLr^{-/-} augmente la formation de lésions (Wang Y. et al, Circ Res 2014)
- L'inhibition de NF-κB par traitement par le miR181a chez des souris apoE^{-/-} provoque une diminution du développement de lésions (Sun X. et al, Circ Res 2014)

Ainsi, si l'activation de la voie canonique NF-κB dans les cellules endothéliales et les macrophages qui survient au cours de l'athérosclérose déclenchent la sécrétion de cytokines menant à une inflammation chronique délétère, elle est également capable d'augmenter la survie cellulaire et de résoudre l'inflammation créée via l'IL-10. Il est toujours difficile de prévoir et d'expliquer quel effet aura l'activation de NF-κB sur l'athérosclérose.

Ainsi, dans le cadre de la diminution de l'athérosclérose par un traitement macrophage spécifique, la voie NF-κB semble être une cible risquée car trop large et encore – bien que précisément et abondamment décrite – imprévisible.

3. Autres cytokines NF- κ B-indépendantes

D'autres molécules sécrétées par les macrophages peuvent moduler le développement de la plaque ; notamment :

- Le Transforming Growth Factor β (TGF β), est une cytokine anti-inflammatoire, impliquée dans la réparation tissulaire et la fibrose. Son induction IL-10-dépendante est responsable de l'induction de la polarisation Treg. Sa neutralisation systémique augmente l'athérosclérose chez les souris apoE^{-/-}. (Mallat Z. et al, Circ Res 2001).
- La réponse interféron de type I est induite par la voie TRIF-IRF3 abordée précédemment. Elle correspond à une sécrétion d'IFN α et d'IFN β . Le premier a des effets proathérogéniques, augmente l'expression de TLR4, incidemment la sécrétion de TNF α , MMP9 et IL-12 et la formation de cellules spumeuses en induisant le scavenger SR-A (Li J. et al, Arthritis Rheum 2010 ; Nieissner A. et al, Circulation 2007). L'IFN β a des propriétés athérogéniques chez les souris apoE^{-/-} et LDLr^{-/-} notamment via l'expression des chimiokines, CCL5 en particulier. L'invalidation spécifique de l'IFN β dans les lignées myéloïdes diminue, elle, l'athérosclérose (Goossens P. et al, Cell Metab 2010).

B. L'inflammasome NLRP3

1. Les inflammasomes, multi-senseurs « verrous » de l'inflammation

Les inflammasomes sont une famille de complexes multi-protéiques cytoplasmiques exprimées par les lignées myéloïdes découverts récemment en 2002 par le Pr. Jürg Tschopp, ce qui lui a valu le prix Louis Jeantet de Médecine. Il s'agit d'une nouvelle famille de PRRs, impliqués dans la reconnaissance de signaux microbiens, endogènes ou de stress cellulaires, et ayant donc un rôle capital ignoré jusqu'ici dans l'immunité innée (Martinon F., Tschopp J. et al, Mol Cell 2002).

Ils sont constitués :

- D'un senseur de différents stimuli, une protéine contenant de la pyrine qui partage une homologie de séquence avec NOD (Nucleotid-binding oligomerization domain), appelée NLR (NOD-like receptor), donnant son nom à l'ensemble du complexe. Il existe une grande variété de ces NLRs, responsable ainsi de la variété des complexes. Un seul inflammasome présente un senseur d'une famille différente, AIM2, un membre de la famille PYHIN (pyrin and HIN domain-containing family). Les NLR contiennent un domaine NACHT en leur centre, une ATPase responsable de la formation du complexe. Les domaines PYD et CARD, en N-terminal, sont responsables du recrutement de l'effecteur, le plus souvent Caspase-1. Les séquences « LRRs » (Leucin Rich Regions) en C-terminal, sont, elles responsables de détecter la présence des stimuli PAMPs et DAMPs.
- Lorsqu'ils n'ont pas les deux motifs PYD et CARD dans leur NLR, tels NLRP3 ou NLRP6, ils vont recruter un effecteur, PYCARD, PYD (PYRIN-PAAD-DAPIN domain) and CARD (Caspase-recruitment domain), aussi appelé ASC (apoptosis associated speck-like protein containing a CARD), responsable de lier et d'activer en présence d'un stimulus :
- Le précurseur de l'enzyme Caspase-1 (aussi appelé interleukine-1 converting enzyme). Certains inflammasomes sont également capables de lier l'enzyme caspase 5 (caspase 11 chez la souris).

(Schroder K. et Tschopp J., Cell 2010)

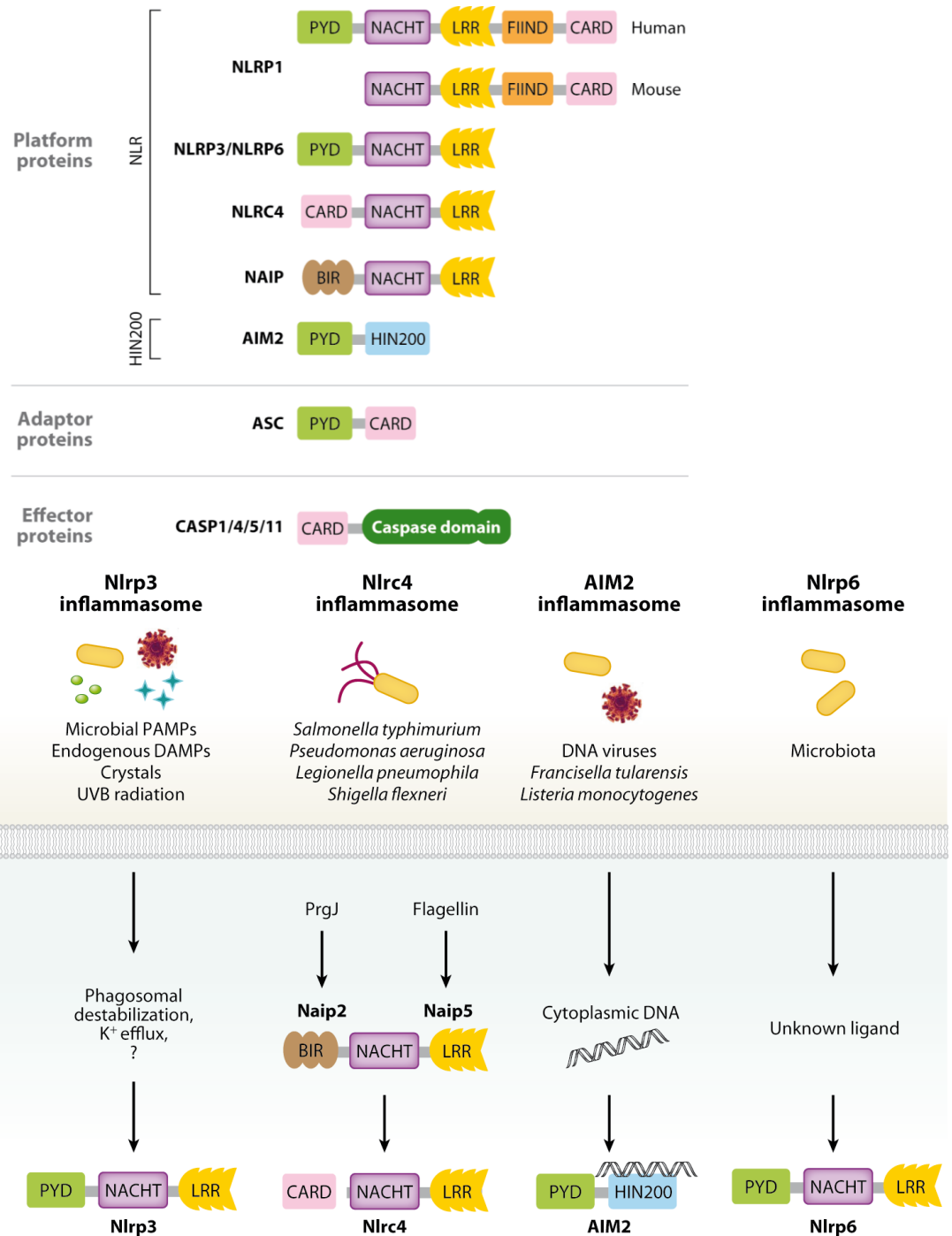
L'aboutissement de l'activation de l'inflammasome est le clivage activateur de cette procaspase-1 en caspase-1, enzyme qui va lui-même cliver les précurseurs de l'IL-1 β et de l'IL-18, deux cytokines pro-inflammatoires en leur forme active et sécrétée. Egalement, l'activation de la caspase-1 est un pré-requis indispensable et caractéristique de l'activation de la pyroptose, mort cellulaire programmée, pro-inflammatoire, analogue à l'apoptose mais présentant plusieurs caractéristiques de la nécrose, comme le relargage des signaux de danger dans le milieu ; ce mécanisme a un rôle dans la lutte contre les infections microbiennes (Tableau 4, Duprez L. et al, Microbes and Infect 2009).

	Apoptose	Pyroptose	Nécrose
Lyse cellulaire		Oui	Oui
Pores membranaires		Oui	Oui
Relargage du contenu cytoplasmique		Oui	Oui
Fragmentation de l'ADN	Oui	Oui	Oui
Caspase	Caspase-3	Caspase-1	
Cytochrome-c release	Oui		
Inflammation	Anti	Pro	Pro
Mort cellulaire programmée	Oui	Oui	

Tableau 4 - Pyroptose, apoptose, nécrose

La découverte de l'inflammasome a marqué un tournant important dans la compréhension de l'immunité innée, en particulier dans le cadre de certaines pathologies. En particulier, l'inflammasome est responsable du maintien d'une inflammation chronique non-justifiée causée par la phagocytose par les macrophages de composés minéraux non-métabolisables ; notamment, l'intoxication à l'amiante, à l'anthrax, ou les cristaux uriques responsables de la goutte. Ces matériaux allant jusqu'à provoquer la mort cellulaire, et, une fois relargué dans le milieu après celle-ci, pouvant à nouveau déclencher l'inflammation dans d'autres cellules phagocytes.

Il existe ainsi une grande variété d'inflammasomes et de NLRs, qui sont loin d'avoir tous été caractérisés. Chez l'humain, la famille des gènes «NLR» présente 22 membres (34 chez la souris), ce qui potentiellement multiplie les combinaisons possibles au sein des complexes (Figure 24, Tian X. et al, BMC Evol Biol 2009).



AR Lamkanfi M, Dixit VM. 2012.
 Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 28:137–61

Figure 24 – Les inflammasomes

(Légende figure 24) Les inflammasomes sont des complexes multiprotéiques responsables de la reconnaissance de stimuli spécifiques. Chacun est un assemblage précis de différents motifs, correspondant à une spécificité structurelle leur permettant d'être activés en présence d'un DAMP/PAMP bien spécifique. Les principaux inflammasomes, dont NLRP3, sont détaillés ici.

Chaque inflammasome caractérisé reconnaît un set spécifique de PAMPs, et ainsi la présence de pathogènes bien particuliers, et pour certains quelques DAMPs et signaux de stress cellulaire. La reconnaissance de ces signaux est intrinsèquement liée à la structure de chaque complexe. Les stimuli des inflammasomes les mieux étudiés ont été résumés par M. Lamkanfi et al, dans la [figure 24](#). Synthétiquement, NLRP1 (Nlrp1b chez la souris) est activé par la toxine anthracite, NLRC4 par la flagelline bactérienne, AIM2 par l'ADN double brin viral et NLRP6 est un régulateur du microbiote.

Dans le contexte du macrophage et de l'athérosclérose, nous nous sommes intéressés au rôle de l'inflammasome NLRP3, le mieux décrit d'entre eux.

2. NLRP3, les cristaux et le stress lysosomal

Ainsi, NLRP3 reconnaît une batterie de signaux assez large. Notamment des PAMPs ; il a en effet été démontré qu'il est impliqué dans la réponse inflammatoire aux staphylocoques dorés (*S. Aureus* ; McGilligan VE. et al, PLoS ONE 2013), aux chlamydias (*Chlamydia pneumoniae*, He X. et al, J Immunol 2010) et à bien d'autres pathogènes. La diversité de ces pathogènes est si importante qu'elle suggère que l'inflammasome NLRP3 serait à même de détecter des molécules sécrétées par certaines familles de pathogènes ou même des DAMPs associés à des dommages cellulaires ou tissulaires provoqués par l'infection, que de détecter chaque pathogène indépendamment (Lamkanfi M. et al, Immunol Rev 2009).

Des individus porteurs de mutations du gène *NLRP3* présentent un ensemble de symptômes auto-inflammatoires appelés syndrome périodique associé à la cryopyrine

(CAPS Cryopyrin-associated Periodic Syndrome), causée par une production trop importante d'IL-1 β systémique. Ces symptômes comprennent fièvres, douleurs articulaires, maux de tête, et conjonctivite (Neven B. et al, Blood 2004).

Plusieurs stimuli activent NLRP3, comme l'ATP extracellulaire, la baisse de potassium cellulaire, sortant via le canal P2X₇ (Franchi L. et al, J Biol Chem 2007), les fibrilles d'amyloïde β (Halle A. et al, Nat Immunol 2008). De manière intéressante, il a été démontré que l'inflammasome NLRP3 est capable de détecter la souffrance lysosomale. En particulier, lorsque la membrane d'un phagolysosome est rompue, le relargage dans le cytoplasme des cathepsines est capable d'activer l'inflammasome. En particulier, la phagocytose de molécules « cristallines », comme la silice ou l'alum, va déstabiliser et rompre cette membrane. Les cathepsines B, et L dans une moindre mesure, présentes dans le cytosol seront alors responsables de l'activation de NLRP3 (Hornung V. et al, Nat Immunol 2008). Ce mécanisme intervient notamment dans une pathologie connue, la goutte, qui provoque la cristallisation d'acide urique en excès au niveau des articulations : l'activation de l'inflammasome NLRP3 sera responsable de l'inflammation chronique - délétère - se développant suite à l'ingestion de ces cristaux par les macrophages et à la sécrétion de cytokines IL-1 sous-jacente (Kingsbury SR. Et al, J Inflamm Res 2011).

Cependant, au vu de son nombre important et varié de stimuli, et des conséquences néfastes d'une stimulation mal-adaptée, l'activation de l'inflammasome NLRP3 nécessite une étape supplémentaire, un deuxième « verrou » rendant plus difficile la sécrétion d'une cytokine aussi inflammatoire qu'IL-1 β . Contrairement aux autres inflammasomes, aux stimuli beaucoup plus spécifiques, NLRP3 et ses partenaires sont exprimés très faiblement dans les macrophages et cellules dendritiques « naïfs ». Une activation de l'inflammation classique, notamment de NF- κ B, est un deuxième pré-requis à la sécrétion d'IL-1 β . Cette étape est appelé le priming transcriptionnel : elle est nécessaire pour que soient présents dans le cytoplasme l'inflammasome NLRP3 lui-même, capable de détecter les DAMPs, et le précurseur de l'IL-1 β , sans qui la caspase-1, même active, n'a pas de substrat (Bauernfiend FG., J Immunol 2009).

3. NLRP3 et l'athérosclérose

Au cours du développement de l'athérosclérose, après une hypercholestérolémie prolongée et ce dès les phases précoces du développement de la plaque, le cholestérol en excès présent dans celle-ci va lui aussi cristalliser. Chez la souris apoE^{-/-}, la présence de cristaux dans les plaques est détectée après deux semaines de régime riche en cholestérol et augmente graduellement ensuite. Des cristaux sont également détectés dans des plaques d'athérosclérose humaines, et colocalisent avec les régions riches en cellules immunitaires (Duewell P. et al, Nature 2010). Dans des lésions athérosclérotiques de cochons diabétiques, il a ainsi été reporté que les marqueurs de l'activation de l'inflammasome, *NLRP3*, *ASC*, *Caspase-1*, *IL-1 β* et *NF- κ B*, sont augmentés de manière importante (Li Y. et al, PLoS ONE 2013).

Dans le contexte décrit précédemment, les macrophages humains vont phagocyter le cholestérol cristallisé ce qui va activer NLRP3. Dans le cadre de l'athérosclérose, on est en présence d'un autre stimulus inflammatoire, les LDLox, qui activera NF- κ B et ainsi le priming de l'inflammasome. In vitro le traitement des macrophages par des cristaux de cholestérol et de LPS va déclencher la sécrétion des cytokines IL-1 β et IL-18. Cette sécrétion est notamment dépendante de l'activité caspase-1, du trafic vésiculaire et de l'activité cathépsine B (Rajamäki K. et al, PLoS ONE 2010). Ce mécanisme est potentiellement un pont manquant entre les dyslipidémies et le déclenchement de l'inflammation chronique intervenant dans l'athérosclérose. (Figure 25)

Egalement, il a récemment été démontré que deux autres stimuli en présence au cours de l'athérosclérose peuvent activer la plateforme NLRP3 :

- Le stress oxydatif, provenant de la génération mitochondriale de ROS, est lié à l'activation de NLRP3 via le canal calcique TRPM2 (Zhong Z., Nature Comm 2013) ; un dysfonctionnement mitochondrial pouvant de plus activer l'inflammasome dans le macrophage humain (Jabaut J et al, Free Rad Bio Med 2013). Une étude suggère même que l'activation de NLRP3 pourrait se faire directement par une induction du stress oxydatif cellulaire par l'internalisation des LDLox par des macrophages humains (Jiang Y. et al, Biochem Biophys Res Comm 2012)
- le stress de RE peut également promouvoir l'activation de l'inflammasome NLRP3, d'une manière indépendante de l'UPR, puisqu'en l'absence des trois effecteurs PERK,

IRE1 α or ATF6. Le mécanisme précis reste cependant à élucider, et il n'y pas de preuve de l'activation directe par le stress RE (Menu P. et al, Cell Death Dis 2012). Ce mécanisme aurait pourtant un rôle dans les cellules endothéliales, exprimant également NLRP3 sous stimulation inflammatoire, dans la phase d'initiation de l'athérosclérose.

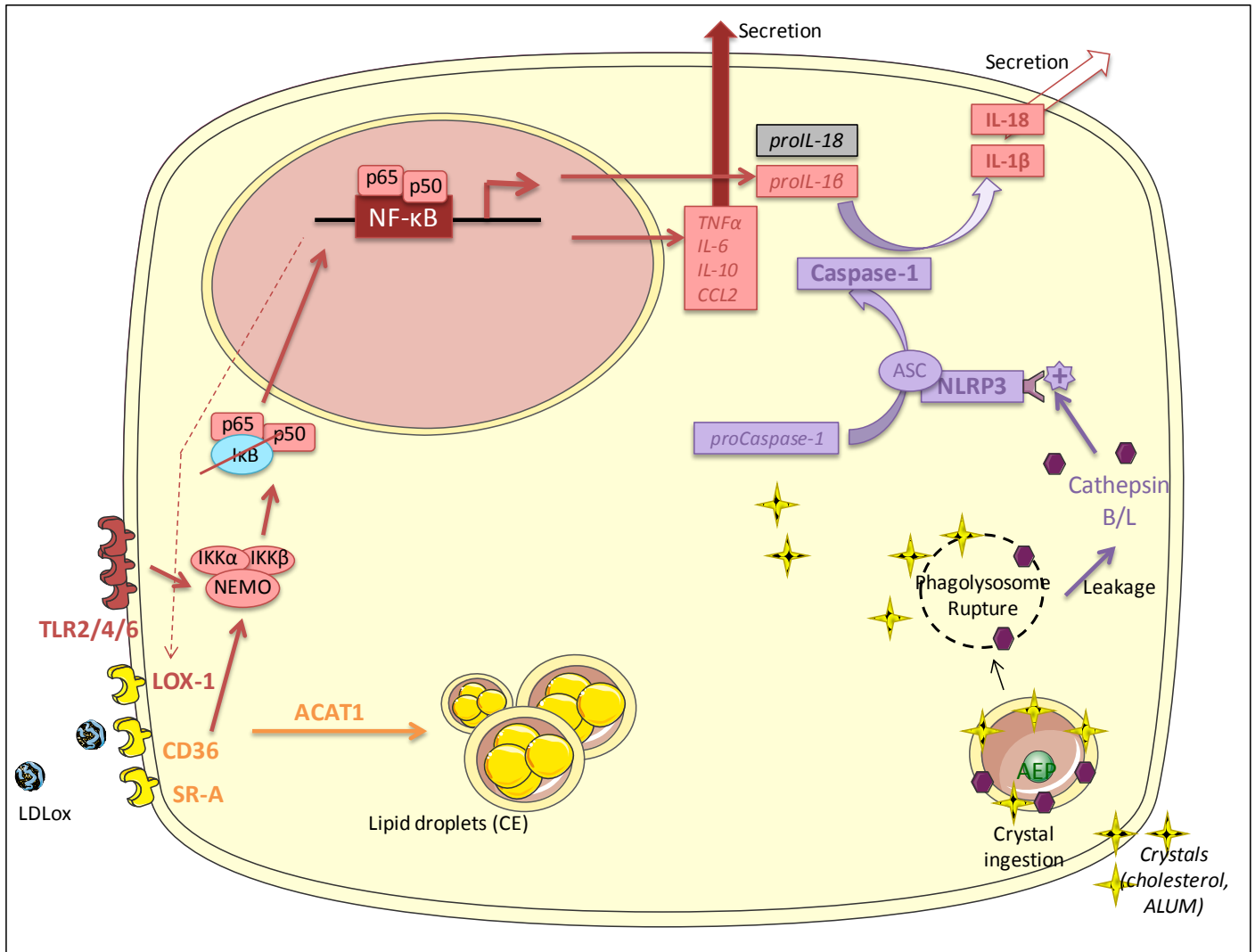


Figure 25 – L'inflammasome NLRP3 au cours de l'athérosclérose

L'activation TLR, médiée par la reconnaissance des LDLox par les Scavengers, active NF-κB et le « priming » de l'inflammasome NLRP3 dans le macrophage humain. L'ingestion de cholestérol cristallisé, présent dans la plaque d'athérome, provoquera le relargage dans le cytoplasme des cathepsines B et L. Ces dernières activeront NLRP3, et incidemment caspase-1, qui clivera le précurseurs des cytokines IL-1β et IL-18 en leurs formes actives sécrétées.

Des études ont donc quantifié le réel impact de la voie de l'inflammasome NLRP3 du macrophage dans le développement de la maladie. Ainsi, des souris *LDLr^{-/-}* ont été transplantées avec de la moëlle osseuse déficiente pour NLRP3 et plusieurs autres acteurs de sa cascade. On observe une chute significative de la taille des lésions développées après un régime riche en cholestérol chez les souris invalidées spécifiquement pour NLRP3, mais aussi pour IL-1 et ASC. La concentration d'IL-18 circulante générale baisse également, démontrant un effet inflammasome-dépendant. Cette étude démontre clairement l'importance de l'inflammasome NLRP3 et plus largement de l'inflammation chronique IL-1 dépendante dans le développement des lésions d'athérome (Duewell P. et al, Nature 2010).

Ces résultats sont néanmoins toujours discutés, ayant été remis en question par deux études analogues effectuées dans les modèles de souris *apoE^{-/-}* :

- dans la première, le développement de lésions n'est pas impacté par la déficience en *Nlrp3* (Menu P. et al, Cell Death Dis 2011).
- dans la seconde, plus récente, les souris traitées par un lentivirus inhibant l'expression de *Nlrp3* développent bien moins de lésions, et des lésions plus stables et riches en collagène, signe d'une inflammation plus résolue (Zheng F. et al, Mediators Inflamm 2014).

Les raisons de cette différence sont peu claires ; cependant les deux modèles sont sensiblement différents, puisque le premier est totalement déficient en NLRP3, et que le deuxième est inactivé pour ce dernier par RNA interférence au bout de 4 semaines de régime athérogénique. Même si on se serait attendu au résultat contraire, on peut penser que c'est l'inhibition de l'inflammation au cours de l'athérosclérose qui fait régresser la maladie. Dans la première étude, une voie alternative de l'inflammation se substituant à NLRP3 peut avoir été activée pour compenser sa perte totale de fonction. C'est cependant la première étude de Duewell et al qui nous intéresse, puisque *Nlrp3* a été inactivé spécifiquement dans les lignées myéloïdes et dans des souris *LDLr^{-/-}*.

Egalement, une déficience en caspase-1 chez des souris *apoE^{-/-}* les protège du développement de lésions d'athérome, par le biais d'une réaction de l'inflammation (Gage J. et al, Can J Cardiol 2012), appuyant le rôle de l'inflammasome.

4. Les cytokines IL-1 β et IL-18

L'impact de ces deux cytokines, les deux cibles des inflammasomes, dans le développement de l'athérosclérose est par ailleurs bien connu

a) Les interleukines 1 α et 1 β (IL-1 α/β)

Les IL-1 sont des cytokines très pro-inflammatoires et des médiateurs importants de la réponse inflammatoire aigue. Elles sont produites entre autres par les macrophages. Elles vont se lier à leur récepteur, l'IL-1R, présent à la surface des cellules immunitaires et notamment des macrophages qui la sécrètent, pour activer l'inflammation via un mécanisme dépendant de MyD88 et NF- κ B. L'IL-1 β a également un rôle clé dans le recrutement de neutrophiles – la mesure de ce dernier au niveau du péritoine chez la souris a d'ailleurs été un outil que nous avons utilisé pour quantifier l'activation IL-1 in vivo, de manière cohérente avec d'autres études (Soehnlein O., *Circ Res* 2012 ; Duewell P. et al, *Nature* 2010).

Chez la souris, la déficience en IL-1R ou le traitement par l'IL-1Ra réduit significativement le développement de l'athérosclérose (Qamar A. et al, *Curr Opin Lipidol* 2012). Des souris apoE^{-/-} transplantées avec de la moelle osseuse IL-1R^{-/-} ne montrent pas de diminution claire de formation de lésions d'athérome (Shemesha S. et al, *Atherosclerosis* 2012) : l'auto-stimulation des macrophages par leur propre sécrétion d'IL-1 α/β est donc moins importante pour le développement de l'athérosclérose que l'impact que peut avoir cette dernière sur son environnement.

En effet, dans l'étude du laboratoire d'Eicke Latz déjà citée, une réduction drastique du développement de l'athérosclérose dans des souris LDLr^{-/-} invalidées spécifiquement dans les lignées myéloïdes pour IL-1 α et IL-1 β est observée. Des résultats similaires ont été observés dans les souris apoE^{-/-} invalidées totalement pour ces cytokines (Kamari Y. et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun* 2011 ; Kirii, H. et al., *ATVB* 2003).

Si IL-1 α semble être également un puissant inducteur de l'athérosclérose, seul IL-1 β présente une régulation NLRP3 dépendante ; la maturation et sécrétion de la première par des macrophages inflammatoires semblant être liées aux acides gras insaturés, notamment à

l'acide oléique, au stress oxydant mitochondrial et à l'activation d'une calpaïne calcium-dépendante (Freigang S ; et al, Nat Immunol 2013).

Ainsi, le canakinumab, un anticorps monoclonal dirigé contre IL-1 β , est déjà utilisé dans le traitement de maladies auto-inflammatoires faisant intervenir NLRP3, notamment la goutte ou les syndrômes périodiques associés à la cryopyrine (autre nom de NLRP3). Nous sommes actuellement à un moment critique puisqu'une grande étude clinique, CANTOS, essaye actuellement de démontrer l'efficacité de cette inhibition dans le cadre du développement de l'athérosclérose et de la prévention des MCV. Si les résultats sont positifs, non seulement cela validerait l'hypothèse du rôle délétère de l'IL-1 β chez l'humain, mais encore plus largement cela démontrerait l'efficacité d'une thérapie anti-inflammatoire dans le contexte de la régression de l'athérosclérose, portant le volet inflammatoire de la maladie au même niveau d'importance que son volet lipidique (Ridker PM et al, Am Heart J 2011).

b) L'interleukine 18 (IL-18)

IL-18 est l'autre cytokine pro-inflammatoire dont la sécrétion est NLRP3-dépendante. Sa liaison avec son récepteur IL-18R, présent à la surface des macrophages, va également promouvoir la transduction d'un signal inflammatoire via MyD88 et NF- κ B. Elle a également un inhibiteur endogène, IL-18BP (IL-18 Binding Protein), présent en bien plus forte quantité que la cytokine dans le sérum de donneurs sains.

Une concentration plus élevée d'IL-18 est observée dans le sérum de patients présentant des MCV (Seta Y. Et al, Heart 2000), et la cytokine elle-même ainsi qu'une expression augmentée de son récepteur ont été détectées dans les macrophages et les cellules endothéliales de plaques d'athérome humaines. L'expression d'IL-18 est même associée aux plaques présentant un phénotype instable (Mallat Z. et al, Circulation 2001).

Chez la souris apoE^{-/-}, l'administration d'IL-18 augmente la taille des lésions et la surexpression d'IL-18BP ainsi que la déficience en IL-18 la réduit et stabilise les plaques (Whitman SC. Et al, Circ Res 2002 ; Mallat Z. et al, Circ Res 2001 ; Elhage R. Et al, Cardiovasc res 2003). D'autres données suggèrent que le rôle pro-athérogène d'IL-18 dépendrait de la

stimulation de la sécrétion d'IFN γ , par l'intermédiaire des lymphocytes T ou des cellules NK (Tenger C. et al, ATVB 2005).

Cependant, l'inhibition thérapeutique d'IL-18 semble moins évidente. Les souris déficientes ou surexprimant IL-18BP présentent en effet un syndrome métabolique, puisqu'elles développent une obésité associée à une insulino-résistance (Netea MG. Et al, Nat Med 2006). Chez l'humain, l'obésité et le diabète de type II sont pourtant associés à des taux circulants élevés d'IL-18 (Troseid M. et al, Cardiovasc Diabetol 2010). Ainsi, IL-18, cytokine clairement pro-athérogène, a été proposée comme un marqueur du risque cardiovasculaire que comme une cible thérapeutique pour le moment, même si ce rôle est contesté (Blankenberg S. et al, Circulation 2002 ; Chapman CM. Et al, Atherosclerosis 2006).

Ainsi, dans l'optique de réduire le développement de l'athérosclérose, l'inhibition ou au moins la diminution de l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages semble être une bien meilleure stratégie que de cibler le facteur NF- κ B. En effet, la sécrétion de deux cytokines, IL-1 β et IL-18, clairement définies comme pro-athérogènes et responsables d'une inflammation chronique non-résolue est ciblée. De plus, NLRP3 ne présente pas le rôle anti-apoptotique de NF- κ B, ce qui ne lui confère aucun rôle protecteur dans les lésions avancées. Sans pour autant lui en faire acquérir un dans les lésions précoces, puisqu'il active la pyroptose et non l'apoptose, forme de mort cellulaire inflammatoire programmée proche de la nécrose, aboutissant au relargage des cristaux de cholestérol et autres DAMPs dans le corps nécrotique de la plaque.

C. AEP et les Cathepsines

1. Les cathepsines, diversité

a) Définition

Les cathepsines sont une famille de protéases lysosomales, tout d'abord identifiées dans les sucs gastriques. Dix-neuf membres ont été identifiés chez la souris, répartis en 3 familles :

- les cathepsines à sérine (cathepsines A et G)
- les cathepsines à asparagine (cathepsines D et E)
- les cathepsines à cystéines (les plus nombreuses)

Vues comme agissant uniquement dans l'environnement acide du lysosome, les cathepsines peuvent aussi être actives dans des environnements neutres comme le cytoplasme. Elles s'expriment de manière tissu-spécifique et sont impliquées chacune dans la dégradation de protéines spécifiques correspondant à des fonctions particulières. Notamment, elles sont impliquées dans l'apoptose et la présentation d'antigène, deux fonctions du macrophage (Hua Y. et al, *Biochim Biophys Acta* 2014).

En particulier, deux cathepsines, S et K, ont des propriétés athérogènes : leur inactivation spécifique chez des souris $LDLr^{-/-}$ ou $apoE^{-/-}$ diminue le développement de lésions (Sukhova GK. et al, *J Clin Invest* 2003 ; Lutgens E. Et al, *Circulation* 2006). Ces propriétés sont dues aux rôles de ces enzymes, sécrétés, dans la dégradation de la matrice extracellulaire, jouant ainsi un rôle analogue à celui des MMPs dans la déstabilisation de la lésion. Ces deux cathepsines sont par ailleurs actives à pH neutres, dans des conditions physiologiques.

Les cathepsines ont également des inhibiteurs endogènes, appelés les cystatines, une autre famille de protéines, qui se lient aux cathepsines pour les inactiver (Bode W. et al, *Biol Chem* 1990). En particulier, il a été reporté que la cystatine C a des propriétés athéroprotectrices chez la souris $apoE^{-/-}$ (Bengtsson E. et al, *ATVB* 2005).

Enfin, les cathepsines sont synthétisées sous la forme d'un précurseur inactif, qui permet leur adressage au RE puis au lysosome, où sa partie N-terminale est clivée, notamment par l'enzyme lysosomal AEP (voir partie C2. ; Kominami E. et al, FEBS Lett 1988).

b) La cathepsine D et l'efflux de cholestérol

De manière surprenante, il a été démontré que la cathepsine D a un rôle dans l'homéostasie du cholestérol au sein du macrophage et plus précisément dans l'efflux de cholestérol cellulaire vers les ApoA-I et HDL. Son inactivation spécifique dans les macrophages provoque une rétention du cholestérol dans les endosomes et les lysosomes. De même, le transporteur ABCA1 est lui-même retenu à la membrane des lysosomes, et son expression génique est diminuée. Cette déficience en cathepsine D semble causer un dysfonctionnement lysosomal plus général qui diminue le trafic du cholestérol et son acheminement à la membrane plasmique où il est accessible pour l'efflux et ABCA1 (Haidar B. et al, J Biol Chem 2006).

c) Les cathepsines B et L et l'inflammasome

Les cathepsines B et L, normalement lysosomales, sont détectées par NLRP3 lorsqu'elles sont relarguées dans le cytoplasme. C'est un moyen pour le complexe d'activer une inflammation en réponse à une dysfonction lysosomale grave, faisant souvent suite à l'ingestion de substances cristallines par les phagocytes allant, par l'imposition de contraintes mécaniques à la membrane des organelles, jusqu'à la rupture de ceux-ci et au relargage de tout leur contenu – souvent acide et cytotoxique – dans le cytoplasme (Rajamäki K. et al, PLoS ONE 2010). Les souris CathepsinB^{-/-} ou CathepsinL^{-/-} injectées intrapéritonéalement avec des cristaux de cholestérol recrutent significativement moins de neutrophiles, et auraient donc une activation de l'inflammasome NLRP3 diminuée (Dewell P. et al, Nature 2010).

Cathepsin/Cystatine	Expr.	Athérosclérose chez la souris	MECs	Mécanisme
catB	Macrophages humains/murins		Elastolyse	Relarguée dans le cytoplasme après rupture du phagolysosome (cristaux), active NLRP3 Sécrétée dans la plaque
catD	Macrophages humains/murins			Permet le transport lysosomal du cholestérol et d'ABCA1 à la membrane
catF	Macrophages humains/murins, CMLs, ECs			Dégrade l'apoB100, l'ApoA-I et les préβ, réduisant ainsi l'efflux de cholestérol
catK	Macrophages humains/murins, CMLs, ECs	apoE ^{-/-} : catK ^{-/-} ↓ formation des plaques, ↑ stabilité	Collagenolyse et elastolyse	Dégrade l'apoB100, l'ApoA-I et les préβ, réduisant ainsi l'efflux de cholestérol
catL	Macrophages humains/murins, CMLs, ECs		Collagenolyse et elastolyse	Relarguée dans le cytoplasme après rupture du phagolysosome (cristaux), active NLRP3 Sécrétée dans la plaque
catS	Macrophages humains/murins, CMLs, ECs	apoE ^{-/-} : catK ^{-/-} ↓ formation des plaques, ↑ stabilité	Collagenolyse et elastolyse	Dégrade l'apoB100, l'ApoA-I et les préβ, réduisant ainsi l'efflux de cholestérol
catV			Elastolysis	
cysC		apoE ^{-/-} : cysC ^{-/-} ↑ formation des plaques	Inhibe l'elastolyse	–

Tableau 5 – Les cathepsines dans l'athérosclérose

(Lutgens SP. Et al, FASEB Rev 2007)

L'impact réel des cathepsines B et L sur le développement de l'athérosclérose est cependant toujours inconnu. En plus de leur rôle dans l'activation de l'inflammasome, elles jouent également un rôle pro-apoptotique lorsque cytoplasmiques par leur rôle de clivage (*Li W. et al, Ann. N. Y. Acad. Sci. 2004 ; Li, W. et al, ATVB 2001 ; Liu, N. et al EMBO J. 2003*). De plus, lorsque sécrétés dans le milieu, les cathepsines B et L ont un rôle de dégradation de la matrice extracellulaire, en particulier elastolytique (*Reddy VY. Et al, Proc Natl Acad Sci U S A 1995*).

Enfin, les plaques d'athérosclérose humaines présentent une quantité augmentée de cathepsine L active (*Mattock KL. Et al, Atherosclerosis 2010*). La présence de cathepsine B active a également été reportée dans les plaques d'athérosclérose des souris apoE^{-/-}, plus précisément au niveau des macrophages et semble également impliquée dans le développement de lésion (*Shon SM et al, ATVB 2013*) ; reste à voir si la déficience de l'une ou

l'autre des cathepsines aurait un impact suffisant sur la formation de la plaque ou sa stabilité in vivo.

Une liste non exhaustive des cathepsines détectées dans la plaque et de leurs rôle dans l'athérosclérose a été établie [tableau 5](#).

2. AEP et la maturation des cathepsines

L'asparagine endopeptidase AEP ou Légumain Lgmn est une protéase à cystéine endosomale et lysosomale, identifiée en premier lieu chez les plantes (Hara-Nishimura I. et al, Plant Cell 1993). Assemblée premièrement sous forme de zymogène, elle s'auto-mature en sa forme active dans des conditions acides. Ses rôles sont assez larges ; en particulier elle a initialement été impliquée dans le clivage d'antigènes spécifiques liés notamment au complexe d'histocompatibilité majeur de type II (MHCII) dans les cellules présentatrices d'antigène, en particulier les macrophages (Manoury B. et al, Nat Immunol 2002). Cependant cette activité ne semble pas limitante puisque les souris AEP^{-/-} ne présentent aucun défaut de l'activation de lymphocytes T par les cellules présentatrices d'antigènes (Maehr R. J Immunol 2005).

L'inactivation d'AEP semble avoir des impacts beaucoup plus larges : notamment, elle provoque des problèmes d'homéostasie rénale chez la souris et en particulier du catabolisme protéique : des protéines de faible poids moléculaires sont retrouvées dans les lysosomes des cellules rénales (Miller G. et al, FASEB J 2011). D'un autre côté, l'augmentation de l'activité de l'AEP a été corrélée avec de nombreuses pathologies, notamment le cancer (Liu C. et al, Cancer Research 2003), la maladie d'Alzheimer (Basurto-Islas G. et al, J Biol Chem 2013) ou encore l'athérosclérose (Mattock KL. Et al, Atherosclerosis 2010).

Ainsi, dans le contexte de cette dernière, nous avons émis l'hypothèse de l'implication d'AEP dans le déclenchement et le maintien de l'inflammation chronique dans la plaque par son rôle dans la maturation des cathepsines. En effet, il a été démontré que c'est l'AEP qui effectue le clivage activateur des cathepsines B, L et H au sein du lysosome (Shirahama-Noda K., J Biol Chem 2003). Dans la troisième étude présentée, j'ai démontré le rôle important de ce mécanisme de maturation dans l'activation de l'inflammasome NLRP3

par le déséquilibre lysosomal induit par la phagocytose de substances cristallines par le macrophage humain ; ce mécanisme conférant des propriétés anti-inflammatoires et athéroprotectrices à l'invalidation d'AEP in vivo chez la souris LDLr^{-/-}.



Présentation des travaux de Recherche



Etude 1 : Stimulation of Cholesterol Efflux from Human Macrophages by Liver X Receptors agonists is a two-step mechanism dependent of LXR α and controlled by ABCA1 and ARL7

La stimulation de l'efflux de cholestérol cellulaire vers ApoA-I et HDL (lipoprotéines athéroprotectrices) des macrophages de la plaque est considérée comme le principal mécanisme responsable des **propriétés athéroprotectrice de l'activation LXR**. Or:

- Le **parallèle entre l'humain et la souris** est difficile concernant l'homéostasie du cholestérol ; notamment ABCG1 n'est pas un acteur de l'efflux vers les HDL dans le macrophage humain
 - **LXR α et LXR β** n'ont pas des fonctions redondantes, leur contribution spécifique est inconnue chez l'Homme
- Les agonistes LXR sont en développement clinique pour traiter les patients à risque. Cependant, l'activation du LXR α hépatique est délétère (lipogénèse). L'activation de LXR β peut-elle stimuler l'efflux? A travers quels mécanismes?

Quel mécanisme cellulaire contrôle l'induction de l'efflux de cholestérol cellulaire par les agonistes LXR dans le macrophage humain?

Stratégie : - modèles de **macrophages humains** THP-1 (lignées) ou primaires

- invalidation par **RNA-interférence** de LXR α et LXR β ; et des transporteurs ABCA1, ABCG1, SR-B1/CLA-1 et ARL7
- mesure de l'efflux de cholestérol cellulaire vers des accepteurs, de l'expression ARNm par RT-QPCR, de l'expression protéique par Western Blot, des radeaux lipidiques.

I – LXR α est 20 fois plus exprimé que LXR β par le macrophages humain. L'invalidation du premier dans les macrophages diminue significativement l'efflux de cholestérol cellulaire vers ApoA-I et les HDL ; l'invalidation de LXR β n'a elle aucun effet.

La stimulation de l'efflux de cholestérol vers ApoA-I et HDL par les agonistes LXR est LXR α -dépendante.

La fonction des gènes dont l'expression est LXR α -dépendante a été étudiée

II – La stimulation de l'expression du transporteur ARL7 par les agonistes est absente dans les macrophages LXR α KD. Dans les macrophages invalidés pour ARL7, l'activation LXR n'augmente plus la présence de cholestérol libre disponible à la membrane, la quantité de radeaux lipidiques, ni l'efflux vers du plasma.

La stimulation de l'expression du transporteur ARL7 par l'activation de LXR α permet l'augmentation du transport du cholestérol libre des endosomes aux radeaux lipidiques, domaines accessibles pour l'efflux.

III – Les stimulations des expressions des transporteurs ABCA1, ABCG1 et du récepteur SR-B1/CLA-1 sont LXR α -dépendantes. Seule l'invalidation de ABCA1 diminue l'efflux de cholestérol cellulaire vers les HDL. ABCG1 et SR-B1/CLA-1 n'ont aucun impact sur ce mécanisme en présence ou non de ABCA1. La stimulation résiduelle de l'efflux dans les cellules ABCA1 KD est abolie par l'invalidation de LXR α et d'ARL7.

L'export de cholestérol LXR α -dépendant vers l'ApoA-I mais aussi les HDL se fait via ABCA1 dans le macrophage humain.

L'induction LXR α -dépendante de l'expression des gènes d'ARL7 et d'ABCA1 est responsable de la stimulation de l'efflux de cholestérol cellulaire du macrophage humain

ARL7 transporte le cholestérol libre des endo/lysosomes aux radeaux lipidiques de la membrane plasmique
ABCA1 exporte le cholestérol de ces radeaux vers les ApoA-I libres mais aussi sur les HDL

- Confirmation du caractère espèce-dépendant de la régulation de l'efflux de cholestérol
- Les radeaux lipidiques, initiateurs de l'efflux de cholestérol via ABCA1
- L'activation de LXR α stimule l'efflux des macrophages mais est délétère dans le foie
- LXR β est en quantité insuffisante dans le macrophage pour avoir un effet?
- Inefficacité de la stimulation d'efflux de cholestérol des macrophages de plaques avancées car les ApoA-I et HDL sont dysfonctionnelles
- Activité LXR athéroprotectrice par la répression de l'inflammation : efficacité de LXR β ?

**STIMULATION OF CHOLESTEROL EFFLUX FROM HUMAN MACROPHAGES BY LIVER X
RECEPTOR AGONISTS IS A TWO-STEP MECHANISM DEPENDENT OF LXR α AND
CONTROLLED BY ABCA1 AND ARL7**

Alexandre Superville^{1,2,3}, Eric Frisdal^{1,2,3}, Lucie Poupel^{1,2,3}, Mi-Jurng Kim⁴, Carmel M. Quinn⁴, Philippe
Lesnik^{1,2,3}, Wendy Jessup⁵, Maryse Guerin^{1,2,3} and Wilfried Le Goff^{1,2,3}

1- INSERM, UMR_1166, Research Institute of Cardiovascular Disease, Metabolism and Nutrition, F-75013 Paris, France;

2- Université Pierre et Marie Curie-Paris6, F-75005 Paris, France;

3- Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Pitié-Salpêtrière hospital, F-75013 Paris, France;

4- Centre for Vascular Research, School of Medical Sciences, University of New South Wales, Sydney, Australia,

5 –ANZAC research Institute, Concord, Australia

Running Title: Key role of ABCA1 in LXR-stimulated human macrophages

Key Words : LXR, human macrophage, cholesterol efflux, ABCA1, ARL7

Subjects codes : [133] Atherosclerosis, [143] Gene regulation, [137] Cell biology/structural biology

Word count : 6099

Total number of figures and tables : 5

*Address correspondence to:

Wilfried Le Goff, Ph.D.

INSERM UMR1166, Team 4 : Integrative Biology of Atherosclerosis

Hôpital de la Pitié

Pavillon Benjamin Delessert

83, boulevard de l'Hôpital

75651 Paris Cedex 13

France

Tel: +33 1 42 17 79 75

Fax: +33 1 84 82 72 68

email: wilfried.le_goff@upmc.fr

Abstract

Objective. Stimulation of free cholesterol efflux from macrophages by LXR agonists is considered to be the major mechanism by which LXR agonists protect from atherosclerosis development in mice. The objective of this study was to decipher precise cellular mechanisms controlling free cholesterol efflux from human macrophages upon LXR stimulation.

Approach and Results. Specific LXR α silencing significantly reduced free cholesterol from human macrophages upon stimulation with GW3965, whereas LXR β silencing has no impact. Treatment with GW3965 efficiently induced ARL7 expression and increased amount of free cholesterol available for efflux at the plasma membrane. Both effects were abolished in ARL7 Knockdown (KD) human macrophages, leading to a lack of stimulation of free cholesterol efflux by GW3965. Moreover, expression of cholesterol transporters, ABCA1 and ABCG1, as well as that of the SR-BI/CLA-1 receptor was diminished in LXR α KD human macrophages stimulated by LXR agonists but not in LXR β KD cells. Interestingly, stimulation of cholesterol efflux to HDL by GW3965 was significantly reduced in ABCA1 KD THP-1 macrophages. However, silencing of either ABCG1 or SR-BI/Cla-1 had no impact on cholesterol efflux to HDL from either control or ABCA1 KD THP-1 macrophages treated or not with LXR agonists whereas this latter was completely abolished in LXR α /ABCA1 double KD macrophages.

Conclusions. We propose that LXR-mediated stimulation of free cholesterol efflux from human macrophages is a two-step mechanism through which LXR α activation initially promotes ARL7-dependent free cholesterol transport to plasma membrane from where it is then subsequently exported to ApoA-I and HDL acceptors through the action of ABCA1.

Introduction

When in excess, plasma cholesterol associated with low density lipoproteins (LDL-C) infiltrates into the arterial wall and triggers the initial step of atherosclerosis development. Thus, plasma LDL-C levels are strongly correlated with cardiovascular diseases, a major cause of mortality worldwide. Indeed, modifications of LDL within the intima, mainly through oxidation processes, lead to their recognition and internalization by arterial macrophages, forming the so-called “foam cells”, cholesterol-loaded macrophages, which are a hallmark of early atherosclerotic lesions¹. The capacity of intimal macrophage foam cells to eliminate excess of cholesterol through free cholesterol efflux to extracellular acceptors, such as high density lipoproteins (HDL) or lipid-poor apolipoprotein A-I (ApoA-I), is a key mechanism leading to reduction of lipid burden within the arterial wall². Moreover, circulating levels of plasma HDL-C are inversely correlated to cardiovascular diseases³. Also, recent studies reported that macrophages cholesterol efflux capacity was inversely associated with carotid intima-media thickness and angiographic coronary artery disease⁴ as well as prevalence of coronary artery disease⁵.

Liver X Receptor (LXR) α and LXR β (*NR1H3* and *NR1H2*) are cholesterol sensing nuclear receptors and key regulators of cholesterol homeostasis and transport⁶. Their activation by endogenous oxysterol ligands stimulates expression of genes involved in transport of cholesterol from peripheral tissues to the liver, and especially in cholesterol efflux, the first step of the reverse cholesterol transport⁷. Thereby, pharmacological stimulation of LXR by synthetic agonists protects against plaque development and promotes regression of established lesions in mice⁸. Such effects result from the specific activation of LXR in macrophages, as deletion of *Lxr*(α/β) specifically in macrophages is sufficient to abolish the antiatherogenic properties of LXR agonists⁹.

Although selective macrophage LXR activation is sufficient to prevent atherosclerosis development in mice, the role of each LXR isoform, i.e. LXR α and LXR β , in macrophage cholesterol efflux and atherogenesis is still controversial, and in particular the capacity of LXR β to prevent cardiovascular harm¹⁰. For example, Bradley et al. reported that treatment of *Lxr α ^{-/-}apoE^{-/-}* mice with synthetic LXR ligand reduces atherosclerosis, indicating that LXR β activation is able to counterbalance the absence of LXR α . By contrast, the use of single knockout for *Lxr α* or *Lxr β* in the *Ldlr^{-/-}* background suggests that LXR α is required for the anti-atherogenic properties of LXRs agonists; this effect being related to the higher ability of LXR α activation to stimulate *Abca1* and *Abcg1* expression and free cholesterol efflux from macrophages and therefore to induce reverse cholesterol transport¹¹. Indeed, in mouse macrophages, free cholesterol efflux is mainly mediated by both *Abca1* and *Abcg1* transporters, promoting respectively cholesterol efflux to ApoA-I and HDL while the contribution of SR-BI receptor appears to be more controversial¹².

However, comparison between mice and human is difficult concerning macrophage cholesterol efflux mechanisms as molecular pathways controlling cholesterol homeostasis in human macrophage differ in some respects from those observed in mouse macrophage^{13, 14}. If free cholesterol efflux from human macrophages is also efficiently stimulated by LXR agonists, the molecular mechanisms controlling cholesterol efflux as well as the specific contribution of LXR α and LXR β upon activation are to date partially understood. A recent study proposed that induction of cholesterol efflux from human primary macrophages by LXR agonists is dependent of LXR α without requiring the participation of LXR β ¹⁵. However, LXR β was reported to interact directly with ABCA1 and repress cholesterol efflux from human THP-1 macrophages; this inhibitory effect being abolished in the presence of LXR ligands¹⁶.

This point is particularly critical as synthetic LXR agonists are currently in clinical development for a therapeutic use in dyslipidemic patients with elevated CAD risk¹⁷. Moreover, because of the deleterious effect of LXR α activation on hepatic lipogenesis and hypertriglyceridemia¹¹, the specific use of LXR β agonists is proposed as a safe strategy to achieve therapeutic goals, therefore highlighting the need of the complete deciphering of cellular mechanisms controlled by both LXR α and LXR β isoforms. However, because of the poor translation of data obtained from mouse models to human, the use of human macrophages is invaluable in order to study those mechanisms.

Using specific targeting of LXR α and LXR β , together with combined deletion of candidate transporters/receptors involved in trafficking and cholesterol transport in human macrophages, we investigated the specific cellular pathways responsible for induction of efflux of free cholesterol by LXR agonists. We propose a two-step mechanism controlled by LXR α for stimulation of cholesterol efflux from human macrophages by LXR agonists requiring i) the specific activation of ARL-7-dependent free cholesterol transport from intracellular compartments to plasma membrane cholesterol pools accessible for efflux, and ii) the export of free cholesterol from the plasma membrane to ApoA-I and HDL mediated by ABCA1

Results

RNAi-mediated silencing of LXR α decreases free cholesterol efflux from human macrophages while LXR β targeting was ineffective.

As shown on Figure 1A, assessment of the relative expression of LXR α and LXR β in human macrophages indicated that both isoforms were expressed in HMDM, however LXR α mRNA levels were 17-fold higher than those of LXR β mRNA. Moreover, LXR α mRNA levels were significantly increased by a treatment with a LXR agonist (GW3965) (+60%, $p < 0.005$), while those of LXR β were not affected. Similar results were observed in human THP-1 macrophages (Supplemental Figure 1A). Those observations thereby suggest that LXR α isoform rather than LXR β might have a specific role in cholesterol efflux from human macrophages.

To test this latter hypothesis, expression of either LXR α or LXR β was silenced in both HMDM and THP-1 macrophages using specific siRNAs targeting LXR α or LXR β mRNAs (HMDM, Figure 1B-D and THP-1, Supp Fig. 1B-C). As expected, stimulation of HMDM with GW3965 led to a marked induction of free cholesterol efflux to ApoA-I (4.4-fold, $p < 0.05$), to HDL (+44%, $p < 0.0005$) and to normolipidemic plasma (+24%, $p < 0.0005$) (Fig. 1E-F, Supp Fig. 1D-F). Targeting the expression of LXR α (LXR α KD) was accompanied by a significant decrease of the induction of free cholesterol efflux by GW3965 to the different cholesterol acceptors (-41%, $p < 0.05$ to ApoA-I, -24%, $p < 0.05$ to HDL and -20% to plasma, -16%, $p < 0.05$) whereas the silencing of LXR β expression (LXR β KD) was without effect. Thus, free cholesterol efflux to HDL and to plasma in stimulated LXR α KD cells dropped to a comparable level to that observed in unstimulated control cells (Fig. 1F and Supp. Fig. 1E-F) while a robust elevation of free cholesterol efflux to ApoA-I still persisted in LXR α deficient cells upon LXR activation (Fig. 1E and Supp. Fig. 1D). However it was noted that free cholesterol efflux to HDL (Fig. 1F and Supp. Fig. 1E) and to plasma (Supp. Fig. 1F) was diminished in LXR α KD macrophages at the basal level and that addition of GW3965 was still able to induce free cholesterol efflux in those cells, although at a much lesser degree than in control cells. Such residual induction was consistent with the fact that we did not achieve a complete silencing of LXR α isoform expression.

Therefore, it appears that stimulation of free cholesterol efflux from human macrophages by LXR agonists predominantly involves LXR α while the contribution of LXR β is not required. This was confirmed by analysis of multiple experiments which showed that human macrophage LXR α mRNA levels were strongly correlated to free cholesterol efflux to ApoA-I, HDL or to plasma (Table 1); such correlations being not observed with macrophage LXR β mRNA levels.

Specific activation of LXR α promotes ARL7-dependent free cholesterol transport to plasma membrane predominantly into lipid raft domains.

Intracellular transport of cholesterol from the endosomal / lysosomal compartment to the plasma membrane into cholesterol pools mobilized for efflux is a crucial step governing cholesterol export to extracellular acceptors. Stimulation of human macrophages with LXR agonists was reported to increase the amount of free cholesterol at the plasma membrane¹³, suggesting that this step may be a prerequisite for induction of cholesterol efflux by LXR agonists. Because ADP-ribosylation factor (ARF)-like 7 (ARL7) is a target of LXR α ¹⁸ and as its overexpression in HeLa cells was associated with an increased free cholesterol efflux¹⁹, we addressed the hypothesis that induction of ARL7 through a LXR α dependent mechanism could enhance intracellular trafficking of cholesterol to plasma membrane in pools available for efflux and then contribute to stimulation of cholesterol efflux from human macrophages upon LXR agonists. Consistent with earlier observations¹⁸, ARL7 expression was increased in human macrophages treated with GW3965 as compared to control cells (Figure 2A). Moreover, induction of ARL7 expression by GW3965 was abolished in LXR α KD HMDM whereas the knocking down of LXR β was without effect (Figure 2A), supporting the idea that ARL7 might be a LXR α -target involved in the LXR α -dependent stimulation of free cholesterol efflux from human macrophages.

In order to test the role of ARL7 in the transport of free cholesterol to plasma membrane in pools accessible for cholesterol efflux, ARL7 expression was efficiently silenced in human macrophages using specific siRNAs targeting ARL7 (Figure 2B). Free cholesterol efflux to methyl- β -cyclodextrin (m β CD), which is a reliable indicator of plasma free cholesterol amount mobilized for efflux, was significantly increased upon treatment with GW3965 in control HMDM (+58%, $p < 0.05$); this stimulatory effect being totally abolished in ARL7 KD cells (Figure 2C). In addition, because the incorporation of free cholesterol in plasma membrane microdomains, such as lipid rafts which are sensible to m β CD, may be a source of cholesterol for efflux²⁰, we next examined whether the increased amount of free cholesterol at the plasma membrane upon LXR agonists treatment is accompanied by increased lipid raft formation. We observed that lipid raft abundance, assessed by the detection of the pentasaccharide chain of plasma membrane ganglioside G_{M1} which selectively partitions into lipid

rafts, was more elevated (+38%, $p < 0.005$) in control macrophages treated with GW3965 as compared to untreated cells, an effect that was not observed in ARL7 KD macrophages (Figure 2D). Finally, in agreement with those observations, the stimulation of cholesterol efflux to plasma from control HMDM induced by GW3965 (Figure 1E ; +42%, $p < 0.05$) was abolished in ARL7 KD cells.

Altogether, those findings indicate that LXR agonists stimulate free cholesterol transport from intracellular compartments to plasma membrane in pools accessible for efflux, likely in lipid rafts, through the LXR α -dependent induction of ARL7 expression. This mechanism appears to be a limiting step in stimulation of cholesterol efflux from human macrophages by LXR agonists.

Expression of ABCA1, ABCG1 and SR-BI/Cla-1 is under the control of LXR α in stimulated human macrophages.

To further investigate the mechanisms by which LXR α controls stimulation of cholesterol efflux from human macrophages by LXR agonist, we next evaluated the implication of the specific transporter / receptors involved in the LXR α -dependent export of free cholesterol to extracellular acceptors upon LXR treatment. Gene expression analysis in cholesterol-loaded THP-1 macrophages revealed that induction of *ABCA1*, *ABCG1* and *SR-BI/Cla-1* mRNA levels by GW3965 was dependent of LXR α but independent of LXR β , notably regarding *ABCA1* and *ABCG1*, as silencing of LXR α but not LXR β reduced significantly the LXR-mediated elevation of mRNA levels of those genes (Supplemental Figure II). By contrast, a lack of induction of both apoE and NCP1 expression by LXR agonists was similarly observed in either LXR α KD or LXR β KD human macrophages (data not shown). Confirmation of the specific contribution of LXR α for stimulation of *ABCA1*, *ABCG1* and *SR-BI/Cla-1* expression was obtained by Western blot analysis (Figure 3). The marked increase of both *ABCA1* and *ABCG1* protein levels upon LXR stimulation was drastically reduced in LXR α KD HMDM but was not altered in LXR β KD cells (Figure 3). Surprisingly although *SR-BI/Cla-1* protein levels did not appear to be increased by treatment with GW3965, silencing of LXR α but not LXR β led to a robust decrease of the amount of *SR-BI/Cla-1* protein.

The LXR α -dependent activation of *ABCA1* and *ABCG1* expression, and to a lesser degree that of *SR-BI/Cla-1*, led us to suggest that those transporters / receptor could be implicated in the stimulation of free cholesterol efflux from human macrophages by LXR agonists which was presently demonstrated to be dependent of LXR α .

Stimulation of free cholesterol export from human macrophages requires solely ABCA1 in a LXR α dependent manner.

To determine if the LXR α -dependent activation of *ABCA1*, *ABCG1* or *SR-BI/Cla-1* participates to the stimulation of free cholesterol efflux from human macrophages by LXR agonists, we took advantage of the use of specific stable knockdown (SKD) THP-1 macrophages for either *ABCA1* or *ABCG1* (Figure 4A) ¹⁴. Investigation of the role of *SR-BI/Cla-1* in this mechanism was achieved by the transient silencing of *SR-BI/Cla-1* expression in THP-1 macrophages using siRNA. As expected, free cholesterol efflux to ApoA-I was barely detectable from *ABCA1* SKD THP-1 macrophages as compared to control cells and LXR agonists were ineffective in their ability to induce cholesterol efflux to ApoA-I when *ABCA1* was absent (Figure 4B). As shown in Figure 4C, stimulation of free cholesterol efflux to HDL by GW3965 (+58%, $p < 0.0005$) was unaffected by the silencing of either *ABCG1* (*ABCG1* SKD) or *SR-BI/Cla-1* (*SR-BI* KD) expression in THP-1 macrophages whereas *ABCA1* silencing dropped efflux from stimulated macrophages to the level observed in unstimulated control cells (Figure 4C). Free cholesterol efflux to HDL from unstimulated *ABCA1* SKD macrophages was also diminished as compared to control cells (-40%, $p < 0.05$), although it was still increased by LXR agonist treatment. Interestingly, additional silencing of either *ABCG1* or *SR-BI/Cla-1* expression in *ABCA1* SKD THP-1 macrophages was without effect on the residual LXR stimulation of cholesterol efflux to HDL observed in those cells (Figure 4C).

Consistent with the specific requirement for LXR α in stimulation of cholesterol efflux from human macrophages, combined silencing of both LXR α and *ABCA1* expression in THP-1 macrophages produced complete abolition of GW3965-induced free cholesterol efflux to HDL while a residual LXR ligand stimulation was observed in either LXR α KD (+34%, $p < 0.05$) or *ABCA1* SKD (+30%, $p < 0.0005$) THP-1 macrophages (Figure 4 D-E). Finally, similar to what was observed in double LXR α / *ABCA1* KD cells, treatment with GW3965 failed to enhance cholesterol efflux to HDL when the LXR α -target ARL7 gene expression is knocked down in *ABCA1* SKD human macrophages (Figure 4E). This confirms the specific requirement for ARL7 in the LXR α -dependent induction of cholesterol efflux from human macrophages.

Discussion

Activation of cellular cholesterol efflux from lipid-loaded macrophages by LXR nuclear receptors is proposed to play a preponderant role in the atheroprotective property of LXR agonists. In the present study, specific RNAi-mediated silencing of the expression of LXR target genes in human macrophages allowed us to further decipher the underlying LXR-dependent mechanisms in the early step of reverse cholesterol transport from human foam cells and to provide important information regarding the potential therapeutic use of LXR agonists in atherogenic dyslipidemia. We presently reported that i) LXR α plays a preponderant and limiting role in promoting free cholesterol efflux whereas LXR β has no impact, ii) LXR α -dependent activation of ARL7 facilitates free cholesterol transport to plasma membrane in accessible pools for efflux and iii) stimulation of cholesterol export to both ApoA-I and HDL by LXR agonists required the selective induction of ABCA1 by LXR α .

Those findings clearly contrast with what was observed in mouse macrophage, in which both LXR α and LXR β isoforms seem to participate to cholesterol efflux through activation of *Abca1* and *Abcg1* expression^{10, 11}, thus further confirming major differences in mechanisms controlling macrophage cholesterol homeostasis between the two species¹⁴. The identification of the predominant role of LXR α in promoting cholesterol efflux in human macrophages is consistent with recent observations^{15, 21}, although specific mechanisms by which LXR α acts have not been elucidated in those latter studies. In good agreement with Ishibashi et al.¹⁵, we were however unable to confirm the participation of LXR β in cholesterol efflux from human THP-1 macrophages, as reported by Hozoji-Inada et al.¹⁶ who proposed that direct interaction of LXR β with ABCA1 inhibits cholesterol efflux to ApoA-I. Such discrepancies might likely result from the fact that cholesterol loading of human macrophages with acLDL in our present experimental conditions generates endogenous oxysterols that cause LXR β to dissociate from ABCA1, thus freeing ABCA1 for ApoA-I binding and cholesterol efflux in the absence of exogenous LXR ligands¹⁶.

Investigation of mechanisms involved in the LXR α -dependent activation of cholesterol efflux from human macrophages led us to identify ABCA1 as the sole cholesterol transporter required to promote free cholesterol efflux by LXR agonists to both ApoA-I and HDL, whereas the participation of both ABCG1 and SR-BI/Cla-1 appear unnecessary in this mechanism. These findings are consistent with our earlier study where we reported that although ABCG1 expression was potently induced by LXR agonists in human macrophages, this transporter did not seem to participate significantly in cholesterol efflux mechanisms in this cell type¹⁴. More surprisingly, we observed that SR-BI/CLA-1 did not play a significant role in cholesterol efflux to HDL from human macrophages stimulated or not with LXR agonists as the robust silencing of its expression by specific siRNA was without effect (Figure 4). This observation was in disagreement with previous studies²², including ours¹⁴ showing significant reduction of cholesterol efflux to HDL in, respectively, macrophages from individuals carrying variants in the *SCARB1* gene and from cells in which specific SR-BI/CLA-1-mediated cholesterol export activity has been blocked by a specific anti-Cla-1 antibody. Those observation suggest that silencing of *SCARB1* gene expression in human macrophages might be accompanied by a compensatory mechanism that counterbalances the reduction of SR-BI/Cla-1-mediated cholesterol efflux to HDL; such a mechanism being not observed when SR-BI/CLA-1 protein is correctly expressed^{22, 14}. Generation of double deficient cells led us to discard the possibility of any collaboration between ABCA1 with ABCG1 or SR-BI/CLA-1; their suppression in ABCA1-deficient human macrophages being unable to abolish the residual stimulation of cholesterol efflux to HDL by GW3965. Taken together with others recent studies^{21, 23, 24}, the present findings emphasize the preponderant contribution of the LXR α / ABCA1 axis in cholesterol efflux mechanisms in human macrophages, suggesting that the therapeutic stimulation of this specific pathway may drive reduction of both foam cell formation and lipid burden in the arterial wall.

ARL7 is a member of ADP-ribosylation factors (ARFs) family involved in vesicular transport in the secretory and endosomal pathway. ADP-ribosylation factor 7 (ARL7) has been described as the only member of ARFs family whose expression is induced by LXR¹⁸, and was proposed to participate to cholesterol efflux to ApoA-I in HeLa cells overexpressing WT or mutant ARL7 EGFP fusion proteins¹⁹. We here demonstrated that expression of ARL7 is induced by LXR agonists in human macrophages through a LXR α -dependent mechanism, as silencing of LXR α but not LXR β abolished induction of ARL7 by GW3965 (Figure 2A). Our data support a mechanism through which stimulation of ARL7 by LXR agonists facilitate vesicular transport of free cholesterol from intracellular pools to plasma membrane for ABCA1-mediated cholesterol efflux. Indeed, ARL7 binds α -tubulin and participates to the microtubule-dependent intracellular vesicular transport from early endosomes to recycling endosomes²⁵. Therefore it is conceivable that through this mechanism, the induction of ARL7 expression by LXR agonists stimulates the transport of free cholesterol contained in early endosomes to recycling endosomes from where it could serve to enrich plasma membrane. However,

we cannot exclude that ARL7 might also play a role in intracellular trafficking of ABCA1 and in its correct localization in human macrophages. Indeed, in addition to its presence at the cell surface where it promotes lipid efflux to exogenous acceptors, ABCA1 was also found to be localized on intracellular vesicles, such as early and late endosomes and lysosomes²⁶ which act as preferential sources of cholesterol for ABCA1-mediated efflux²⁷. Thus, alteration of intracellular trafficking of ABCA1 was accompanied by a subsequent reduction of ABCA1-mediated free cholesterol efflux in macrophages^{28, 29}.

We here provide evidence that induction of ARL7 expression by LXR agonists in human macrophages allowed transfer of free cholesterol to cell surface pools available for efflux, likely associated to lipid raft domains. Indeed, both the detection of the pentasaccharide chain of plasma membrane ganglioside G_{M1} associated to lipid rafts as well as cholesterol efflux to m β CD known to cause the removal of cholesterol from these membrane domains were increased upon treatment with GW3965; those effects being abolished in ARL7-deficient cells. Such an increased lipid raft formation in LXR-stimulated cells may participate to the induction of ABCA1-mediated cholesterol to ApoA-I since binding of ApoA-I to lipid rafts was proposed to initiate a slow efflux process of bulk cholesterol dependent of ABCA1 in human macrophages²⁰. This mechanism involving lipid rafts and ABCA1 was also proposed to operate in cholesterol efflux to mature HDL³⁰ in agreement with the idea that membrane lipid rafts constitute pools of cholesterol for efflux to HDL³¹. Taken together, we propose that treatment of human macrophages with LXR agonists induces ARL7 expression through LXR α and favors free cholesterol transport to cell surface in lipid raft domains, thereby triggering ABCA1-dependent cholesterol efflux to both ApoA-I and HDL. Coherent with the specific requirement of both ARL7 and ABCA1 in the LXR-mediated stimulation of cholesterol efflux from human macrophages, Sun et al. have pointed out that miRNA-26 repressed both ARL7 and ABCA1 expression through the binding to their 3'UTR and abolished activation of cholesterol efflux from macrophages to ApoA-I and to serum by LXR agonists³².

Reduction of atherosclerosis with LXR agonists was largely reported to be associated with major adverse effects in mouse models, the more prominent being an increased hepatic lipogenesis and hypertriglyceridemia. Because those deleterious effects were demonstrated to be specifically associated to LXR α but not LXR β , the use of specific LXR β agonists was proposed to be a safe option for a therapeutic use in atherogenic dyslipidemia³³. This strategy is based on the idea that stimulation of cholesterol efflux from macrophages in atherosclerotic lesions by LXR β agonists would preserve the atheroprotective action of dual LXR(α/β) agonists as observed in mice⁹. Therefore, the present findings suggest that such a therapeutic option may be ineffective in humans as LXR β does not mediate the stimulatory effects of LXR agonists on cholesterol efflux from human macrophages; this effect being indeed only attributable to LXR α .

However, although removal of cholesterol from macrophages in atherosclerotic lesions by injection of HDL was proven to be effective for reducing the arterial lipid burden in CAD patients³⁴, the real therapeutic benefit of the stimulation of macrophage cholesterol efflux by LXR agonists must be questioned at the light of recent studies that provide new key information that considerably challenge this concept. Indeed, analysis of ApoA-I and HDL from CAD and acute coronary syndrome (ACS) patients indicated that those particles are dysfunctional regarding their capacity to promote cholesterol efflux from macrophages, mostly consecutive to their modification following oxidation by myeloperoxidase^{5, 35}. More precisely, human atherosclerotic lesions contain lipid-poor ApoA-I, not associated to HDL, which display very poor cholesterol acceptor activity through the macrophage ABCA1 pathway^{36, 37}. In this context, the need to stimulate macrophage cholesterol efflux from atherosclerotic plaques with pharmacological drugs, such as LXR agonists, may appear limited as cholesterol acceptors available are dysfunctional. Under those conditions, induction of macrophage ABCA1 and ARL7 expression by LXR agonists through LXR α would fail to stimulate cholesterol efflux and to reduce foam cells in atherosclerotic lesions. Nevertheless, beyond the capacity of LXR to potentially induce macrophage cholesterol efflux, LXR activation is also known to repress inflammation, notably through the transrepression of NF- κ B-related genes of pro-inflammatory cytokines¹⁷ and a recent study indicates that LXR agonists may preserve their atheroprotective action *in vivo* in mice through their anti-inflammatory properties in conditions where macrophage cholesterol efflux was impaired³⁸.

Acknowledgements

None

Sources of funding.

A.S. was recipient of a Research Fellowship from the French Ministry of Research and Technology. This work was supported by the Fondation de France (W.L.G.). W.J., C.Q. and M.J.K. were supported by a Program Grant from the National Health and Medical Research Council of Australia.

Disclosures

None

References.

1. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: A dynamic balance. *Nature reviews. Immunology*. 2013;13:709-721
2. Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, Eaton GM, Lauer MA, Sheldon WS, Grines CL, Halpern S, Crowe T, Blankenship JC, Kerensky R. Effect of recombinant apoA-I milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: A randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2003;290:2292-2300
3. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The framingham study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1986;256:2835-2838
4. Khera AV, Cuchel M, de la Llera-Moya M, Rodrigues A, Burke MF, Jafri K, French BC, Phillips JA, Mucksavage ML, Wilensky RL, Mohler ER, Rothblat GH, Rader DJ. Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *The New England journal of medicine*. 2011;364:127-135
5. Li XM, Tang WH, Mosior MK, Huang Y, Wu Y, Matter W, Gao V, Schmitt D, Didonato JA, Fisher EA, Smith JD, Hazen SL. Paradoxical association of enhanced cholesterol efflux with increased incident cardiovascular risks. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33:1696-1705
6. Zelcer N, Tontonoz P. Liver x receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116:607-614
7. Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Pharmacological activation of liver x receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*. 2006;113:90-97
8. Tangirala RK, Bischoff ED, Joseph SB, Wagner BL, Walczak R, Laffitte BA, Daige CL, Thomas D, Heyman RA, Mangelsdorf DJ, Wang X, Lusis AJ, Tontonoz P, Schulman IG. Identification of macrophage liver x receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:11896-11901
9. Levin N, Bischoff ED, Daige CL, Thomas D, Vu CT, Heyman RA, Tangirala RK, Schulman IG. Macrophage liver x receptor is required for antiatherogenic activity of lxr agonists. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25:135-142
10. Bradley MN, Hong C, Chen M, Joseph SB, Wilpitz DC, Wang X, Lusis AJ, Collins A, Hseuh WA, Collins JL, Tangirala RK, Tontonoz P. Ligand activation of lxr beta reverses atherosclerosis and cellular cholesterol overload in mice lacking lxr alpha and apoe. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117:2337-2346
11. Bischoff ED, Daige CL, Petrowski M, Dedman H, Pattison J, Juliano J, Li AC, Schulman IG. Non-redundant roles for lxralpha and lxbeta in atherosclerosis susceptibility in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Journal of lipid research*. 2010;51:900-906
12. Rosenson RS, Brewer HB, Jr., Ansell B, Barter P, Chapman MJ, Heinecke JW, Kontush A, Tall AR, Webb NR. Translation of high-density lipoprotein function into clinical practice: Current prospects and future challenges. *Circulation*. 2013;128:1256-1267
13. Rigamonti E, Helin L, Lestavel S, Mutka AL, Lepore M, Fontaine C, Bouhlei MA, Bultel S, Fruchart JC, Ikonen E, Clavey V, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Liver x receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. *Circulation research*. 2005;97:682-689
14. Larrede S, Quinn CM, Jessup W, Frisdal E, Olivier M, Hsieh V, Kim MJ, Van Eck M, Couvert P, Carrie A, Giral P, Chapman MJ, Guerin M, Le Goff W. Stimulation of cholesterol efflux by lxr agonists in cholesterol-loaded human macrophages is abca1-dependent but abcg1-independent. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29:1930-1936
15. Ishibashi M, Filomenko R, Rebe C, Chevriaux A, Varin A, Derangere V, Bessede G, Gamber P, Lagrost L, Masson D. Knock-down of the oxysterol receptor lxralpha impairs cholesterol efflux in human primary macrophages: Lack of compensation by lxbeta activation. *Biochemical pharmacology*. 2013;86:122-129
16. Hozoji-Inada M, Munehira Y, Nagao K, Kioka N, Ueda K. Liver x receptor beta (lxbeta) interacts directly with atp-binding cassette a1 (abca1) to promote high density lipoprotein formation during acute cholesterol accumulation. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:20117-20124

17. Jakobsson T, Treuter E, Gustafsson JA, Steffensen KR. Liver x receptor biology and pharmacology: New pathways, challenges and opportunities. *Trends in pharmacological sciences*. 2012;33:394-404
18. Hong C, Walczak R, Dhamko H, Bradley MN, Marathe C, Boyadjian R, Salazar JV, Tontonoz P. Constitutive activation of lxr in macrophages regulates metabolic and inflammatory gene expression: Identification of arl7 as a direct target. *Journal of lipid research*. 2011;52:531-539
19. Engel T, Lueken A, Bode G, Hobohm U, Lorkowski S, Schlueter B, Rust S, Cullen P, Pech M, Assmann G, Seedorf U. Adp-ribosylation factor (arf)-like 7 (arl7) is induced by cholesterol loading and participates in apolipoprotein ai-dependent cholesterol export. *FEBS letters*. 2004;566:241-246
20. Gaus K, Kritharides L, Schmitz G, Boettcher A, Drobnik W, Langmann T, Quinn CM, Death A, Dean RT, Jessup W. Apolipoprotein a-1 interaction with plasma membrane lipid rafts controls cholesterol export from macrophages. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18:574-576
21. Chinetti-Gbaguidi G, Baron M, Bouhlef MA, Vanhoutte J, Copin C, Sebti Y, Derudas B, Mayi T, Bories G, Tailleux A, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Staels B. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the ppargamma and lxralpha pathways. *Circulation research*. 2011;108:985-995
22. Vergeer M, Korporaal SJ, Franssen R, Meurs I, Out R, Hovingh GK, Hoekstra M, Sierts JA, Dallinga-Thie GM, Motazacker MM, Holleboom AG, Van Berkel TJ, Kastelein JJ, Van Eck M, Kuivenhoven JA. Genetic variant of the scavenger receptor bi in humans. *The New England journal of medicine*. 2011;364:136-145
23. Zhao JF, Shyue SK, Lin SJ, Wei J, Lee TS. Excess nitric oxide impairs lxr(alpha)-abca1-dependent cholesterol efflux in macrophage foam cells. *Journal of cellular physiology*. 2014;229:117-125
24. Lee TS, Pan CC, Peng CC, Kou YR, Chen CY, Ching LC, Tsai TH, Chen SF, Lyu PC, Shyue SK. Anti-atherogenic effect of berberine on lxralpha-abca1-dependent cholesterol efflux in macrophages. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;111:104-110
25. Wei SM, Xie CG, Abe Y, Cai JT. Adp-ribosylation factor like 7 (arl7) interacts with alpha-tubulin and modulates intracellular vesicular transport. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;384:352-356
26. Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Cooney AM, Comly M, Dwyer NK, Zhang M, Blanchette-Mackie J, Santamarina-Fojo S, Brewer HB, Jr. Cellular localization and trafficking of the human abca1 transporter. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:27584-27590
27. Chen W, Sun Y, Welch C, Gorelik A, Leventhal AR, Tabas I, Tall AR. Preferential atp-binding cassette transporter a1-mediated cholesterol efflux from late endosomes/lysosomes. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:43564-43569
28. Le Goff W, Peng DQ, Settle M, Brubaker G, Morton RE, Smith JD. Cyclosporin a traps abca1 at the plasma membrane and inhibits abca1-mediated lipid efflux to apolipoprotein a-i. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24:2155-2161
29. Singaraja RR, Visscher H, James ER, Chroni A, Coutinho JM, Brunham LR, Kang MH, Zannis VI, Chimini G, Hayden MR. Specific mutations in abca1 have discrete effects on abca1 function and lipid phenotypes both in vivo and in vitro. *Circulation research*. 2006;99:389-397
30. Berrougui H, Loued S, Khalil A. Purified human paraoxonase-1 interacts with plasma membrane lipid rafts and mediates cholesterol efflux from macrophages. *Free radical biology & medicine*. 2012;52:1372-1381
31. Mendez AJ, Lin G, Wade DP, Lawn RM, Oram JF. Membrane lipid domains distinct from cholesterol/sphingomyelin-rich rafts are involved in the abca1-mediated lipid secretory pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:3158-3166
32. Sun D, Zhang J, Xie J, Wei W, Chen M, Zhao X. Mir-26 controls lxr-dependent cholesterol efflux by targeting abca1 and arl7. *FEBS letters*. 2012;586:1472-1479
33. Quinet EM, Savio DA, Halpern AR, Chen L, Schuster GU, Gustafsson JA, Basso MD, Nambi P. Liver x receptor (lxx)-beta regulation in lxralpha-deficient mice: Implications for therapeutic targeting. *Molecular pharmacology*. 2006;70:1340-1349
34. Kingwell BA, Chapman MJ. Future of high-density lipoprotein infusion therapies: Potential for clinical management of vascular disease. *Circulation*. 2013;128:1112-1121

35. Shao B, Tang C, Sinha A, Mayer PS, Davenport G, Brot N, Oda M, Zhao XQ, Heinecke JW. Humans with atherosclerosis have impaired abca1 cholesterol efflux and enhanced hdl oxidation by myeloperoxidase. *Circulation research*. 2014
36. DiDonato JA, Huang Y, Aulak KS, Even-Or O, Gerstenecker G, Gogonea V, Wu Y, Fox PL, Tang WH, Plow EF, Smith JD, Fisher EA, Hazen SL. Function and distribution of apolipoprotein a1 in the artery wall are markedly distinct from those in plasma. *Circulation*. 2013;128:1644-1655
37. Huang Y, DiDonato JA, Levison BS, Schmitt D, Li L, Wu Y, Buffa J, Kim T, Gerstenecker GS, Gu X, Kadiyala CS, Wang Z, Culley MK, Hazen JE, Didonato AJ, Fu X, Berisha SZ, Peng D, Nguyen TT, Liang S, Chuang CC, Cho L, Plow EF, Fox PL, Gogonea V, Tang WH, Parks JS, Fisher EA, Smith JD, Hazen SL. An abundant dysfunctional apolipoprotein a1 in human atheroma. *Nature medicine*. 2014;20:193-203
38. Kappus MS, Murphy AJ, Abramowicz S, Ntonga V, Welch CL, Tall AR, Westerterp M. Activation of liver x receptor decreases atherosclerosis in *ldlr*^{(-)/(-)} mice in the absence of atp-binding cassette transporters a1 and g1 in myeloid cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2014;34:279-284

Significance.

Pharmacological stimulation of Liver X Receptor (LXR) by synthetic agonists protects against plaque development in mice. This atheroprotective action of LXR in mouse models is thought to be attributable to the specific stimulation of cholesterol efflux from macrophages present in arterial wall. However, comparison between mice and human is difficult concerning macrophage cholesterol efflux mechanisms as molecular pathways controlling cholesterol homeostasis in human macrophage differ in some respects from those observed in mouse macrophage. In this context, the use of human macrophages is invaluable in order to elucidate those mechanisms. We presently propose that LXR-mediated stimulation of free cholesterol efflux from human macrophages is a two-step mechanism through which LXR α activation initially promotes ARL7-dependent free cholesterol transport to plasma membrane from where it is then subsequently exported to ApoA-I and HDL acceptors through the action of ABCA1. These information may appear of major interest given that synthetic LXR agonists are currently in clinical development for a therapeutic use in CAD patients.

Table. Correlation of LXR α and LXR β mRNA levels with free cholesterol efflux from human macrophages.

		Free cholesterol efflux		
mRNA levels		ApoA-I	HDL	Plasma
HMDM	<i>LXRα</i>	r = 0.98, p<0.001	r = 0.86, p<0.001	n.d.
	<i>LXRβ</i>	r = 0.03, n.s.	r = -0.09, n.s.	n.d.
THP-1	<i>LXRα</i>	r = 0.72, p<0.001	r = 0.65, p<0.001	r = 0.73, p<0.001
	<i>LXRβ</i>	r = 0.19, n.s.	r = -0.01, n.s.	r = 0.06, n.s.

N.d.: not determined, n.s.: non significant, Pearson correlation coefficient (r). Correlation were calculated from LXR α or LXR β mRNA expression in HMDM (n $\geq$ 9) or in THP-1 (n = 30) with corresponding net free cholesterol efflux to ApoA-I, HDL or plasma.

Figure 1

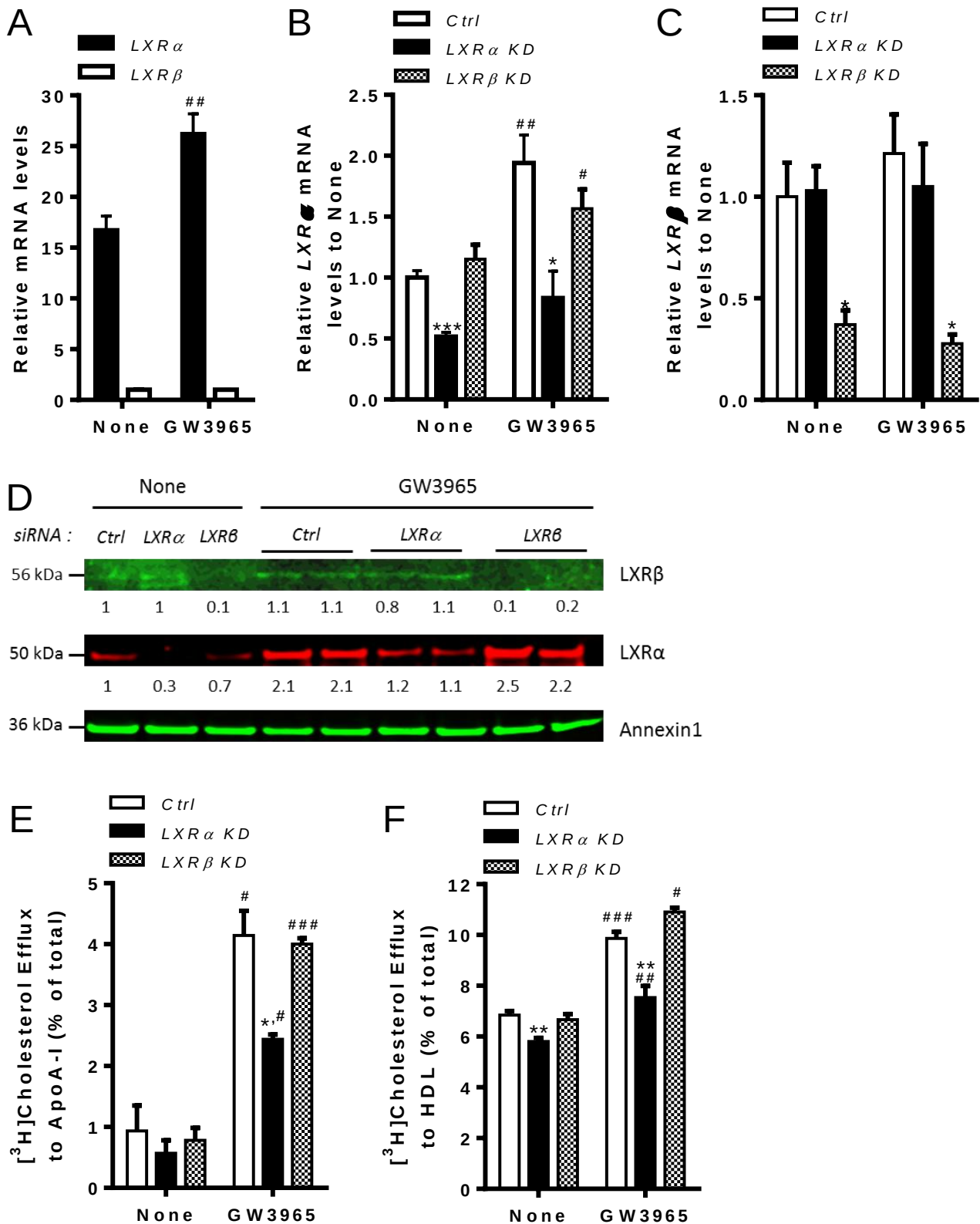


Figure 1. Stimulation of cholesterol efflux from primary human macrophages by LXR agonists is a LXRα-dependent mechanism. (A) Relative *LXRα* and *LXRβ* mRNA levels in cholesterol-loaded human monocyte-derived macrophages (HMDM) treated with either GW3965 or vehicle (DMSO, None) for 24 h. Data were expressed relative to *LXRβ* mRNA levels in unstimulated control cells. (B-C) mRNA and (D) protein *LXRα* and *LXRβ* levels in HMDM transfected with control siRNA (Ctrl) or siRNA targeting either *LXRα* (*LXRα* KD) or *LXRβ* (*LXRβ* KD) stimulated with either GW3965 or vehicle (DMSO, None) for 24 h. Data were expressed as a fold change in mRNA expression relative to unstimulated control cells (Ctrl None). Western blot shown is representative from three independent experiments. Values correspond to protein amounts normalized to corresponding amounts of Annexin1 and expressed as a fold change relative non stimulated control cells (None, Ctrl). Net radioisotopic free cholesterol efflux from cholesterol-loaded HMDM treated with either GW3965 or vehicle (DMSO, None) to lipid-free ApoA-I (E) or to HDL (F) for 4 h. For all experiments, values are means±SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. #p<0.05, ##p<0.005 and ###p<0.0005 versus respective non stimulated cells (None). *p<0.05, **p<0.005 and ***p<0.0005 versus cells transfected with control siRNA (Ctrl).

Figure 2

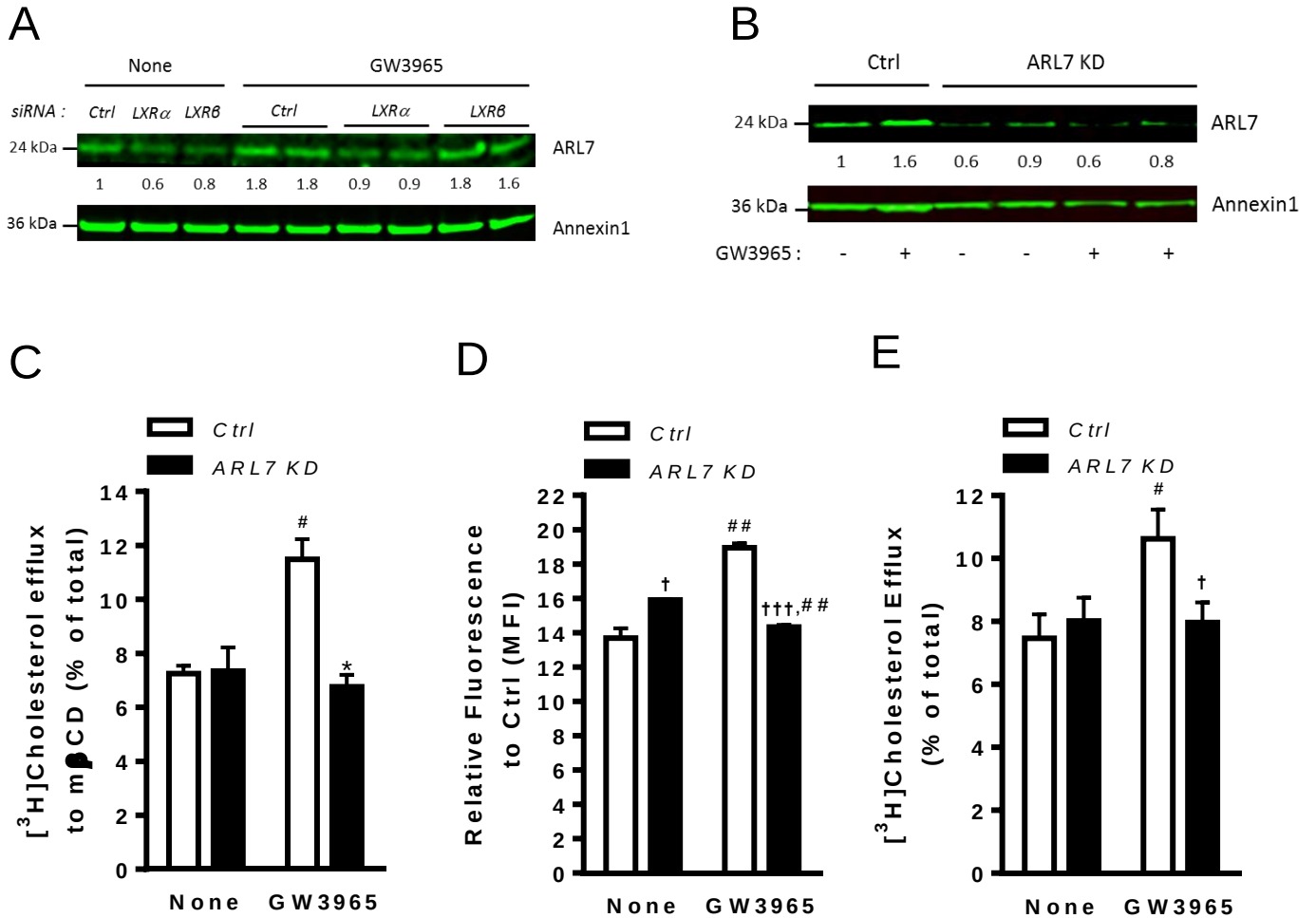
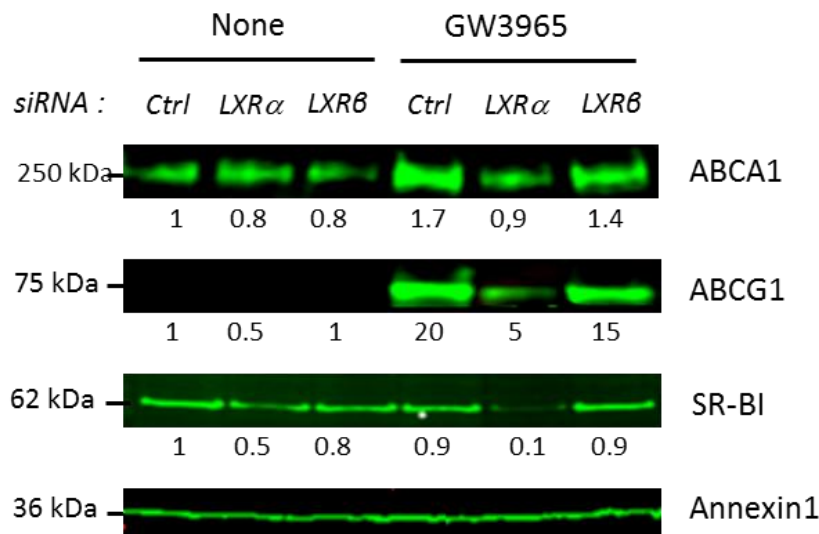


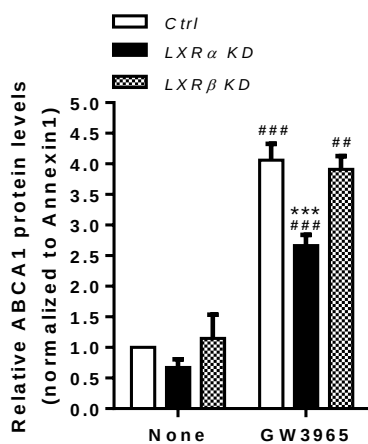
Figure 2. Suppression of ARL7 expression in human macrophages reduces free cholesterol pools accessible at the plasma membrane for efflux. (A) Analysis of ARL7 protein levels by Western blot in Ctrl, LXR α KD or LXR β KD HMDM treated with either GW3965 or vehicle (DMSO, None) for 24 h. (B) The efficiency of the ARL7 knockdown was assessed by analysis of protein levels by Western blot in human THP-1 macrophages transfected with control siRNA (Ctrl) or siRNA targeting ARL7 (ARL7 KD). Westerns blots shown are representative from three independent experiments. Values correspond to protein amounts normalized to corresponding amounts of Annexin1 and expressed as a fold change relative non stimulated control cells (None, Ctrl). Radioisotopic free cholesterol efflux to methyl- β -cyclodextrin (C) or to plasma (E) from Ctrl and ARL7 KD HMDM treated with either GW3965 or vehicle (DMSO, None). (D) Membrane lipid rafts were quantified by flow cytometry after incubation with Alexa Fluor 594-conjugated cholera toxin subunit- β (CT-B) in Ctrl and ARL7 KD THP-1 treated with either GW3965 or vehicle (DMSO, None) For all experiments, values are means $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. [#]p<0.05, ^{##}p<0.005 and ^{###}p<0.0005 versus respective non stimulated cells (None). ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.005 and ^{***}p<0.0005 versus cells transfected with control siRNA (Ctrl).

Figure 3

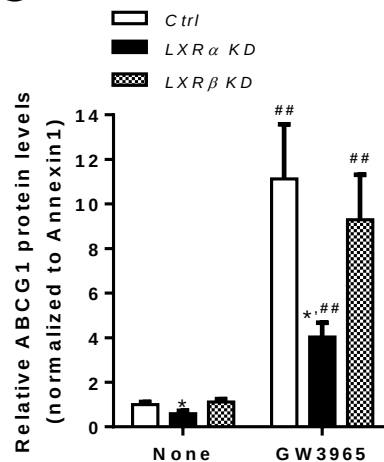
A



B



C



D

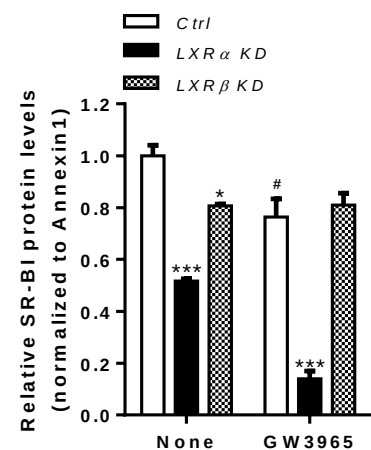


Figure 3. Stimulation of ABCA1, ABCG1 and SR-BI/CLA-1 expression is controlled by LXRα but not LXRβ in human macrophages. (A) Protein levels of ABCA1, ABCG1, and SR-BI/CLA-1 were assessed by western blot in HMDM transfected with control siRNA (Ctrl) or siRNA targeting either *LXRα* (*LXRα* KD) or *LXRβ* (*LXRβ* KD) stimulated with either GW3965 or vehicle (DMSO, None) for 24 h. Western blot shown is representative from three independent experiments. Values indicated correspond to protein amounts normalized to corresponding amounts of Annexin1 and expressed as a fold change relative non stimulated control cells (None, Ctrl). Quantification of ABCA1 (B), ABCG1 (C) and SR-BI/CLA-1 (D) protein levels normalized to corresponding amounts of Annexin1 and expressed as a fold change relative non stimulated control cells (None, Ctrl). Values are means±SEM of 3 independent experiments. #p<0.05, ##p<0.005 and ###p<0.0005 versus respective non stimulated cells (None). *p<0.05, **p<0.005 and ***p<0.0005 versus cells transfected with control siRNA (Ctrl).

Figure 4

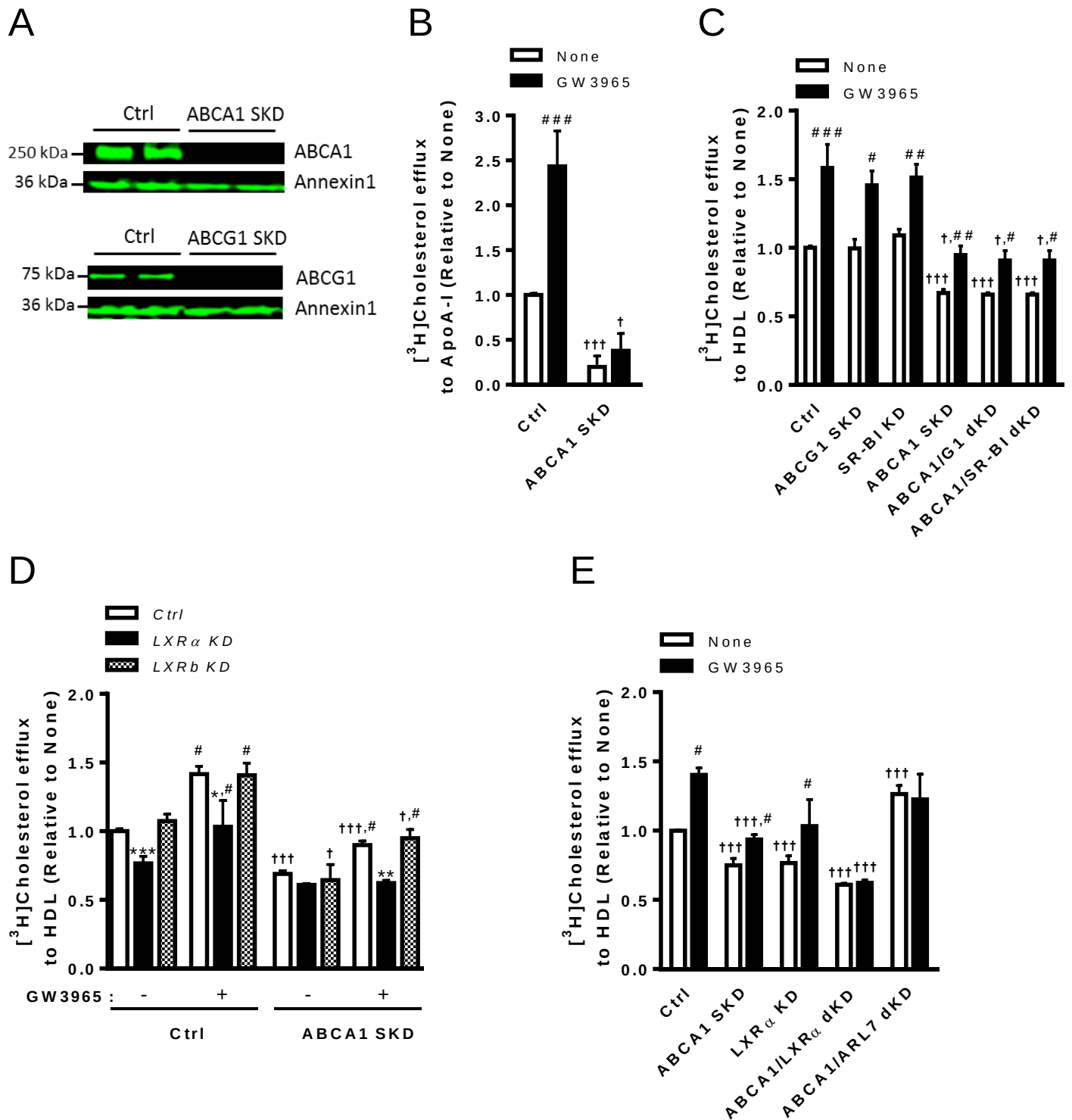


Figure 4. LXRα-dependent stimulation of free cholesterol efflux in human macrophages requires ABCA1 and ARL7. (A) Validation of ABCA1 and ABCG1 deficiency in human THP-1 macrophages stably transfected with shRNA targeting either ABCA1 (ABCA1 SKD) or ABCG1 (ABCG1 SKD), respectively. Radioisotopic free cholesterol efflux to ApoA-I (B) or to HDL (C-E) from human THP-1 macrophages single (S/KD) or double knocked down (dKD) for ABCA1 and/or ABCG1 and/or SR-BI (C), for ABCA1 with either LXRα or LXRβ (D) and ABCA1 and/or LXRα and ARL7 (E). For all experiments, values are means±SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. #p<0.05, ##p<0.005 and ###p<0.0005 versus respective non stimulated cells (None). *p<0.05, **p<0.005 and ***p<0.0005 versus cells transfected with control siRNA (Ctrl). †p<0.05, ††p<0.005 and †††p<0.0005 versus control ABCA1 cells (Ctrl).

Materials and Methods.

Primary culture of human macrophages.

Monocytes were isolated from the blood of healthy normolipidemic donors (Etablissement Français du Sang, EFS) by Ficoll gradients (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) and subsequently differentiated into human macrophages (HMDM) by adhesion on plastic Primaria plates (Falcon) over a period of 10 days of culture in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% heat-inactivated human serum, 2 mmol/L glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 20 ng/mL human macrophage colony-stimulating factor (hM-CSF).

Human THP-1 macrophages.

Human THP-1 monocytic cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and maintained in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2 mmol/L glutamine and 100 U/mL penicillin/streptomycin at 37°C in 5% CO₂. THP-1 were differentiated into macrophage-like cells with 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 48h.

RNA interference (RNAi)-mediated silencing using small interference (si)RNA.

Transient knock-down (KD) of LXR α , LXR β , ARL7, ABCG1 and Cla-1 in human macrophages was obtained by application of siRNA oligonucleotides (Dharmacon) targeted to the cDNA sequence of the human *NR1H3*, *NR1H2*, *ARL4C*, *ABCG1* and *SCARB1* gene (Genebank# NM_005693, NM_007121, NM_005737, NM_207629 and NM_005505, respectively). The sequences of the siRNA were indicated in supplemental Table I. HMDM and THP-1 macrophages were transfected with either 25 or 50 nM control siRNA (Dharmacon) or targeting siRNA using lipofectamine RNAiMax (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Generation of THP-1 clones stably knocked down (SKD) for ABCG1 was described in our previous studies¹. Stable silencing of ABCA1 in THP-1 cells (ABCA1 SKD) was achieved by transfection with a SureSilencing shRNA plasmid (Clone ID 1, Cat.KH02595P, SABiosciences). Monoclonal ABCA1 SKD THP-1 cell lines were selected with puromycin (250ng/ml) and knockdown of ABCA1 was confirmed by Western Blot. ABCG1 SKD and ABCA1 SKD clones were maintained under blasticidin (Invivogen) or puromycin (Invivogen) selection, respectively.

RNA extraction, retrotranscription, real-time quantitative PCR

Total RNA from cell culture or tissues were extracted using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) or TRIzol reagents (Euromedex), respectively, according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription and real-time qPCR using a LightCycler LC480 (Roche) were performed as previously described¹. Expression of mRNA levels was normalized to human non-POU domain containing, octamer-binding housekeeping gene (*NONO*), human alanin (*ALA*), human α -tubulin (*TUBA*) and human heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1 (*HSP90AB1*), human hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*), and human 18S ribosomal RNA (*18S rRNA*). Data were expressed as a fold change in mRNA expression relative to control values.

Western blotting analysis

Cell proteins were extracted using NE-PER Nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Pierce) containing protease inhibitors and were subsequently separated on a 4-12% Bis-Tris gel (Life Technologies). Proteins (25 to 50 μ g per lane) were transferred to nitrocellulose and the membrane was blocked with Casein blocker solution for 1h. Membranes were then incubated overnight at 4°C with either a rabbit anti-ABCG1 (NB400-132; Novus), or a rabbit anti-ABCA1 (NB400-105; Novus), or a rabbit anti-ARL7 (ab122025, Abcam), or a mouse anti-LXR α (ab41902, Abcam), or a rabbit anti-LXR β (ab56237, Abcam) and revealed with either IRDye 800CW-conjugated goat anti-rabbit (Li-Cor)

or IRDye 700CW-conjugated sheep anti-mouse (Li-Cor) at 1:10000 for 1 hour. Detection was performed using an Odyssey infrared imaging system (Li-Cor). Rabbit anti-SR-BI/Cla-1 antibody was kindly provided by Dr. Thierry Huby².

Cellular cholesterol efflux 24 h with 50 µg/mL [³H]cholesterol-labeled acetylated LDL (acLDL) (1 µCi/mL) in serum-free RPMI 1640 supplemented with 50 mM glucose, 2 mM glutamine, 0.2% BSA (RGGB) and 100 U/mL penicillin / streptomycin. The labeling media was removed and the cells were washed twice with PBS and then incubated with RGGB media for additional 16 h in the presence of either DMSO or 1 µM LXR agonist GW3965 (Sigma). Afterwards, cells were washed twice with warm RGGB media and incubated with either 20 µg/mL lipid-free apoA1 (Sigma), or 15 µg/mL HDL-PL (whole HDL fraction, density=1.063-1.21 g/mL) isolated from normolipidemic plasma by preparative ultracentrifugation³, or 2.5% normolipidemic plasma or in RGGB media for 4 h in the presence of DMSO or 1 µM GW3965. When indicated, 1 mM methyl-β-cyclodextrin (Sigma) was added for a 5-min chase period as a reliable indicator of plasma membrane free cholesterol content⁴. Radioactivity content was determined in the media and cells following extraction in hexane-isopropanol (3:2), evaporation of the solvent and liquid scintillation counting (Wallac Trilux 1450 Microbeta). The percentage of free cholesterol efflux was calculated as $100 \times (\text{medium cpm}) / (\text{medium cpm} + \text{cell cpm})$ and expressed as a percentage. Cholesterol efflux to exogenous acceptors was determined by subtracting free cholesterol efflux in the absence of any exogenous acceptors.

Quantification of lipid rafts.

Lipid rafts in differentiated macrophages were detected following incubation with 1 µg/mL Alexa Fluor 594-conjugated cholera toxin subunit-β (CT-B) (Molecular Probes) for 15 minutes at 4°C. Binding of CT-B to the pentasaccharide chain of plasma membrane ganglioside G_{M1}, which selectively partitions into lipid rafts⁵, allows a reliable detection of lipid rafts in live cells. After washing twice with cold PBS, cells were detached from plates with trypsin and subjected to flow cytometry analysis on LSR II FORTRESSA SORP (BD Biosciences).

Statistical analysis.

Data are shown as mean ± SEM. Experiments were performed in triplicate and values correspond to the mean from at least three independent experiments. Comparisons of 2 groups were performed by a 2-tailed Student's *t* test and comparisons of 3 or more groups were performed by ANOVA with Newman-Keuls post-test. All statistical analyses were performed using Prism software from GraphPad (San Diego, CA, USA)

References.

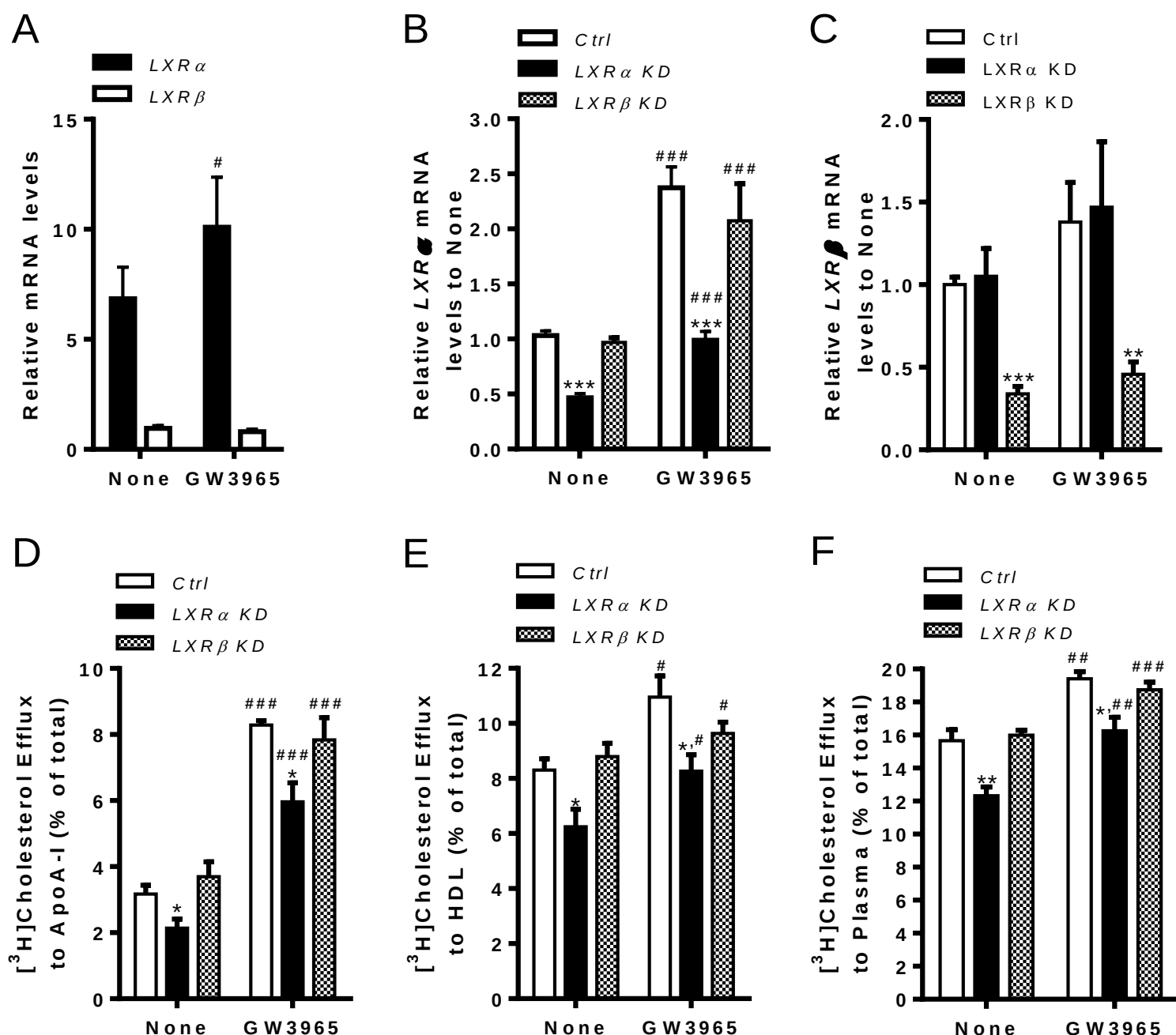
1. Larrede S, Quinn CM, Jessup W, Frisdal E, Olivier M, Hsieh V, Kim MJ, Van Eck M, Couvert P, Carrie A, Giral P, Chapman MJ, Guerin M, Le Goff W. Stimulation of cholesterol efflux by lxr agonists in cholesterol-loaded human macrophages is abca1-dependent but abcg1-independent. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29:1930-1936
2. Treguier M, Doucet C, Moreau M, Dachet C, Thillet J, Chapman MJ, Huby T. Transcription factor sterol regulatory element binding protein 2 regulates scavenger receptor cla-1 gene expression. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24:2358-2364
3. Chapman MJ, Goldstein S, Lagrange D, Laplaud PM. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *Journal of lipid research*. 1981;22:339-358
4. Smith JD, Le Goff W, Settle M, Brubaker G, Waelde C, Horwitz A, Oda MN. Abca1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein a-i. *Journal of lipid research*. 2004;45:635-644
5. Janes PW, Ley SC, Magee AI. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the t cell antigen receptor. *The Journal of cell biology*. 1999;147:447-461

Supplemental Materials.

Supplemental Table I. Sequences of siRNAs used for the generation of knockdown THP-1 macrophages.

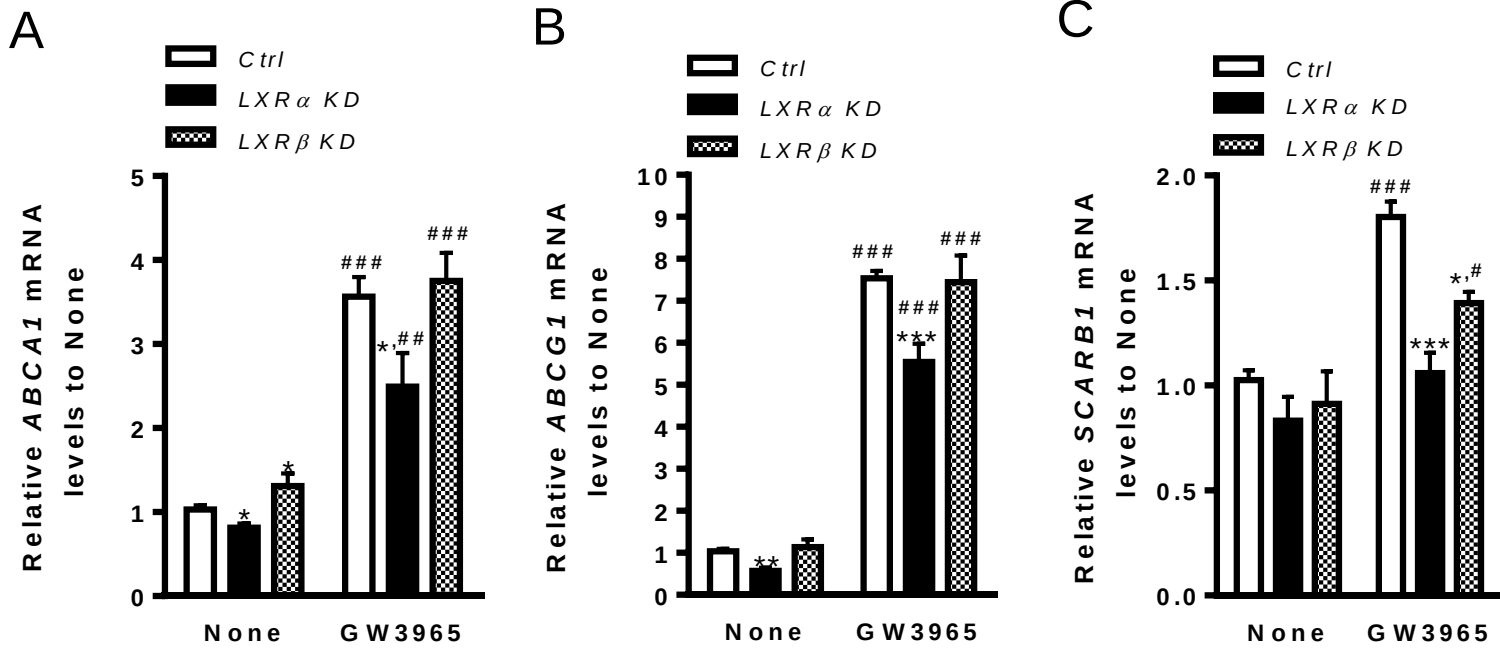
Gene Symbol	Sequence (5'→3')	
	Sense	Antisense
<i>ABCG1</i>	UCAUUGGCCUGCUGUACUU	AAGUACAGCAGGCCAAUGA
<i>SCARB1</i>	GGGAGACUCUUCACACAUU	AAUGUGUGAAGAGUCUCCC
<i>ARL4C</i>	GGCUCAAGUUCAACGAGUU	AACUCGUUGAACUUGAGCC
<i>NR1H3</i>	GGAUGCUAAUGAAACUGGU	ACCAGUUUCAUUAGCAUCC
<i>NR1H2</i>	GAACAGAUCCGGAAGAAGA	UCUUCUUCCGGAUCUGUUC

Supplementary Figure I



Supplementary Figure I. Stimulation of cholesterol efflux from human THP-1 macrophages by LXR agonists is a LXRα-dependent mechanism. (A) Relative *LXRα* and *LXRβ* mRNA levels in cholesterol-loaded human THP-1 macrophages treated with either GW3965 or vehicle (DMSO, None) for 24 h. Data were expressed relative to *LXRβ* mRNA levels in unstimulated control cells. (B-C) mRNA *LXRα* and *LXRβ* levels in THP-1 transfected with control siRNA (Ctrl) or siRNA targeting either *LXRα* (*LXRα* KD) or *LXRβ* (*LXRβ* KD) stimulated with either GW3965 or vehicle (DMSO, None) for 24 h. Data were expressed as a fold change in mRNA expression relative to unstimulated control cells (Ctrl None). Net radioisotopic free cholesterol efflux from cholesterol-loaded THP-1 macrophages treated with either GW3965 or vehicle (DMSO, None) to lipid-free ApoA-I (D), to HDL (E) or to plasma (F) for 4 h. For all experiments, values are means±SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. [#]p<0.05, ^{##}p<0.005 and ^{###}p<0.0005 versus respective non stimulated cells (None). ^{*}p<0.05, ^{**}p<0.005 and ^{***}p<0.0005 versus cells transfected with control siRNA (Ctrl).

Supplementary Figure II



Supplementary Figure II. Impact of the silencing of LXR α and LXR β on stimulation of ABCA1, ABCG1 and SR-B1/CLA-1 expression in human THP-1 macrophages. Quantification of ABCA1 (A), ABCG1 (B) and SR-B1/CLA-1 (C) mRNA levels by RT-QPCR assay in THP-1 macrophages transfected with control siRNA (Ctrl) or siRNA targeting either LXR α (LXR α KD) or LXR β (LXR β KD) stimulated with either GW3965 or vehicle (DMSO, None) for 24 h. Data were expressed as a fold change in mRNA expression relative to unstimulated control cells (Ctrl None). Values are means $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. #p<0.05, ##p<0.005 and ###p<0.0005 versus respective non stimulated cells (None). *p<0.05, **p<0.005 and ***p<0.0005 versus cells transfected with control siRNA (Ctrl).

Etude 2 : Rôle de l'agoniste LXR GW3965 dans la régulation de l'inflammasome NLRP3 dans le macrophage

L'inflammation chronique qui se développe dans la plaque est une composante majeure de l'athérosclérose, étudiée depuis plus récemment. Elle est activée par la transformation des macrophages en cellules spumeuses :

- Par l'internalisation de lipoprotéines modifiées, les LDLox, par les scavengers : activation TLR/NF- κ B
- Par la phagocytose de cholestérol cristallisé dans la plaque : activation de l'inflammasome NLRP3 (activation de Caspase-1, clivage et sécrétion de IL-1 β et IL-18 ; cf [Figure 25](#))

L'inactivation macrophage-spécifique de NLRP3 diminue la formation de lésions chez la souris.

L'activation LXR réprime l'inflammation, en particulier NF- κ B, dans les macrophages murins, ce qui participe à l'athéroprotection. Dans le macrophage humain, quel impact sur l'inflammation NF- κ B et NLRP3?

Quel rôle de l'agoniste LXR dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans le macrophage humain et *in vivo*?

Stratégie : - modèles de **macrophages humain** THP-1 (lignées) ou primaires (HMDM)

- traitement par GW3965 (agoniste LXR), JSH-23 (inhibiteur NF- κ B), LPS (activateur TLR4/NF- κ B), cristaux d'ALUM (activateurs NLRP3)

- mesure de sécrétion d'IL-1 β /IL-18 par ELISA, d'expression des acteurs par RT-QPCR, de l'activité Caspase-1 par colorimétrie

- inflammation NLRP3/IL-1 *in vivo* : mesure du recrutement intrapéritonéal de neutrophiles par injection de cristaux d'ALUM

I – 1) La sécrétion d'IL-1 β /IL-18 par les macrophages humains est bien induite par le traitement LPS/ALUM

2) Cette sécrétion est significativement diminuée par l'agoniste LXR

L'activation de l'inflammasome NLRP3 est diminuée lorsque LXR est activé.

A quel niveau le GW3965 réprime-t-il NLRP3? (i) Priming NF- κ B (ii) Cascade d'activation du complexe multiprotéique NLRP3 (iii) Les deux

II – (i) L'induction de l'expression d'IL-1 β par le LPS est réprimée par l'agoniste LXR, de manière NF- κ B-dépendante ; il n'en est rien pour IL-18, dont l'expression ne semble pas dépendre directement de l'activation de NF- κ B

(ii) L'activation de la caspase-1 induite par les cristaux est réprimée par les agonistes LXR. Cela est dû à une répression de l'expression des partenaires du complexe de l'inflammasome, *NLRP3*, *ASC* et *caspase-1*. Pas d'effet sur l'activation et l'expression des cathepsines.

L'activation de LXR réprime l'étape du priming (IL-1 β) et l'activation de la caspase-1

Le traitement par un agoniste LXR réprime l'expression d'IL-1 β et l'activation de la caspase-1 réduisant l'activation de l'inflammasome NLRP3

Validation sur des macrophages humains en culture primaire, impact *in vivo* et sur l'athérosclérose à confirmer

- Un inhibiteur de IL-1 β est actuellement testé cliniquement sur des patients
- Une étude récente démontre que la régression de l'athérosclérose induite par les agonistes LXR est indépendante de l'efflux et plaide pour place prépondérante de l'inflammation dans la maladie. Quelle est la contribution de ce mécanisme sur l'effet athéroprotecteur des agonistes LXR?
- Efficacité de l'activation LXR β dans la répression de l'inflammation et de l'inflammasome?

ETUDE PRELIMINAIRE

ROLE DE L'AGONISTE LXR GW3965 DANS LA REGULATION DE L'INFLAMMASOME NLRP3 AU SEIN DES MACROPHAGES

Fatima Kalfaoui^{1,2,3}, Alexandre Superville^{1,2,3}, Eric Frisdal^{1,2,3}, Philippe Lesnik^{1,2,3},
Maryse Guérin et Wilfried Le Goff^{1,2,3}

1- INSERM, UMR_1166, Research Institute of Cardiovascular Disease, Metabolism and Nutrition, F-75013 Paris, France;

2- Université Pierre et Marie Curie-Paris6, F-75005 Paris, France;

3- Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Pitié-Salpêtrière hospital, F-75013 Paris, France;

Key Words : LXR, human macrophage, inflammasome NLRP3, IL-1 β , atherosclerosis

Introduction

L'athérosclérose, ou développement de lésions fibro-lipidiques dans la paroi des artères, est la pathologie sous-jacente des maladies cardio-vasculaires, cause majeure de décès dans le monde. Elle est causée par une altération du métabolisme lipidique et à une inflammation chronique¹.

Plus précisément, l'hypercholestérolémie entraîne une infiltration de monocytes dans la paroi intima des artères. Ces cellules, une fois différenciés en macrophages, gorgées de cholestérol et inflammées, vont être responsables de l'évolution de la maladie par la sécrétion de médiateurs oxydants et pro-inflammatoires¹.

Le caractère inflammatoire de cette maladie a été longtemps négligé en comparaison de ses composantes lipidiques et oxydatives. Aujourd'hui, l'inflammation, promue en partie par ces macrophages, est considérée comme indispensable à la progression de la maladie ; elle est de plus un facteur de risque clinique puisque les lésions présentant une inflammation chronique et non résolue sont plus à même de causer des thromboses et des accidents vasculaires par leur rupture².

Dans les macrophages, cette inflammation est stimulée par l'internalisation de lipoprotéines modifiées, les LDL oxydés (LDLox) par les récepteurs scavengers CD36 et SR-A, qui vont activer la voie TLR/NF- κ B^{3,4}. Plus récemment, il a récemment été démontré que le cholestérol en trop forte quantité dans l'intima va cristalliser dès les phases précoces de la maladie. L'ingestion de ces cristaux par les macrophages va lever un deuxième « verrou » de l'inflammation : l'activation de l'inflammasome NLRP3, complexe multiprotéique responsable d'activer la sécrétion de deux cytokines pro-inflammatoires et athérogènes majeures : l'IL-1 β et l'IL-18⁵.

En effet, dans le macrophage humain, la phagocytose de cristaux de cholestérol va provoquer la rupture du phagolysosome par des contraintes mécaniques, et le relargage dans le cytoplasme des cathepsines B et L, protéases lysosomales. Ce sont ces deux dernières qui pourront activer le senseur NLRP3, induisant un changement conformationnel qui activera sa partie effectrice, ASC. Cette dernière clivera et activera l'enzyme caspase-1 (ou IL-1 convertase), qui lui-même maturera les précurseurs proIL-1 β et proIL-18 en leurs formes actives et sécrétées⁶. Cette signalisation ne peut avoir lieu, même en présence de cristaux, dans les macrophages non-inflammatoires : elle a besoin d'une activation préalable de l'inflammation via TLR/NF- κ B. Sans cette étape appelée « priming transcriptionnel », les gènes du précurseur de l'IL-1 β et des membres du complexe NLRP3 ne sont pas exprimés et le traitement par des cristaux inefficace⁷.

Une étude récente a démontré que l'activation de NLRP3 contribue de façon importante à l'athérosclérose dans des modèles de souris LDLr^{-/-}, développant l'athérosclérose sous un régime riche en cholestérol. En effet, l'inactivation spécifique de NLRP3, ASC et IL-1 spécifiquement dans les lignées myéloïdes de ces souris diminue la taille des lésions développées par celles-ci⁵.

Les Liver X Receptors LXRα (NR1H3) et LXRβ (NR1H2) sont des récepteurs nucléaires largement impliqués dans la régulation de l'homéostasie lipidique dans le macrophage. Egalement, il a été démontré que par un mécanisme différent de l'activation de gènes présentant un LXR-response element (LXRE) dans leur promoteur, LXR est capable de réprimer la transcription de gènes activés par NF-κB et a ainsi des propriétés anti-inflammatoires importantes dans le macrophage murin^{8,9}.

Egalement, l'activation de LXR a un effet athéroprotecteur in vivo. En effet, le traitement de souris LDLr par un agoniste synthétique de LXR diminue significativement la formation de lésions d'athérome¹⁰ ; cet effet est dû à une activation spécifique du récepteur dans les lignées myéloïdes puisqu'il disparaît lorsque ces souris sont transplantées avec de la moelle osseuse déficiente pour LXR¹¹.

Le mécanisme proposé pour cette athéroprotection est la stimulation de l'efflux de cholestérol cellulaire vers des lipoprotéines athéroprotectrices, ApoA-I et HDL, des macrophages gorgés de lipides de la plaque par les agonistes LXR¹². Cependant, l'altération de l'homéostasie lipidique n'est pas la seule composante du développement de l'athérosclérose, et une étude récente démontre que l'effet athéroprotecteur des LXR peut-être indépendant de l'efflux¹³.

Nous avons ainsi dans cette étude formulé l'hypothèse que l'activation des récepteurs LXR réprime l'activation de l'inflammasome NLRP3 dans le macrophage par deux mécanismes i) la répression de l'étape du priming transcriptionnel NF-κB par les agonistes LXR, d'une manière analogue à ce qui est observé chez la souris⁹ ou ii) l'inhibition de l'activation de l'enzyme caspase-1 par la répression d'autres partenaires de NLRP3.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé des modèles de macrophages THP-1 différenciés avec du PMA ou de macrophages primaires traités par du LPS in vitro. Nous avons également voulu confirmer le mécanisme ainsi mis en évidence in vivo chez la souris.

Material & Methods

Les cultures primaires de macrophages humains

Les monocytes d'un individu normolipidémique (Etablissement Français du Sang EFS) sont isolés par gradient de densité (Ficoll). Les monocytes sont ensemencés dans des plaques Primaria (3.10⁶ cellules/puits). Les HMDM (Human Monocyte Derived Macrophages) seront obtenus après 10 jours de culture dans du milieu RPMI1640, contenant 10% de sérum humain décomplémenté par la chaleur, 2 mmol/L de glutamine, 100 µg/mL de pénicillin/streptomycin, et du M-CSF (20ng/mL) humain, à 37°C, 5% CO₂.

La lignée cellulaire THP-1

La lignée cellulaire de monocytes THP-1 est cultivée dans un milieu de culture RPMI-1640 supplémenté avec 1% de glutamine, 10% de sérum de veau foetal inactivé par la chaleur et 1% de pénicilline/streptomycine, dans une atmosphère humide composée de 5% de CO₂ et 95% d'air à 37°C. Les cellules sont ensemencées et différenciées en macrophages par ajout de 50ng/mL de Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) pendant 72 heures. Le PMA permet d'activer le facteur NF-κB via la Protéine Kinase C et l'obtention de macrophages THP-1 de phénotype pro-inflammatoire (M1)

Traitement des cellules THP-1 et MHDM

Les macrophages THP-1 et MHDM, sont prétraités pendant 24h avec du milieu sans sérum contenant l'agoniste synthétique de LXR (1µM GW3965) ou/et avec l'inhibiteur de NF-κB (30µM JSH-23). La voie de l'inflammasome NLRP3 est activée par ajout de 50ng/mL de LPS et 100ng/mL de cristaux d'Alum (dilution de 25mg de cristaux d'Alum dans 1mL de PBS) tout en maintenant le traitement des cellules avec le GW3965 ou/et JSH-23. Les milieux de culture sont collectés à différents temps (0h ; 1h ; 2h ; 4h ; 8h ; 24h), afin de quantifier la sécrétion des cytokines IL-1β et IL-18 par ELISA.

Extraction d'ARN, retrotranscription et RT-QPCR

Après récupération du milieu de culture, les ARNs totaux sont extraits avec un kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) en suivant le protocole du fournisseur. Le dosage des ARNs se fait par lecture d'absorbance au Nanodrop.

Une quantité fixe d'ARN (1500ng) pour chaque échantillon est rétro-transcrite en utilisant un kit Applied Biosystems. Les échantillons sont incubés pendant 1h à 37°C en présence d'un milieu réactionnel contenant des amorces, des dNTPs et l'enzyme transcriptase inverse. La réaction est stoppée à 95°C pendant 5min afin d'inactiver l'enzyme puis les ADNc sont placés à 4°C.

On procède ensuite à la RT-QPCR. Chaque échantillon d'ADNc est incubé en présence d'un mixSYBERGreenMasterMix (Roche) contenant la molécule de SYBER Green, la Taq polymérase, les dNTPs et les amorces spécifiques du gène à amplifier (10nM) dans une plaque de 96 puits qui sera insérée dans un LightCycler 480 (Roche).

La quantité d'ADN est déterminée par les valeurs de Cp. Ces expressions seront normalisées par celles de gènes de référence (*ALA*, *TUBA*, *Hsp90*, *NONO*) dont l'expression est stable.

Mesure de l'activité caspase-1

Un kit de détection par colorimétrie (kit Abcam) est utilisé. 50µg de protéines sont déposées dans chaque puits de la plaque de microtitration, L'activité Caspase-1 est déterminée avec du substrat YVAD (Tyr-Val-Ala-Asp) marquée avec un chromophore p-nitroanilide (p-Na). La plaque est incubée 2 heures à 37°C. La quantification se fait à 400nm après 15min, 30min, 1h et 2h d'incubation. La protéine caspase-1 contenue dans les échantillons reconnaît la séquence du substrat marqué avec un chromophore, l'activation de la caspase-1 se fait par clivage qui libère la séquence fixée et permet l'émission de la lumière du p-Na.

ELISA

La sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 humaines sont quantifiées en utilisant un kit ELISA (eBioscience) à partir des milieux de culture cellulaire, en suivant le protocole du fabricant.

Activation de l'inflammasome *in vivo*

Afin de mesurer l'activation de l'inflammasome *in vivo*, des souris femelles C57BL/6 (n=5/groupe), âgées de 8 semaines sont soumises à un régime Normal Chow Diet. Les souris sont soit gavées avec un agoniste synthétique LXR GW3965 (40mg/kg/jour) ou avec du véhicule (Méthyl cellulose 0,5% dilué dans du sérum physiologique (NaCl) 0,9%), pendant 5 jours, puis injectées en intrapéritonéale soit avec du PBS, soit avec 2mg de cristaux d'Alum dilués dans 200 µL de PBS. Après 15h, la quantité absolue de neutrophiles récupérés par un lavage du péritoine avec un tampon PBS (1% BSA, 0,5mM EDTA) est déterminée par cytométrie en flux (marquage avec des anti-cors anti- CD45+ (1/100e), Ly-6G+ (1/200e) et CD11b+ (1/200e)). Un aliquot du milieu de lavage péritonéal est utilisé pour isoler les macrophages péritonéaux après ensemencement dans des plaques de 12 puits dans un milieu DMEM pendant 2h à 37°C pour permettre leur adhésion.

Test statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type. La comparaison de 2 groupes est réalisée par un test de Student et la comparaison de 3 groupes ou plus est réalisée par un test ANOVA. Les groupes sont considérés comme significativement différents lorsque $p < 0.05$.

Résultats

Les sécrétions des cytokines NLRP3-dépendantes IL-1 β et IL-18 sont diminuées par le traitement par l'agoniste LXR GW3965

Nous avons d'abord voulu étudier l'impact de l'activation LXR sur l'activation de l'inflammasome NLRP3. Pour ce faire, des monocytes THP-1 ont été différenciés en macrophages par traitement avec du PMA, puis pré-traités avec du GW3965 ou du DMSO (condition Contrôle) pendant 24h. Ensuite l'inflammasome est activé par :

- un activateur du « priming transcriptionnel », le LPS, qui agit par le récepteur TLR4⁷
- un activateur direct de l'inflammasome NLRP3, les cristaux d'ALUM, qui vont agir via déstabilisation phagolysosomale et relargage cytoplasmique des cathepsines⁶

Cette double activation a été réalisée pendant différents temps, de 1h à 24h, afin d'étudier la cinétique de sécrétion des cytokines IL-1 β (Figure 1A) et IL-18 (Figure 1B) par les modèles, en présence ou en absence de GW3965.

Ces deux sécrétions sont significativement stimulées par traitement cristaux/LPS à partir de 4h, preuve d'une activation de l'inflammasome NLRP3. L'activation de LXR $\alpha\beta$ par le GW3965 diminue significativement ces deux sécrétion à partir de 4h pour IL-1 β et uniquement à 4h pour IL-18 (IL-1 β : -50%, $p < 0.05$; IL-18 : -40% , $p < 0.05$).

Deux hypothèses peuvent expliquer cette inhibition de la voie de l'inflammasome NLRP3 par les agonistes LXR :

- l'activation LXR réprime l'activation du facteur de transcription NF- κ B dans le macrophage humain, comme déjà démontré dans le macrophage murin, diminuant la disponibilité du précurseur de l'IL-1 β pour le complexe NLRP3, activé.
- l'activation de NLRP3 et le clivage sous-jacent de la caspase-1 sont eux-même impactés par le traitement par les agonistes LXR

L'expression d'IL-1 β est diminuée par les agonistes LXR de manière NF- κ B-dépendante ; mais pas l'expression d'IL-18.

Les taux d'ARNm des macrophages THP-1 codant pour IL-1 β et IL-18 ont également été analysés par RT-QPCR en parallèle de la sécrétion de ces cytokines. Egalement, pour étudier le caractère NF- κ B-dépendant de cette régulation, les macrophages ont été traités en parallèle avec du

JSH-23, inhibiteur de cette voie qui séquestre p65 dans le cytoplasme et empêche ainsi l'activation des promoteurs des gènes cibles.

Premièrement, de manière inattendue, on observe un pic d'expression à 8h pour l'IL-1 β et à 24h pour IL-18 (résultats non montrés).

Dans le cas de l'IL-1 β , l'expression est réellement stimulée, puisqu'on détecte environ 1500 fois plus d'ARNm dans les THP-1 traités par le LPS et les cristaux d'ALUM pendant 8h que dans les THP-1 non traités. Cette induction est significativement réduite par le traitement avec le GW3965 (-50% , $p<0.05$) et elle est presque complètement abolie par le traitement avec le JSH-23 (-90%, $p<0.01$), ce qui souligne le caractère quasiment exclusivement NF- κ B-dépendant de cette stimulation (Figure 2). Le GW3965 n'a plus aucun effet en l'absence d'activation NF- κ B (Figure 2A), indiquant que le GW3965 réprime l'expression du précurseur de la cytokine IL-1 β , substrat pour la caspase-1 activée par NLRP3, en inhibant NF- κ B.

L'expression ARNm d'IL-18 est stimulée de manière bien plus réduite par le traitement avec du LPS et des cristaux d'ALUM. Après 24h, on n'augmente le taux basal d'expression que 3 fois (Figure 2B). De manière encore plus inattendue, le traitement par le GW3965 augmente la quantité relative d'ARNm d'IL-18 dans les macrophages, en présence comme en absence de JSH-23 (Figure 2B, 2 fold increase, $p<0.05$). Le traitement par le JSH-23 inhibe néanmoins l'expression du précurseur de la cytokine (Figure 2B, -90%, $p<0.05$). Il semble que l'augmentation de la transcription de l'IL-18 est indirectement augmentée par l'activation de NF- κ B, puisqu'elle intervient de manière plus tardive et moins importante que celle d'IL-1 β , et que l'augmentation de cette expression par les agonistes LXR soit, elle, NF- κ B-indépendante. On peut ajouter que la quantité d'ARNm d'IL-18 détecté à un niveau basal est déjà élevée, car déjà exprimée de façon constitutive, indépendamment du priming, ce qui explique l'induction faible par le LPS et les cristaux.

En résumé, on a bien une inhibition du priming transcriptionnel de l'IL-1 β par l'action des agonistes LXR via la voie NF- κ B qui explique l'impact de ceux-ci sur la sécrétion de la cytokine par le macrophage humain. Ce mécanisme ne peut cependant pas expliquer la réduction de la sécrétion de la cytokine IL-18.

L'activation des LXR réprime la stimulation de l'activité caspase-1 par les cristaux d'ALUM, ainsi que l'expression des différents partenaires du complexe NLRP3

Ainsi, l'effet des agonistes LXR sur la sécrétion des cytokines IL-1 β et IL-18 peut également être dû à une modulation du clivage activateur de la caspase-1, l'enzyme qui rend les cytokines actives et sécrétables, ainsi qu'à la quantité de complexe NLRP3 « senseur » des cristaux d'ALUM dans le cytoplasme.

Premièrement, l'activité caspase-1 a été mesurée dans deux modèles de macrophages humains : des lignées THP-1 (Figure 3A) ou des macrophages primaires (Figure 3B). L'activité caspase-1 est bien significativement augmentée par le traitement par les cristaux d'ALUM, dans les THP-1 activés par du PMA (Figure 3A, 1.5 fold increase, $p < 0.05$) ou les macrophages primaires stimulés avec du LPS (Figure 3B, 2.5 fold-increase, $p < 0.05$). Dans les deux modèles cette stimulation est abolie en présence de GW3965. Ces résultats démontrent bien que l'agoniste LXR GW3965 réprime l'activation de la caspase-1 et donc de l'inflammasome NLRP3 par le traitement avec les cristaux d'ALUM.

Les expressions ARNm des différents partenaires de complexe senseur, *Caspase-1*, *ASC* et *NLRP3*, ont ensuite été analysées par RT-QPCR (Figure 3C-E). L'expression de ces trois gènes est significativement stimulée par un traitement par le LPS et les cristaux d'ALUM (*Caspase-1* : Figure 3C, 40-fold increase, $p < 0.05$; *NLRP3* : Figure 3D, 14-fold increase, $p < 0.05$; *ASC* : Figure 3E, 4-fold increase, $p < 0.05$). Cette expression dans des conditions inflammatoires et d'activation NLRP3 est significativement réduite par un traitement par l'agoniste LXR (*Caspase-1* : Figure 3C, -50%, $p < 0.05$; *NLRP3* : Figure 3D, -60%, $p < 0.05$; *ASC* : Figure 3E, -70%, $p < 0.05$).

L'expression ARNm des cathepsines B et L ainsi que leur état d'activation a également été analysée respectivement par RT-QPCR et western blot ; aucun effet de l'agonistes LXR GW3965 n'a été détecté ni sur l'un ni sur l'autre (Résultats non montrés).

L'activation des LXR réprime donc la signalisation de l'inflammasome NLRP3, l'expression des partenaires du complexe multiprotéique et l'activation de la caspase-1 en réprimant l'expression de 3 partenaires du complexe senseur, NLRP3 lui-même, son effecteur ASC et le substrat caspase-1.

Effet de l'agoniste synthétique LXR sur l'activation de l'inflammasome et la stimulation IL-1 in vivo.

Pour finir, nous avons voulu confirmer le mécanisme mis en évidence précédemment *in vivo* chez la souris. Le modèle utilisé dans la littérature pour quantifier l'inflammation IL-1 en réponse à la stimulation de NLRP3 est la quantification du recrutement de neutrophiles dans le péritoine faisant suite à une injection intrapéritonéale de cristaux^{5,14,15}. Les neutrophiles sont d'autres cellules immunitaires inflammatoires, qui peuvent aussi être recrutée au niveau la plaque¹⁶. Nous avons donc utilisées des souris C57BL/6 femelles, soumises à un régime normal. Ces souris ont été gavées 5 jours avant l'expérience toutes les 24h avec un agoniste LXR (GW3965, 40mg/kg/jour) ou un véhicule (condition contrôle). Ensuite, 2mg de cristaux d'ALUM dissous dans du PBS ou du PBS seul (condition non-stimulée) ont été injecté intrapéritonéalement. Les leucocytes péritonéaux sont récupérés et analysés 15 heures plus tard.

On peut voir qu'il y a bien un recrutement de neutrophiles péritonéaux en réponse à l'injection de cristaux : quasiment absents en situation non stimulée, en moyenne 7.5 millions de cellules immunitaires sont recrutées grâce à l'injection de cristaux d'ALUM (Figure 4A, $p < 0.001$). De manière inattendue, le gavage avec des agonistes LXR ne diminue pas significativement le recrutement de ces neutrophiles (Figure 4A, $n=3$ vs $n=4$, $p > 0.05$), suggérant que le GW3965 ne réduit pas la production d'IL-1 β par les macrophages *in vivo*. Toutefois, il est à noter que le nombre d'animaux utilisé dans cette expérience est faible et qu'il existe une très grande variabilité dans les résultats.

Afin de mieux comprendre l'absence d'effet de l'agoniste LXR sur l'inflammation et le recrutement de neutrophiles péritonéaux, nous avons vérifié si l'expression d'ABCG1, le gène cible de LXR dont l'expression est la plus sensible au traitement par les agonistes, est modifiée dans les macrophages péritonéaux des souris gavées par rapport aux souris contrôles. On peut voir figure 4B que la quantité d'ARNm d'ABCG1 n'est pas modifiée par le gavage, ce qui indique clairement que l'activation LXR via le gavage n'a pas été efficace au niveau des macrophages péritonéaux.

Ainsi, l'hypothèse de l'inhibition de l'activation de NLRP3 par les agonistes LXR *in vivo* n'a pas pu être confirmée dans ces conditions expérimentales.

Perspectives

Ainsi, dans cette étude nous avons mis en évidence pour la première fois dans le macrophage humain l'implication de la voie LXR dans la répression de la voie de l'inflammasome NLRP3.

Premièrement, l'activation générale de cette voie par le LPS et des cristaux d'ALUM est diminuée par l'activation LXR : le traitement par des agonistes LXR diminue significativement la sécrétion des cytokines IL-1 β et IL-18. Cet effet est du i) à une répression du priming du gène de l'IL-1 β , dépendante de la voie NF- κ B, mais pas du priming de l'IL-18 ; ii) à une inhibition de l'activation de la caspase-1 par les cristaux d'ALUM, due à une réduction de l'expression des gènes des partenaires du complexe de l'inflammasome : *NLRP3*, *ASC* et *Caspase-1*.

Afin de compléter cette étude, il nous faut désormais :

- premièrement, confirmer l'ensemble des résultats *in vitro* et le mécanisme mis en évidence sur les modèles de macrophages humains primaires, plus physiologiques que les lignées cellulaires THP-1. De plus, les macrophages primaires ont pour particularité de ne pas présenter d'activation de l'inflammation en basal, contrairement aux THP-1 qui eux sont activés avec du PMA. Il faut également confirmer l'inhibition de l'expression de NLRP3 et Caspase-1 par les agonistes au niveau protéique aussi bien dans les THP-1 que dans les macrophages primaires
- ensuite, confirmer le mécanisme *in vivo*. Pour cela, il faut déterminer pourquoi le gavage n'a pas donné de résultats satisfaisants notamment quant à l'activation des macrophages intrapéritonéaux : soit l'agoniste n'a pas été délivré dans la circulation générale, soit sélectivement dans le péritoine. Pour répondre à cette question, l'expression d'ABCG1 sera quantifiée dans les foies des animaux, qui ont été conservés. Si les résultats confirmant que le gavage a été effectif (augmentation de l'expression des cibles de LXR dans le foie) mais n'a pas activé les macrophages péritonéaux, l'injection péritonéale de GW3965 devra être envisagée. Puis, il faut trouver une méthode plus locale, comme une injection péritonéale locale de GW3965.
- pour étudier l'impact de ce mécanisme sur l'athérosclérose, des souris LDLr^{-/-} devront être transplantées avec de la moelle osseuse sauvage NLRP3^{+/+} ou NLRP3^{-/-}. Ces souris seront ensuite soumises à un régime riche en cholestérol, censé promouvoir la formation de lésions, supplémenté ou non en agoniste LXR pendant 8 semaines. Une fois ce régime terminé, la

quantification des lésions et leur caractérisation seront effectuées. On s'attend à observer une diminution significative des lésions chez les souris transplantées NLRP3^{+/+} traitées par l'agoniste et chez les souris transplantées NLRP3^{-/-}. La question est de savoir si l'agoniste a toujours un effet sur la formation de plaques chez les souris transplantées NLRP3^{-/-} : cela permettra de déterminer si l'effet athéroprotecteur des agonistes LXR requiert l'inhibition de la voie de l'inflammasome NLRP3 ou si cette dernière contribue partiellement à l'effet athéroprotecteur de cet agoniste.

References.

1. Glass, C K, and J L Witztum. "Atherosclerosis. the Road Ahead." *Cell* 104, no. 4 (February 23, 2001): 503–16.
2. Libby, Peter. "Inflammation in Atherosclerosis." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32, no. 9 (September 2012): 2045–51.
3. Seimon, Tracie A, Marissa J Nadolski, Xianghai Liao, Jorge Magallon, Matthew Nguyen, Nicole T Feric, Marlys L Koschinsky, et al. "Atherogenic Lipids and Lipoproteins Trigger CD36-TLR2-Dependent Apoptosis in Macrophages Undergoing Endoplasmic Reticulum Stress." *Cell Metabolism* 12, no. 5 (November 3, 2010): 467–82. doi:10.1016/j.cmet.2010.09.010.
4. Stewart, Cameron R, Lynda M Stuart, Kim Wilkinson, Janine M van Gils, Jiusheng Deng, Annett Halle, Katey J Rayner, et al. "CD36 Ligands Promote Sterile Inflammation through Assembly of a Toll-like Receptor 4 and 6 Heterodimer." *Nature Immunology* 11, no. 2 (February 2010): 155–61. doi:10.1038/ni.1836.
5. Duewell, Peter, Hajime Kono, Katey J Rayner, Cherilyn M Sirois, Gregory Vladimer, Franz G Bauernfeind, George S Abela, et al. "NLRP3 Inflammasomes Are Required for Atherogenesis and Activated by Cholesterol Crystals." *Nature* 464, no. 7293 (April 29, 2010): 1357–61.
6. Rajamäki, Kristiina, Jani Lappalainen, Katariina Oörni, Elina Välimäki, Sampsa Matikainen, Petri T. Kovanen, and Kari K. Eklund. "Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation." *PloS One* 5, no. 7 (2010): e11765.
7. Bauernfeind, Franz G., Gabor Horvath, Andrea Stutz, Emad S. Alnemri, Kelly MacDonald, David Speert, Teresa Fernandes-Alnemri, et al. "Cutting Edge: NF-kappaB Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183, no. 2 (July 15, 2009): 787–91.
8. Ghisletti, Serena, Wendy Huang, Kristen Jepsen, Chris Benner, Gary Hardiman, Michael G. Rosenfeld, and Christopher K. Glass. "Cooperative NCoR/SMRT Interactions Establish a Corepressor-Based Strategy for Integration of Inflammatory and Anti-Inflammatory Signaling Pathways." *Genes & Development* 23, no. 6 (March 15, 2009): 681–93. doi:10.1101/gad.1773109.
9. Ghisletti, Serena, Wendy Huang, Sumito Ogawa, Gabriel Pascual, Mu-En Lin, Timothy M. Willson, Michael G. Rosenfeld, and Christopher K. Glass. "Parallel SUMOylation-Dependent Pathways

- Mediate Gene- and Signal-Specific Transrepression by LXRs and PPARgamma." *Molecular Cell* 25, no. 1 (January 12, 2007): 57–70. doi:10.1016/j.molcel.2006.11.022.
10. Tangirala, Rajendra K., Eric D. Bischoff, Sean B. Joseph, Brandee L. Wagner, Robert Walczak, Bryan A. Laffitte, Chris L. Daige, et al. "Identification of Macrophage Liver X Receptors as Inhibitors of Atherosclerosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, no. 18 (September 3, 2002): 11896–901. doi:10.1073/pnas.182199799.
 11. Levin, Nancy, Eric D. Bischoff, Chris L. Daige, Diane Thomas, Calvin T. Vu, Richard A. Heyman, Rajendra K. Tangirala, and Ira G. Schulman. "Macrophage Liver X Receptor Is Required for Antiatherogenic Activity of LXR Agonists." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25, no. 1 (January 2005): 135–42. doi:10.1161/01.ATV.0000150044.84012.68.
 12. Bischoff, Eric D., Chris L. Daige, Mary Petrowski, Harry Dedman, Jennifer Pattison, Joseph Juliano, Andrew C. Li, and Ira G. Schulman. "Non-Redundant Roles for LXRA and LXRβ in Atherosclerosis Susceptibility in Low Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice." *Journal of Lipid Research* 51, no. 5 (May 2010): 900–906. doi:10.1194/jlr.M900096.
 13. Kappus, Mojdeh S., Andrew J. Murphy, Sandra Abramowicz, Vusisizwe Ntonga, Carrie L. Welch, Alan R. Tall, and Marit Westerterp. "Activation of Liver X Receptor Decreases Atherosclerosis in *Ldlr*^{-/-} Mice in the Absence of ATP-Binding Cassette Transporters A1 and G1 in Myeloid Cells." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34, no. 2 (February 2014): 279–84. doi:10.1161/ATVBAHA.113.302781.
 14. Martinon, Fabio, Virginie Pétrilli, Annick Mayor, Aubry Tardivel, and Jürg Tschopp. "Gout-Associated Uric Acid Crystals Activate the NALP3 Inflammasome." *Nature* 440, no. 7081 (March 9, 2006): 237–41.
 15. Guarda, Greta, Catherine Dostert, Francesco Staehli, Katrin Cabalzar, Rosa Castillo, Aubry Tardivel, Pascal Schneider, and Jürg Tschopp. "T Cells Dampen Innate Immune Responses through Inhibition of NLRP1 and NLRP3 Inflammasomes." *Nature* 460, no. 7252 (July 9, 2009): 269–73.
 16. Soehnlein, Oliver. "Multiple Roles for Neutrophils in Atherosclerosis." *Circulation Research* 110, no. 6 (March 16, 2012): 875–88.

Figure Legends.

Figure 1. Les sécrétions des cytokines NLRP3-dépendantes IL-1 β et IL-18 sont diminuées par le traitement par l'agoniste LXR GW3965.

Le niveau de sécrétion de IL-1 β (A) et de IL-18 (B) a été déterminé par le kit ELISA dans des THP-1. (* p < 0,05 DMSO vs GW3965, # p < 0,05, 2h vs 4h).

Figure 2. L'expression d'IL-1 β est diminuée par les agonistes LXR de manière NF- κ B ; mais pas l'expression d'IL-18

Quantification des ARNm d'IL-1 β (A) et d'IL-18 (B) par RT-QPCR dans des THP-1 traités par du GW3965 et/ou du JSH-23, et stimulés les activateurs LPS/cristaux d'ALUM. (* p < 0,05 DMSO vs GW3965, # p < 0,05, Traité vs non-traité).

Figure 3. L'activation des LXR réprime la stimulation de l'activité caspase-1 par les cristaux d'ALUM, ainsi que l'expression des différents partenaires du complexe NLRP3 en situation inflammatoire.

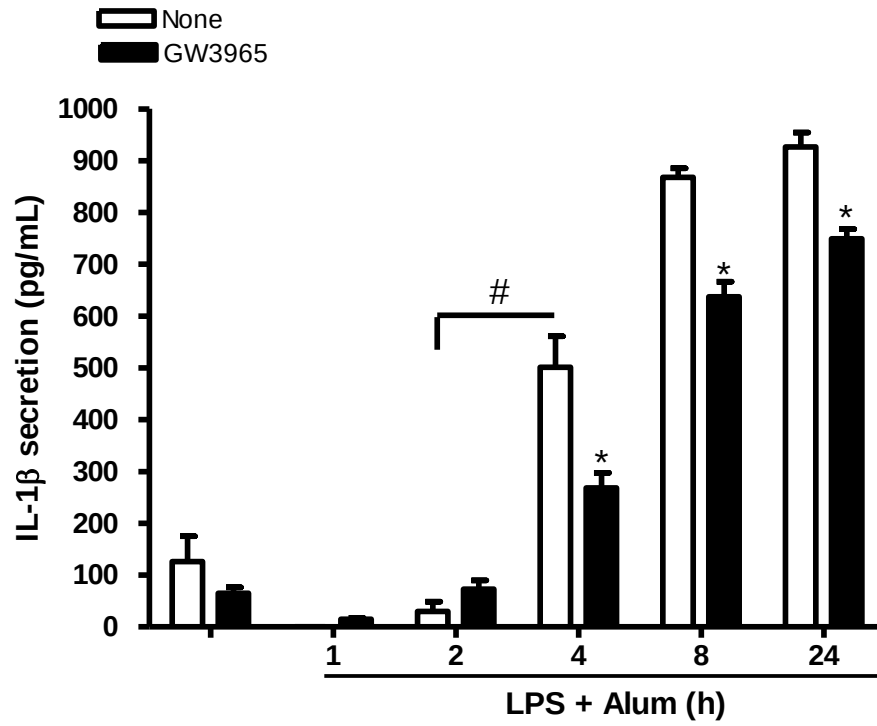
L'activité caspase-1 a été mesurée en utilisant un kit de détection par colorimétrie (Abcam), dans les macrophages THP-1 (A) et les HHDM (B). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart-type et rapportée à la condition sans traitement (DMSO). (* p < 0,05 versus DMSO ; # p < 0,05, Traité vs non-traité). Le niveau d'ARNm de pro-caspase-1 (C), NLRP3 (D), ASC (E) a été également déterminé par RT-qPCR dans des macrophages THP-1 traités avec du LPS et des cristaux d'ALUM en présence ou non de GW3965 (1 μ M). Le niveau d'ARNm a été normalisé par un gène de ménage ALA. (* p < 0,05 versus DMSO, # p < 0,05 traité vs non traité).

Figure 4. Effet de l'agoniste synthétique LXR sur l'activation de l'inflammasome et la stimulation IL-1 in vivo.

Le recrutement de neutrophiles (CD45⁺ CD11b⁺ LY-6G⁺) dans le péritoine chez les différents groupes de souris a été quantifié par cytométrie en flux (A). Le niveau d'ARNm de ABCG1 (B) a été déterminé par RT-qPCR dans les macrophages péritonéaux de souris traitées avec des cristaux d'Alum en présence ou non de GW3965 (40mg/Kg/Jours). Le niveau d'ARNm a été normalisé par des gènes de ménage Cyclo, Hsp90, Nono, β -Gus.

Figure 1

A



B

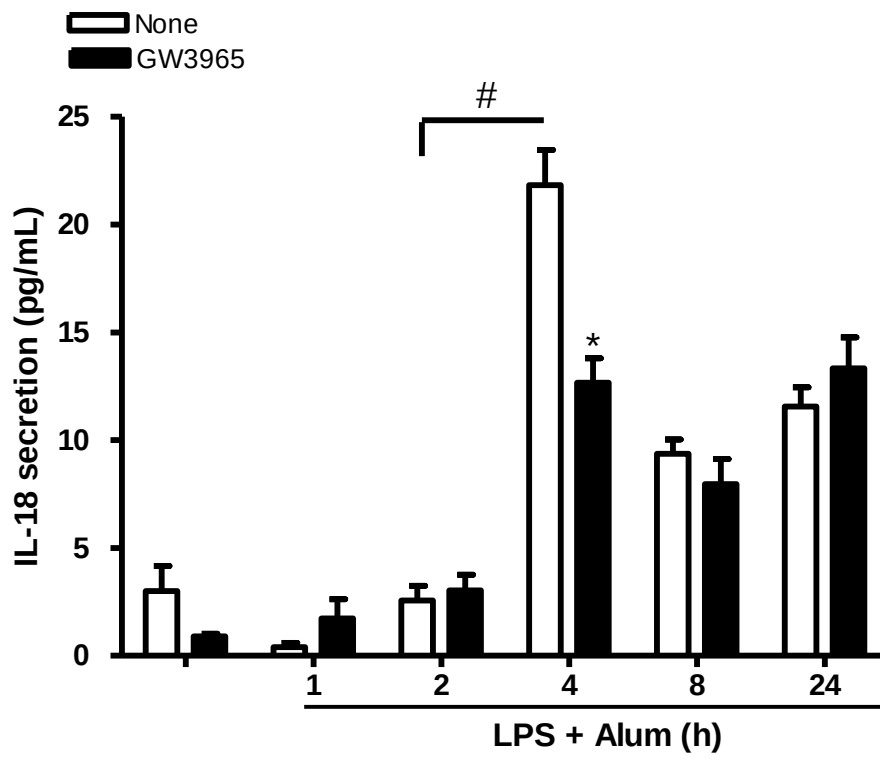


Figure 2

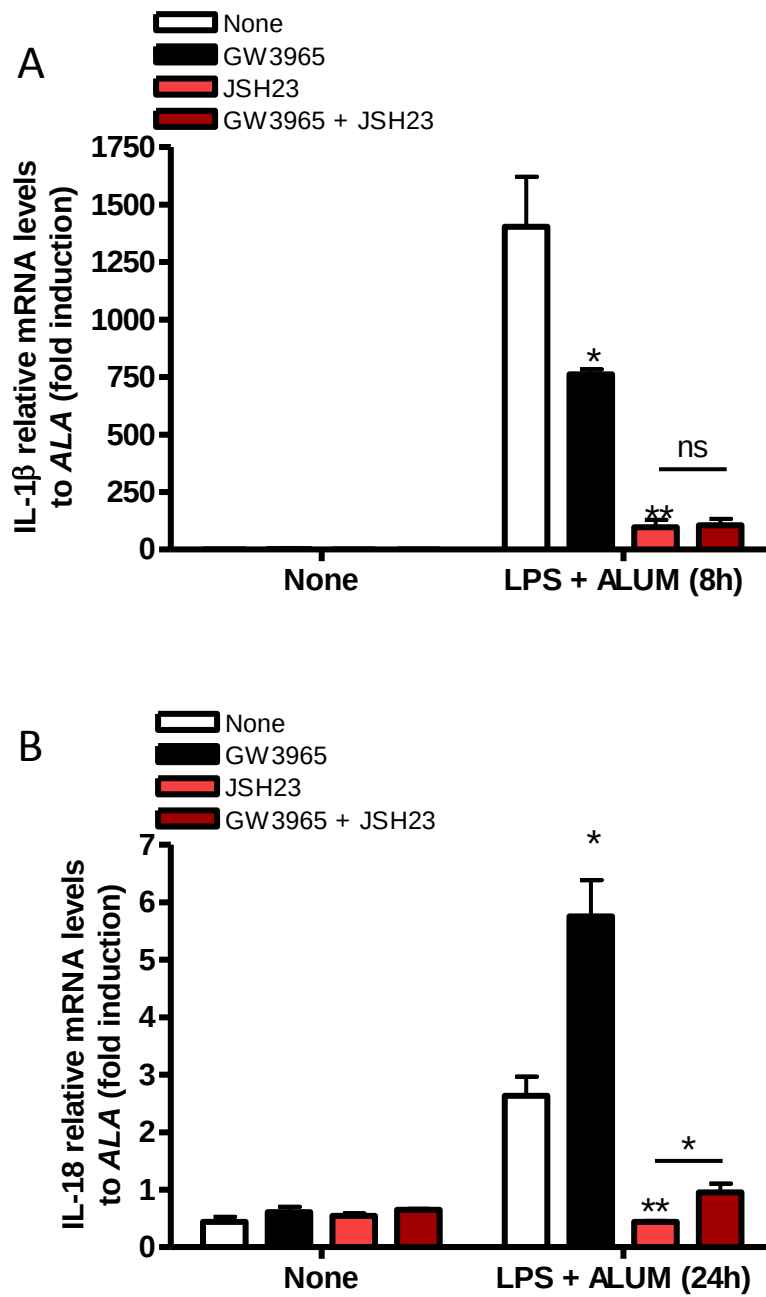


Figure 3

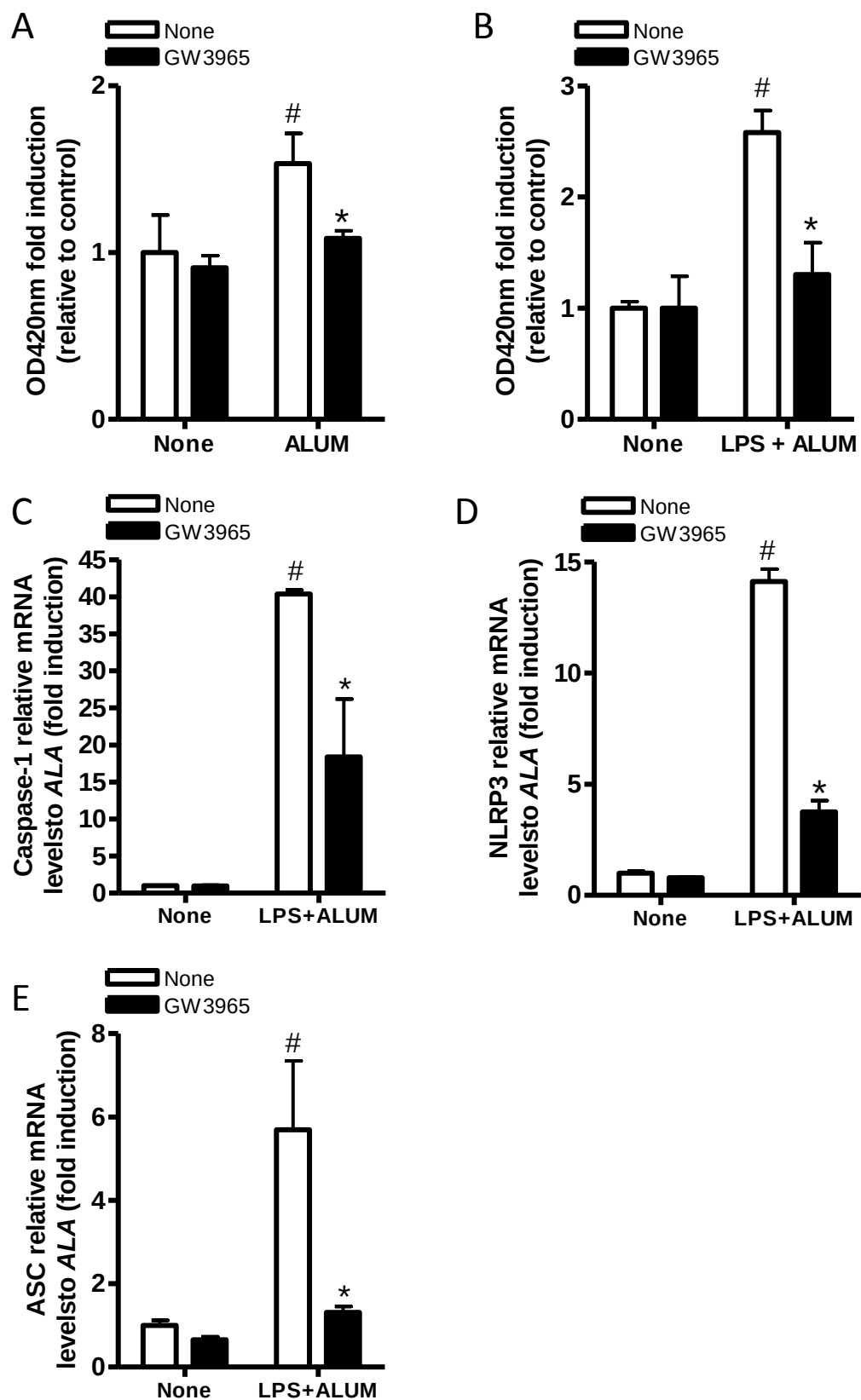
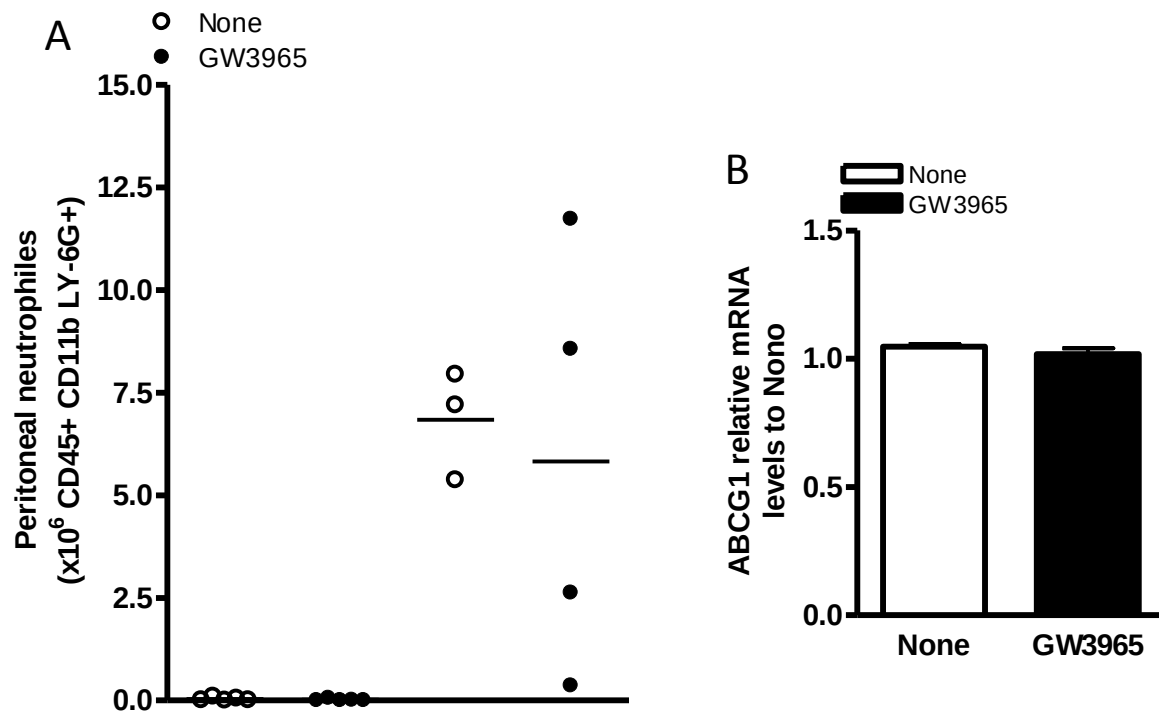


Figure 4



Etude 3 : Macrophagic AEP deficiency impairs NLRP3 inflammasome activation and reduces atherosclerosis development

Alliée à l'inflammation activée par la transformation des macrophages en cellules spumeuses, l'ingestion de **cristaux de cholestérol** présents dès les stades précoces des lésions d'athérome par ces derniers vont donc activer la voie de l'inflammasome **NLRP3** par déstabilisation phagolysosomale et **relargage des cathepsines B et L dans le cytoplasme** (cf Figure 25).

Des souris LDLr^{-/-} transplantées avec de la moelle osseuse **NLRP3^{-/-}** développent **moins de lésions d'athérome**, ce qui démontre l'importance de cette voie et de l'inflammation chronique qu'elle engendre via l'IL-1β et l'IL-18 dans le développement de la maladie.

Nous avons émis l'hypothèse qu'invalider l'AEP, responsable de la maturation et de l'activation des cathepsines reconnues par NLRP3, aurait un effet athéroprotecteur en diminuant l'inflammation NLRP3-dépendante.

L'invalidation de l'AEP peut-elle diminuer l'activation de NLRP3 et ainsi avoir des effets anti inflammatoire et athéroprotecteur?

Stratégie : - modèles de **macrophages humains** THP-1 (lignées) ou primaires (HMDM)

- invalidation par **RNA-interférence** de NLRP3 et AEP ; traitement par LPS (active TLR4/NF-κB), cristaux d'ALUM (active NLRP3)
- mesure de sécrétion d'IL-1β/IL-18 par ELISA, d'expression des acteurs par RT-QPCR, de l'activité Caspase-1 par colorimétrie ; de la maturation des cathepsines et de l'efficacité des KD (knock-down) par western-blot
- inflammation NLRP3/IL-1 *in vivo* : mesure du recrutement intrapéritonéal de neutrophiles
- « étude d'athéro » : greffe de moelle osseuse Aep^{+/+} ou Aep^{-/-} chez des souris LDLr^{-/-} développant l'athérosclérose après un régime riche en cholestérol de 8 semaines. Quantification de la surface des plaques au niveau de la crosse aortique.

I – 1) La sécrétion d'IL-1β/IL-18 par les macrophages humains est bien induite par le traitement LPS/ALUM . Cette induction est abolie par l'inactivation de NLRP3 et réduite par l'inactivation de AEP

La sécrétion NLRP3-dépendante d'IL-1β/IL-18 par le macrophage humain est diminuée par l'inactivation d'AEP

2) (i) L'induction de l'activité caspase-1 par les cristaux est réprimée par l'inhibition de l'AEP – de façon similaire à NLRP3. Cela résulte d'un défaut de clivage des cathepsines B et L démontré dans les macrophages AEP KD.

(ii) L'inactivation d'AEP n'impacte pas directement l'expression des facteurs NF-κB dépendants, même si on observe une diminution de l'expression de *IL-1β*, probablement due à un effet de la baisse de sécrétion de cytokines.

La maturation des cathepsines B et L par l'AEP est une étape importante de l'activation de l'inflammasome NLRP3 par des cristaux dans le macrophage humain – sans cette dernière ils sont moins sensibles au stimulus.

Confirmation in vivo : injection intrapéritonéale de cristaux d'ALUM chez des souris Aep^{+/+} ou Aep^{-/-}

II – Diminution du recrutement de neutrophiles au péritoine chez les souris Aep^{-/-}

Le recrutement de neutrophiles induit par l'injection de cristaux est réduit en l'absence d'AEP

III – Athéro-study. Les souris LDLr^{-/-} développent moins d'athérosclérose lorsqu'elles ont été transplantées avec de la moelle osseuse de souris donneuses Aep^{-/-}

L'expression de l'AEP dans le macrophage a un rôle pro-athérogène chez la souris LDLr^{-/-}

L'inactivation de l'enzyme AEP abolit la maturation des cathepsines B et L, inactivant l'activation de l'inflammasome NLRP3, réduisant l'inflammation et l'athérosclérose

Les résultats de l'étude d'athéro sont à confirmer par une seconde expérience

- Autres propriétés athéroprotectrices de l'inactivation d'AEP : maturation des cathepsines S et K, pro-athérogènes ; rôle de l'activité cathepsine B/L dans l'hydrolyse de la matrice et la déstabilisation de la lésion
- Défaut de maturation de la cathepsine D : affecte négativement l'efflux ABCA1. **La réduction de l'inflammation prime sur l'efflux?**
- Rôle de l'AEP dans la maturation des TLRs intracellulaires peu relevant ici : TLR2/4/5 sont à la membrane plasmique
- L'inactivation d'AEP impossible en thérapie : elle est ubiquitaire, et notamment impliquée dans la fonction rénale

**AEP INVALIDATION IMPAIRS NLRP3 ACTIVATION IN MACROPHAGES AND
REDUCES ATHEROSCLEROSIS DEVELOPMENT**

Alexandre Superville^{1,2,3}, Emmanuel L. Gautier^{1,2,3}, Lucie Poupel^{1,2,3}, Eric Frisdal^{1,2,3},
Flora Saint-Charles^{1,2,3}, Maryse Guerin^{1,2,3}, Philippe Lesnik^{1,2,3} and Wilfried Le Goff^{1,2,3}

1- INSERM, UMR_1166, Research Institute of Cardiovascular Disease, Metabolism and Nutrition, F-75013 Paris, France;

2- Université Pierre et Marie Curie-Paris6, F-75005 Paris, France;

3- Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Pitié-Salpêtrière hospital, F-75013 Paris, France;

Key Words : AEP, human macrophage, inflammasome NLRP3, IL-1 β , atherosclerosis

*Address correspondence to:

Wilfried Le Goff, Ph.D.

INSERM UMR1166, Team 4 : Integrative Biology of Atherosclerosis

Hôpital de la Pitié

Pavillon Benjamin Delessert

83, boulevard de l'Hôpital

75651 Paris Cedex 13

France

Tel: +33 1 42 17 79 75

Fax: +33 1 84 82 72 68

email: wilfried.le_goff@upmc.fr

Abstract

Objective. Cholesterol crystals, present in atherosclerotic lesions, are internalized in arterial macrophages and lead to intracellular phagolysosomes disruption. Through this mechanism, cathepsins B and L are released in the cytoplasm from the vesicle membrane and activate NLRP3 inflammasome leading to pro-atherogenic IL-1 β and IL-18 secretions through Caspase-1 enzyme activation. Reconstitution of irradiated *Ldl-r^{-/-}* mice with *Nlrp3* knock-out bone-marrow showed a reduced atheroma lesions development following a high-cholesterol diet, demonstrating the pro-atherogenic role of macrophage Nlrp3 inflammasome. We hypothesized that inhibition of asparagin endopeptidase AEP, the enzyme responsible for cathepsin B and L maturation, would be atheroprotective by preventing NLRP3 inflammasome activation.

Methods and Results. Human THP-1 and primary macrophages (HMDM), primed with PMA or LPS respectively, were treated with Alum crystals - analogous to cholesterol crystals, which increased secretion of both IL-1 β and IL-18 by human macrophages. Such stimulation was not observed in *NLRP3* knock-down cells and was markedly decreased in *AEP* KD macrophages. Indeed, silencing of *AEP* expression altered cleavage of inactive cathepsin B and L precursors into active forms and led to a concomitant decrease in Caspase-1 activity stimulation upon treatment with Alum crystals. IL-1-dependent intraperitoneal accumulation of neutrophils has been previously used as an *in vivo* assay for inflammasome activation. Neutrophil recruitment to the peritoneum following Alum crystal injection was markedly reduced in *Aep^{-/-}* mice as compared with C57BL/6 littermates, thus confirming the implication of *AEP* in NLRP3 inflammasome activation *in vivo*. Finally, bone marrow transplantation from *Aep^{-/-}* mice into recipient *Ldlr^{-/-}* mice decreased atherosclerosis development upon high cholesterol diet.

Conclusion. Our findings demonstrate that i) *AEP* processing of cathepsins plays a pivotal role in NLRP3 inflammasome activation in human macrophages ii) *AEP* plays a major role in NLRP3 inflammasome activation and IL-1 inflammation triggering *in vivo* and finally iii) *AEP* activity in macrophages is deleterious for inflammation-driven atheroprotection in *LDL-R^{-/-}* mice

Introduction

Atherosclerosis had been considered as a cholesterol accumulation in the arterial walls. This point of view has evolved since then, and the driving role of inflammation in atheroma plaque formation and progression has been evidenced and extensively studied¹. Blood monocyte infiltration and differentiation into macrophages is thus the critical initiation step of atherosclerosis², cytokine secretion by those immune cells into the arterial wall being a pre-requisite to disease progression and plaque evolution¹.

Factors that incite and maintain inflammation in the intimal compartment are not yet completely identified. As the disease develops independently of any pathogen, endogenous substances linked to cholesterol and lipoprotein metabolism do initiate inflammation in macrophages³. Notably, oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) are recognized and internalized by Scavenger Receptors (SRs) and Toll-Like Receptors (TLRs) that incidentally activate inflammatory transcription factor NF- κ B and cytokine gene expression⁴. More recently, cholesterol crystallization within the plaque were shown as occurring during atherosclerosis progression and cholesterol crystals detected in early stages of the disease⁵.

Indeed, cholesterol crystals have been shown to be erratically ingested by human macrophages, causing the disruption of phagolysosome membrane by mechanic constraints and the leakage of its components in the cytoplasm. Macrophage inflammasome NLRP3 (nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing (NLR) family, pyrin domain containing 3), a multi-proteic complex involved in inflammation triggering, senses vesicular stress by recognizing organelle membrane proteins cathepsins B and L. Once activated, NLRP3 cleaves Caspase-1 enzyme precursor into active form, which is itself responsible of pro-inflammatory IL-1 β and IL-18 maturation into their secretable forms⁶. This cytokine secretion depends however of another inflammatory signal : induction of IL-1 β mRNA via stimulation of NF- κ B activating pathways is a pre-requisite for pro-IL-1 β expression in the cytoplasm, and hence global inflammasome activation⁷.

In vitro, in vivo as well as clinical data show that IL-1 β and IL-18 are the two most pro-atherogenic cytokines^{8,9}. A clinical trial (CANTOS) is currently testing the ability of an anti-IL-1 β molecule, canakinumab, to inhibit atherosclerosis development and MCV incidence¹⁰. As NF- κ B is implicated in both inflammation triggering and cell survival¹¹, NLRP3 specific targeting represent a promising strategy to decrease plaque inflammation. Indeed, it would specifically impair the very

deleterious IL-1 β and IL-18 secretion. Eicke Latz et al reported the successful decrease of atheroma lesion formation in LDL-R^{-/-} mice by inactivating NLRP3 or IL-1 α/β genes specifically in myeloid lineage with a bone-marrow transplant. This evidenced for the first time the pivotal role of NLRP3 inflammasome and IL-1-mediated inflammation in driving atheroma plaque formation⁵.

Asparaginyl endopeptidase (AEP) is a cysteine-specific asparagin endopeptidase present within lysosome and endosomes, involved in cathepsin processing, notably cathepsin B and L¹². Moreover, lysosomal dysfunction in macrophages is considered as atherogenic^{13,14}. As AEP has also been recently associated with unstable plaque phenotype in human¹⁵, we hypothesized that AEP role in catalyzing cathepsin maturation could increase IL-1 inflammation in atherosclerosis plaque and worsen the disease.

We highlighted that AEP invalidation impairs cathepsin B and L maturation and concomitant NLRP3 activation and IL-1 β /IL-18 secretion in macrophages, resulting in a decreased IL-1-driven inflammation in mice. As a consequence, myeloid-cell specific AEP deletion decreased atherosclerosis development in LDL-R^{-/-} mice models.

Material & Methods

Primary culture of human macrophages.

Monocytes were isolated from the blood of individual healthy normolipidemic donors (Etablissement Français du Sang, EFS) by Ficoll gradients (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) and subsequently differentiated into human macrophages (HMDM) by adhesion on plastic Primaria plates (Falcon) over a period of 10 days of culture in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% heat-inactivated human serum, 2 mmol/L glutamine, 100 µg/mL penicillin/streptomycin, and either 20 ng/mL human macrophage colony-stimulating factor (hM-CSF) or 20ng/mL human interleukin 4 (IL-4) or 25ng/mL human interferon gamma (IFN γ) and 20 ng/mL human tumor necrosis factor alpha (TNF α) for M0, M1 and M2 polarization, respectively.

Human THP-1 macrophages.

Human THP-1 monocytic cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and maintained in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 2mmol/L glutamine and 100U/mL penicillin/streptomycin at 37°C in 5% CO₂. THP-1 were differentiated into macrophage-like cells with 50ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 48h.

Mice, bone marrow transplantation and atherosclerosis study design

Ldl-r^{-/-} mice on the C57BL/6 background were obtained from Jackson laboratories. *AEP*^{-/-} mice were on a C57BL/6 background¹⁶. Four weeks-old female *Ldl-r*^{-/-} mice were subjected to a 10 Gray lethal total body irradiation as previously described¹⁷ and were injected intravenously with 5 x 10⁶ bone marrow cells from either *AEP*^{+/+} or *AEP*^{-/-} mice. After 4 weeks of recovery, mice were fed a high cholesterol diet consisting of 1% cholesterol for 8 weeks. All animal procedures were performed with accreditation from the French government and under strict compliance with Animal Welfare Regulations.

RNA interference (RNAi)-mediated silencing using small interference (si)RNA.

Transient knock-down (KD) of AEP in human macrophages was obtained by application of siRNA oligonucleotides (Dharmacon) targeted to the cDNA sequence of the human *AEP* ([NM_005606.6](#)). The sequences of the siRNA were indicated in supplemental Table 1. HMDM and THP-1

macrophages were transfected with 50 nM control siRNA (Dharmacon) or AEP siRNA using lipofectamine RNAiMax (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. After a 24-h incubation at 37°C, control and knocked down cells were cholesterol loaded and labelled with [³H]cholesterol for cholesterol efflux experiments. THP-1 clones stably knocked down (SKD) for NLRP3 were purchased from Invivogen. NLRP3 SKD clones were maintained under hygrogold (Invivogen) selection.

RNA extraction, retrotranscription, real-time quantitative PCR

Total RNA from cell culture or tissues were extracted using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) or TRIzol reagents (Euromedex), respectively, according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription and real-time qPCR using a LightCycler LC480 (Roche) were performed as previously described¹⁸. Expression of mRNA levels was normalized to human non-POU domain containing, octamer-binding housekeeping gene (*NONO*), human alanin (*ALA*), human α -tubulin (*TUBA*) and human heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1 (*HSP90AB1*), human hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (*HPRT1*), and human 18S ribosomal RNA (*18S rRNA*). Data were expressed as a fold change in mRNA expression relative to control values.

Western blotting analysis

Cell proteins were extracted using M-Per extraction reagent (Pierce) containing protease inhibitors and were subsequently separated on a 4-12% Bis-Tris gel (Life Technologies). Proteins (25 to 50 μ g per lane) were transferred to nitrocellulose and the membrane was blocked with Casein blocker solution for 1h. Membranes were then incubated overnight at 4°C with either a mouse anti-CathepsinB (ab58802, abcam), or a mouse anti-CathepsinL (ab6314, abcam), or a rabbit anti-AEP (ab125286, Abcam), or a mouse anti-NLRP3 (AG-20B-0014, AdipoGen) and revealed with either IRDye 800CW-conjugated goat anti-rabbit (Li-Cor) or IRDye 700CW-conjugated sheep anti-mouse (Li-Cor) at 1:10000 for 1 hour. Detection was performed using an Odyssey infrared imaging system (Li-Cor).

Caspase-1 activity assay

A colorimetric detection kit was purchased from Abcam (ab39470). Protein extraction and activity measurement were performed according to the manufacturer's instruction. YVAD-substrat, containing a

Caspase-1 recognized protein sequence (Tyr-Val-Ala-Asp) and labeled with a P-nitroanilide chromophore was added to each sample. Two hours later optic density at 420nm (OD_{420nm}) was measured.

ELISA

Human IL-1 β and IL-18 were quantified in culture media from human macrophages using commercial enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) according to the manufacturer's protocols (eBioscience).

Peritoneal neutrophil recruitment

Mice were injected intraperitoneally with 2 mg of cholesterol crystals in 200 μ L of PBS or with PBS alone. After 15 h, peritoneal cells were recovered with a peritoneal washing and stained with fluorescently conjugated monoclonal antibodies against CD45, CD11b and Ly-6G. The absolute number of neutrophils (Ly-6G-positive/CD11b-positive) was determined by flow cytometry.

Atherostudy

After a 8-week high cholesterol diet, blood samples were collected in tubes by retroorbital bleeding under isoflurane anesthesia. Mice were euthanized and perfused intracardially with formalin. Hearts were embedded in OTC (Optimal Cutting Temperature) (Richard-Allan Scientific) medium, frozen, and serially sectioned through the aorta from the origins of the aortic valve leaflets; every single section (10 μ m thick) throughout the aortic sinus (800 mm) was collected. Quantification of average lesion area was performed from 12 sections stained with Oil-Red-O. Serum cholesterol levels were determined by colorimetric assay, and blood leucocyte were stained with fluorescently conjugated monoclonal antibodies against CD45, CD115, Ly-6G and LY-6C (refs). Absolute numbers of neutrophils (Ly-6G-positive/CD115-negative/CD45-positive), of Ly-6C high monocytes Ly-6C-high/CD115-positive/CD45-positive) of Ly-6C-low monocytes (Ly-6C-low/CD115-positive/CD45-positive) were determined by flow cytometry³⁹.

Statistical analysis.

Data are shown as mean $\pm$ SEM. Experiments were performed in triplicate. Comparisons of 2 groups were performed by a 2-tailed Student's *t* test for in vitro study and by a Mann-Whitney test for in vivo study. All statistical analyses were performed using Prism software from GraphPad (San Diego, CA, USA)

Results

RNAi-mediated silencing of AEP reduces NLRP3-dependent IL-1 β and IL-18 secretion by ALUM crystal treatment in human macrophages

Transcriptional priming of specific inflammasome cascade genes by classic TLR inflammatory stimuli such as LPS is needed to “set the stage” for inflammasome activation⁶. We thus detected robust expression of IL-1 β , IL-18, NLRP3, Caspase-1, and AEP in inflammatory primary macrophages primed with LPS (Supplementary figure 1). NLRP3 inflammasome recognizes various inflammatory stimuli ; in this context crystalline inflammasome activators are able to activate NLRP3 through phagolysosomal destabilization^{19,20}. We used ALUM crystals treatment, specific NLRP3 inflammasome activators. We showed on figure 1 that the 24h incubation of PMA-treated THP-1 macrophage and LPS-treated HMDM with ALUM crystals is able to induce significant secretion of NLRP3-regulated IL-1 β and IL-18 cytokines (Figure 1B, 1C ; ~15-20 fold increase, $p < 0.01$).

This strong induction of IL-1 β and IL-18 secretion by macrophages upon ALUM crystals treatment was completely abolished in NLRP3 SKD THP-1, confirming the specific activation of NLRP3 by ALUM crystals in human macrophages.

We then successfully knocked down AEP protein expression in primary macrophages with an AEP targeting siRNA treatment (Figure 1D) and quantified the cytokine secretions. The induction of IL-1 β and IL-18 secretion by LPS/ALUM induction cocktail treatment (Figure 1E, 1F : > 20-fold increase ; $p < 0.001$) was significantly lowered by AEP knock-down (KD) (Figure 1E, IL-1 β : - 45% secretion, $p < 0.01$; figure 1F, IL-18 : - 45% secretion, $p < 0.05$). As AEP inhibition is partial, a residual stimulation of IL-1 β and IL-18 by ALUM crystals was still observed (Figure 1E, 1F : > 10-fold increase, $p < 0.05$). Those results were confirmed in THP-1 silenced for AEP treated with ALUM crystals (Supplementary figure 2A, 1B).

Taken together, those results suggested that AEP is required for NLRP3 dependent secretion of IL-1 β and IL-18 by human macrophages..

RNAi-mediated silencing of NLRP3 and AEP abolishes Caspase-1 activity stimulation by ALUM crystal treatment in human macrophages, as a result of impaired cathepsin B and L maturation

To test if the reduction of IL-1 β and IL-18 secretion results from a decreased NLRP3 inflammasome activation, we then measured caspase-1 in AEP KD macrophages.

Treatment of both PMA-primed THP-1 macrophages and LPS-primed primary macrophages by ALUM crystals increased significantly intracellular caspase-1 activity (Figure 2A-B, supplementary figure 2C : 2-fold increase, $p < 0.01$). This activation was abolished by the silencing of NLRP3 in THP-1 (Figure 2A) as well as AEP in HMDM (Figure 2B). This latter result was also confirmed in AEP KD THP-1 (Supplementary figure 2C). Taken together, we confirmed that NLRP3 is necessary for caspase-1 activation and that AEP activity is a pre-requisite for NLRP3-dependant Caspase-1 cleavage and activation by ALUM crystal treatment.

To note that reduced Caspase-1 activity in NLRP3 SKD or AEP KD macrophages is independent of any effect on Caspase-1 expression as Caspase-1 mRNA levels were not altered in those cells (Figure 2C-D, supplementary figure 2D).

To validate the working hypothesis that abolition of stimulation of caspase-1 by AEP silencing is caused by an impaired cathepsin B and L processing, cathepsin B and L maturation was assessed in primary macrophages by western blot. In AEP KD macrophages an accumulation of procathepsinB and procathepsin L, cathepsin precursors was detected as compared to Ctrl HMDM (Figure 2E). Moreover, active cathepsin B was only detectable in control macrophages.

We thus confirmed our primary hypothesis that in human macrophages AEP deficiency impairs cathepsin maturation. Leakage of procathepsin in the cytoplasm upon crystal ingestion is not able to activate NLRP3-dependant activating cleavage of caspase-1.

AEP silencing does not impact directly any NF- κ B target-gene expression, except IL-1 β in LPS and ALUM crystal stimulated human macrophages

To determine if other mechanisms contribute to NLRP3 activation, we investigated if the enzyme could play an additional role in TLR and NF- κ B related priming of inflammatory genes – necessary for NLRP3 inflammasome activation. Indeed, a previous study reported showed that AEP has also an important role in endosomal TLR activation and subsequent signalization in dendritic cells

Expression of *IL-1 β* , *IL-18*, NF- κ B-targeted cytokine gene *TNF α* , *IL-6*, *MCP-1* and *IL-10*, genes and *NLRP3* gene mRNA levels were detected by a RT-QPCR assay in ALUM crystals treated LPS primed HMDM (Figure 3).

Among the different gene studied, only the expression of IL-1 β was impacted by AEP silencing whereas that of NF- κ B-target genes was not altered (Figure 3). We concluded that, rather than being a direct regulation of inflammatory signaling pathways, this is specific effect of IL-1 β secretion decrease by the mechanism evidenced previously (Figure 1 and 2) ; the lower quantity of IL-1 β in the media being less capable of activating IL-1R and its own gene expression .

In vivo AEP deficiency decreases neutrophile peritoneal recruitment, reluctant of IL-1 activation, upon ALUM crystal injection

We then tested *in vivo* the mechanism just evidenced before. As IL-1 β has a key role in neutrophile recruitment –an immune cell which can also accumulate in the plaque²¹, we used intraperitoneal accumulation of neutrophiles following ALUM crystals injection in mice as an assay for the *in vivo* inflammasome NLRP3 activation and IL-1 production^{5,20,22}.

Analysis of the gene expression in WT and AEP^{-/-} bone marrow-derived macrophages, coherently with what was observed in human macrophages, revealed that ablation of *Aep* gene expression causes a strong decrease of IL-1 β mRNA levels ; IL-18 and NLRP3 being unaffected (Figure 4A : AEP : -98%, p<0.01 ; IL-1 β : - 90%, p<0.01).

We then found that intraperitoneal ALUM crystals injection induced a marked induction of neutrophile influx into the peritoneum (Figure 4B), validating the strong stimulation of NLRP3 inflammasome and IL-1 β /IL-18 secretion by ALUM crystals. Then, as expected, the absolute number of recruited neutrophile was significantly lower in mice lacking AEP gene (Figure 4B : -40% ; p<0.01).

A similar reduction of neutrophile recruitment to the peritoneal cavity following crystal treatment was reported in Cathepsin B, Cathepsin L, NLRP3, ASC and Caspase-1 defiscient mice, whereas it was almost completely abolished in IL-1R and IL-1 β knock out mice⁶. Those results confirm that AEP invalidation markedly reduces ALUM crystal triggering of NLRP3 inflammasome-related IL-1 secretion *in vivo*.

More intriguingly, we reported that recruited peritoneal neutrophil from AEP-deficient mice exhibited a markedly decreased LY-6G specific marker at the cell surface (Supplementary figure 3A, 3B : -50%, $p < 0.001$).

AEP invalidation in myeloid lineage decreases cholesterolemia, blood neutrophils, LY-6^{high} monocytes and atherosclerosis development in LDLr^{-/-} mice.

To study the impact of invalidation of *Aep* in macrophages on atheroma plaque development *in vivo*, bone-marrow extracted from wild-type or AEP-deficient (AEP^{-/-}) donor mice was transplanted in atherosclerosis prone LDLr^{-/-} recipient mice.

Quantification of *Aep* mRNA levels in peritoneal resident macrophages confirmed chimaerism in our transplanted animals. Indeed *Aep* expression was barely detectable in peritoneal macrophages from BMT Aep^{-/-} → LDLr^{-/-} mice (Figure 5A, -95%, $p < 0.01$).

Following a 8 weeks long high cholesterol diet, significant differences in blood cholesterol levels were observed between the different groups. Indeed, AEP invalidation in myeloid cells decreased diet-induced hypercholesterolemia (Figure 5B, plasma total cholesterol and free cholesterol -10%, $p < 0.05$). In addition, mice reconstituted with AEP-deficient bone marrow showed a significantly lower number of plasma neutrophils (Figure 5C, -35%, $p < 0.05$) and LY-6C^{high} monocytes (Figure 5C, -25%, $p < 0.05$). Those two populations are described as favoring inflammation and atherosclerosis^{21,23,24}. Finally, mice reconstituted with AEP^{-/-} bone marrow-derived cells showed decreased development of atherosclerosis (Figure 4D ; Figure 4E, - 30% lesion area (%), $p < 0.05$; Figure 4F, -25% lesion area (μm^2), $p = 0.1$), even though more animals are needed to reach statistical significance when expressed in lesion area.

In conclusion, AEP activity in myeloid lineage and more specifically macrophages has a deleterious effect in atherosclerosis development.

Discussion

Activation of NLRP3 inflammasome by crystalline component mechanism is a newly discovered actor who plays a preponderant role in inflammation triggering necessary for atherosclerosis progression. In this study, silencing of asparagine endopeptidase AEP impaired cathepsin B and L maturation. Both are detected by NLRP3 multiproteic complex sensor after phagolysosomal membrane rupture following crystal ingestion. Indeed AEP inactivation prevents IL-1-converting Caspase-1 activation by ALUM crystals and markedly decreases IL-1 β and IL-18 secretion by human macrophages. In vivo, AEP activity has been confirmed as an important IL-1 inflammation modulator upon crystal treatment. Its inactivation in myeloid lineage of LDLr^{-/-} mice decreases hypercholesterolemia, pro-atherogenic blood neutrophils and LY-6C^{high} monocytes and ultimately atherosclerosis development.

If the strong link existing between inflammation and atherosclerosis can no longer be questioned, the implication of NLRP3 inflammasome in the progression of atherosclerosis is still a matter of debate. Indeed, apoE^{-/-} mice transplanted with neither NLRP3^{-/-}, caspase-1^{-/-} and ASC^{-/-} bone marrow showed any decrease in lesion size nor change in plaque quality²⁵. However the authors reported oxidized lipids and cholesterol crystals within atheroma plaque. Another study in apoE^{-/-} mice reported that inhibition of NLRP3 signaling by lentivirus-mediated RNA interference reduces atherosclerosis development and increases plaque stability²⁶. The impact of NLRP3 inflammasome was however confirmed in LDLr^{-/-} mice by Latz et al, as stated before⁵. In our study, we successfully linked AEP activity and cathepsin maturation to NLRP3 activation. The reported atheroprotective effect of AEP invalidation sides with Latz et al's results. However it is necessary to assess circulating concentration of IL-18 in BMT Aep^{-/-} $\rightarrow$ LDLr^{-/-} mice in order to illustrate NLRP3 impairment in transplanted mice. A NLRP3 independent atheroprotective effect of AEP inactivation is still possible. For example it is unknown if atherogenic cathepsin S²⁷ or K²⁸ maturation is mediated by AEP.

Interestingly, we found that mice transplanted with AEP^{-/-} bone marrow display a decreased hypercholesterolemia, that has not been reported before. Indeed, no significant change in blood cholesterol levels was detected in BMT NLRP3^{-/-}, ASC^{-/-} or IL-1 α/β ^{-/-} $\rightarrow$ LDLr^{-/-} mice by Latz et al., contrasting with our results⁵. An explanation for this discrepancy would be the difference of diet employed in the two studies : we used a 1% cholesterol diet devoid of fat, while a Western diet with 21% fat and 0.15% cholesterol was favored in the latter study. This point is critical as NLRP3 inflammasome is also

inducible by saturated fatty acid palmitate with a cathepsin-independent pathway²⁹. Also, NLRP3 independent IL-1 α maturation and secretion happens to be triggered by oleic fatty acid³⁰. We however cannot discard the hypothesis of a NLRP3 independent impact of AEP silencing on cholesterolemia.

A decrease in blood neutrophils and LY-6C^{high} monocytes was also observed in the present study, both being an inflammatory and atherogenic population of leucocytes. Those findings are quite surprising as whole body AEP^{-/-} mice develop a leucocytosis and more particularly a monocytosis³¹. However circulating neutrophils have been found as correlated with plaque size in apoE^{-/-} mice³². It is also coherent with previous data on systemic cholesterol as hypercholesterolemia has been linked with myeloid cell proliferation, particularly monocytosis and neutrophilia³³. The effect observed here would be specific of the AEP invalidation in myeloid lineage. Also, the marked decrease in blood neutrophils is coherent with the diminished NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β secretion, as well as neutrophil recruitment to the peritoneal cavity upon crystal injection^{5,20,22}. However, it is also possible that blood neutrophils account for recruitment to another compartment or organ was increased in BMT AEP^{-/-}, explaining the decrease of neutrophils observed in the blood.

We then reported that AEP deficiency in myeloid cells not only diminishes neutrophil recruitment, but also decreases by half expression of the LY-6G marker at their cell membrane. This is very relevant in our model and pathology, because LY-6G has been very recently proven as reducing monocyte capacity to respond to chemotactic and to entry in tissues by an inhibitory binding of β_2 integrins³⁴. If such a mechanism also occurs in neutrophils, we can speculate that decreased expression of neutrophil LY-6G would increase neutrophil recruitment in the plaque. However it is hard to know whether or not LY-6G expression at neutrophil cell surface is directly dependant of AEP expression in those cells, which is weakly expressed as compared to macrophage, or is an indirect effect of AEP^{-/-} phenotype.

It is difficult to assume that global inactivation of AEP is a potential therapeutic option against atherosclerosis in particular, because of the broad whole-body expression of the enzyme and its implication in maturing cathepsin, a very large protein family with very heterogeneous function. Notably, whole body AEP deficiency in mice has very deleterious side effects in kidney homeostasis and particularly protein catabolism, notably by accumulating low-molecular weight proteins in lysosomes³⁵. On the other hand, AEP activity increase has been associated with a broad spectrum of

diseases, from Alzheimer's³⁶ disease to cancer³⁷. It is then important to sustain AEP inactivation in macrophages to target its particular atherogenic properties.

Overall, this study concluded about the atherogenic role of asparaginyl endopeptidase as being an upstream regulator of NLRP3 inflammasome cascade activation. It is also clearly supported by the reported increased AEP activity and active cathepsin L found in atherosclerotic plaques¹⁵. However we cannot rule out the hypothesis of a Caspase-1-independent IL-1 β secretion³⁸, as IL-1 β secretion induction by crystals reduction by AEP silencing is partially reduced, whereas Caspase-1 activity is completely abolished.

Roles of AEP in macrophage and lysosomal metabolism might be as diverse as its targets, but we provide evidence that its pro-inflammatory role, notably through NLRP3 inflammasome activation, presently is deleterious in the context of atherosclerosis and that its inactivation might be beneficial in cardiovascular disease.

Some work still has to be done to complete this study : we first need to assess systemic IL-18 as well as to assess Caspase-1 activation in aortas from BMT Aep^{-/-} $\rightarrow$ LDLr^{-/-} versus BMT WT $\rightarrow$ LDLr^{-/-} mice to confirm the impact on NLRP3 activation.

References.

1. Libby, Peter. "Inflammation in Atherosclerosis." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32, no. 9 (September 2012): 2045–51.
2. Smith, J D, E Trogan, M Ginsberg, C Grigaux, J Tian, and M Miyata. "Decreased Atherosclerosis in Mice Deficient in Both Macrophage Colony-Stimulating Factor (op) and Apolipoprotein E." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, no. 18 (August 29, 1995): 8264–68.
3. Wright, S. D., C. Burton, M. Hernandez, H. Hassing, J. Montenegro, S. Mundt, S. Patel, et al. "Infectious Agents Are Not Necessary for Murine Atherogenesis." *The Journal of Experimental Medicine* 191, no. 8 (April 17, 2000): 1437–42.
4. Stewart, Cameron R, Lynda M Stuart, Kim Wilkinson, Janine M van Gils, Jiusheng Deng, Annett Halle, Katey J Rayner, et al. "CD36 Ligands Promote Sterile Inflammation through Assembly of a Toll-like Receptor 4 and 6 Heterodimer." *Nature Immunology* 11, no. 2 (February 2010): 155–61.
5. Duewell, Peter, Hajime Kono, Katey J Rayner, Cherilyn M Sirois, Gregory Vladimer, Franz G Bauernfeind, George S Abela, et al. "NLRP3 Inflammasomes Are Required for Atherogenesis and Activated by Cholesterol Crystals." *Nature* 464, no. 7293 (April 29, 2010): 1357–61.
6. Rajamäki, Kristiina, Jani Lappalainen, Katariina Oörni, Elina Välimäki, Sampsa Matikainen, Petri T. Kovanen, and Kari K. Eklund. "Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation." *PloS One* 5, no. 7 (2010): e11765.
7. Bauernfeind, Franz G., Gabor Horvath, Andrea Stutz, Emad S. Alnemri, Kelly MacDonald, David Speert, Teresa Fernandes-Alnemri, et al. "Cutting Edge: NF-kappaB Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 183, no. 2 (July 15, 2009): 787–91.
8. Galea, J., J. Armstrong, P. Gadsdon, H. Holden, S. E. Francis, and C. M. Holt. "Interleukin-1 Beta in Coronary Arteries of Patients with Ischemic Heart Disease." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 16, no. 8 (August 1996): 1000–1006.
9. Sedimbi, Saikiran K., Thomas Hägglöf, and Mikael C. I. Karlsson. "IL-18 in Inflammatory and Autoimmune Disease." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 70, no. 24 (December 2013): 4795–4808.

10. Ridker, Paul M., Campbell P. Howard, Verena Walter, Brendan Everett, Peter Libby, Johannes Hensen, Tom Thuren, and CANTOS Pilot Investigative Group. "Effects of Interleukin-1 β Inhibition with Canakinumab on Hemoglobin A1c, Lipids, C-Reactive Protein, Interleukin-6, and Fibrinogen: A Phase IIb Randomized, Placebo-Controlled Trial." *Circulation* 126, no. 23 (December 4, 2012): 2739–48.
11. Baker, Rebecca G., Matthew S. Hayden, and Sankar Ghosh. "NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease." *Cell Metabolism* 13, no. 1 (January 5, 2011): 11–22.
12. Shirahama-Noda, Kanae, Akitsugu Yamamoto, Kazushi Sugihara, Noriyoshi Hashimoto, Masahide Asano, Mikio Nishimura, and Ikuko Hara-Nishimura. "Biosynthetic Processing of Cathepsins and Lysosomal Degradation Are Abolished in Asparaginyl Endopeptidase-Deficient Mice." *The Journal of Biological Chemistry* 278, no. 35 (August 29, 2003): 33194–99.
13. Jerome, W. Gray. "Advanced Atherosclerotic Foam Cell Formation Has Features of an Acquired Lysosomal Storage Disorder." *Rejuvenation Research* 9, no. 2 (2006): 245–55.
14. Jerome, W. Gray. "Lysosomes, Cholesterol and Atherosclerosis." *Clinical Lipidology* 5, no. 6 (December 1, 2010): 853–65.
15. Mattock, K. L., P. J. Gough, J. Humphries, K. Burnand, L. Patel, K. E. Suckling, F. Cuello, et al. "Legumain and Cathepsin-L Expression in Human Unstable Carotid Plaque." *Atherosclerosis* 208, no. 1 (January 2010): 83–89.
16. Sepulveda, Fernando E., Sophia Maschalidi, Renaud Colisson, Lea Heslop, Cristina Ghirelli, Emna Sakka, Ana-Maria Lennon-Duménil, Sebastian Amigorena, Lucien Cabanie, and Bénédicte Manoury. "Critical Role for Asparagine Endopeptidase in Endocytic Toll-like Receptor Signaling in Dendritic Cells." *Immunity* 31, no. 5 (November 20, 2009): 737–48. doi:10.1016/j.immuni.2009.09.013.
17. Gautier, Emmanuel L., Thierry Huby, Betty Ouzilleau, Chantal Doucet, Flora Saint-Charles, Guilaine Gremy, M. John Chapman, and Philippe Lesnik. "Enhanced Immune System Activation and Arterial Inflammation Accelerates Atherosclerosis in Lupus-Prone Mice." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27, no. 7 (July 2007): 1625–31. doi:10.1161/ATVBAHA.107.142430.
18. Larrede, Sandra, Carmel M Quinn, Wendy Jessup, Eric Frisdal, Maryline Olivier, Victor Hsieh, Mi-Jung Kim, et al. "Stimulation of Cholesterol Efflux by LXR Agonists in Cholesterol-Loaded Human Macrophages Is ABCA1-Dependent but ABCG1-Independent." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29, no. 11 (November 2009): 1930–36. doi:10.1161/ATVBAHA.109.194548.

19. Hornung, Veit, Franz Bauernfeind, Annett Halle, Eivind O. Samstad, Hajime Kono, Kenneth L. Rock, Katherine A. Fitzgerald, and Eicke Latz. "Silica Crystals and Aluminum Salts Activate the NALP3 Inflammasome through Phagosomal Destabilization." *Nature Immunology* 9, no. 8 (August 2008): 847–56.
20. Martinon, Fabio, Virginie Pétrilli, Annick Mayor, Aubry Tardivel, and Jürg Tschopp. "Gout-Associated Uric Acid Crystals Activate the NALP3 Inflammasome." *Nature* 440, no. 7081 (March 9, 2006): 237–41.
21. Soehnlein, Oliver. "Multiple Roles for Neutrophils in Atherosclerosis." *Circulation Research* 110, no. 6 (March 16, 2012): 875–88.
22. Guarda, Greta, Catherine Dostert, Francesco Staehli, Katrin Cabalzar, Rosa Castillo, Aubry Tardivel, Pascal Schneider, and Jürg Tschopp. "T Cells Dampen Innate Immune Responses through Inhibition of NLRP1 and NLRP3 Inflammasomes." *Nature* 460, no. 7252 (July 9, 2009): 269–73.
23. Döring, Yvonne, Maik Drechsler, Sarawuth Wantha, Klaus Kemmerich, Dirk Lievens, Santosh Vijayan, Richard L. Gallo, Christian Weber, and Oliver Soehnlein. "Lack of Neutrophil-Derived CRAMP Reduces Atherosclerosis in Mice." *Circulation Research* 110, no. 8 (April 13, 2012): 1052–56.
24. Swirski, Filip K., Peter Libby, Elena Aikawa, Pilar Alcaide, F. William Luscinskas, Ralph Weissleder, and Mikael J. Pittet. "Ly-6Chi Monocytes Dominate Hypercholesterolemia-Associated Monocytosis and Give Rise to Macrophages in Atheromata." *The Journal of Clinical Investigation* 117, no. 1 (January 2007): 195–205.
25. Menu, P., M. Pellegrin, J.-F. Aubert, K. Bouzourene, A. Tardivel, L. Mazzolai, and J. Tschopp. "Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice Progresses Independently of the NLRP3 Inflammasome." *Cell Death & Disease* 2 (2011): e137.
26. Zheng, Fei, Shanshan Xing, Zushun Gong, Wei Mu, and Qichong Xing. "Silence of NLRP3 Suppresses Atherosclerosis and Stabilizes Plaques in Apolipoprotein E-Deficient Mice." *Mediators of Inflammation* 2014 (2014).
27. Galina K., Yaou Zhang, Jie-Hong Pan, Youichiro Wada, Takashi Yamamoto, Makoto Naito, Tatsuhiko Kodama, et al. "Deficiency of Cathepsin S Reduces Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 111, no. 6 (March 2003): 897–906. doi:10.1172/JCI14915.
28. Lutgens, E., S. P. M. Lutgens, B. C. G. Faber, S. Heeneman, M. M. J. Gijbels, M. P. J. de Winther, P. Frederik, et al. "Disruption of the Cathepsin K Gene Reduces Atherosclerosis Progression and Induces

- Plaque Fibrosis but Accelerates Macrophage Foam Cell Formation.” *Circulation* 113, no. 1 (January 3, 2006): 98–107. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.561449.
29. Wen, Haitao, Denis Gris, Yu Lei, Sushmita Jha, Lu Zhang, Max Tze-Han Huang, Willie June Brickey, and Jenny P.-Y. Ting. “Fatty Acid-Induced NLRP3-ASC Inflammasome Activation Interferes with Insulin Signaling.” *Nature Immunology* 12, no. 5 (May 2011): 408–15.
 30. Freigang, Stefan, Franziska Ampenberger, Adrienne Weiss, Thirumala-Devi Kanneganti, Yoichiro Iwakura, Martin Hersberger, and Manfred Kopf. “Fatty Acid-Induced Mitochondrial Uncoupling Elicits Inflammasome-Independent IL-1 α and Sterile Vascular Inflammation in Atherosclerosis.” *Nature Immunology* 14, no. 10 (October 2013): 1045–53.
 31. Chan, Chi-Bun, Michiyo Abe, Noriyoshi Hashimoto, Chunhai Hao, Ifor R. Williams, Xia Liu, Shinji Nakao, et al. “Mice Lacking Asparaginyl Endopeptidase Develop Disorders Resembling Hemophagocytic Syndrome.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, no. 2 (January 13, 2009): 468–73. doi:10.1073/pnas.0809824105.
 32. Drechsler, Maik, Remco T. A. Megens, Marc van Zandvoort, Christian Weber, and Oliver Soehnlein. “Hyperlipidemia-Triggered Neutrophilia Promotes Early Atherosclerosis.” *Circulation* 122, no. 18 (November 2, 2010): 1837–45.
 33. Murphy, Andrew J, Mani Akhtari, Sonia Tolani, Tamara Pagler, Nora Bijl, Chao-Ling Kuo, Mi Wang, et al. “ApoE Regulates Hematopoietic Stem Cell Proliferation, Monocytosis, and Monocyte Accumulation in Atherosclerotic Lesions in Mice.” *The Journal of Clinical Investigation* 121, no. 10 (October 2011): 4138–49.
 34. Wang, Jun-Xia, Angela M. Bair, Sandra L. King, Ruslan Shnayder, Ya-Fang Huang, Chi-Chang Shieh, Roy J. Soberman, Robert C. Fuhlbrigge, and Peter A. Nigrovic. “Ly6G Ligation Blocks Recruitment of Neutrophils via a β 2-Integrin-Dependent Mechanism.” *Blood* 120, no. 7 (August 16, 2012): 1489–98.
 35. Miller, Gail, Stephen P. Matthews, Thomas Reinheckel, Stewart Fleming, and Colin Watts. “Asparagine Endopeptidase Is Required for Normal Kidney Physiology and Homeostasis.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25, no. 5 (May 2011): 1606–17.
 36. Basurto-Islas, Gustavo, Inge Grundke-Iqbal, Yunn Chyn Tung, Fei Liu, and Khalid Iqbal. “Activation of Asparaginyl Endopeptidase Leads to Tau Hyperphosphorylation in Alzheimer Disease.” *The Journal of Biological Chemistry* 288, no. 24 (June 14, 2013): 17495–507.

37. Liu, Cheng, Chengzao Sun, Haining Huang, Kim Janda, and Thomas Edgington. "Overexpression of Legumain in Tumors Is Significant for Invasion/metastasis and a Candidate Enzymatic Target for Prodrug Therapy." *Cancer Research* 63, no. 11 (June 1, 2003): 2957–64.
38. Edye, Michelle E., Gloria Lopez-Castejon, Stuart M. Allan, and David Brough. "Acidosis Drives Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP)-Induced Interleukin-1 Secretion via a Caspase-1-Independent Pathway." *The Journal of Biological Chemistry* 288, no. 42 (October 18, 2013): 30485–94.
39. Huby, Thierry, Chantal Doucet, Christiane Dachet, Betty Ouzilleau, Yukihiko Ueda, Veena Afzal, Edward Rubin, M. John Chapman, and Philippe Lesnik. "Knockdown Expression and Hepatic Deficiency Reveal an Atheroprotective Role for SR-BI in Liver and Peripheral Tissues." *The Journal of Clinical Investigation* 116, no. 10 (October 2006): 2767–76. doi:10.1172/JCI26893.

Acknowledgements

INSERM provided generous support of these studies. A.S. was recipient of a Research Fellowship from the French Ministry of Research and Technology. This work was supported by the Fondation de France (W.L.G.).

Disclosures

None

Figure Legends.

Figure 1. RNAi-mediated silencing of NLRP3 abolishes IL-1 β and IL-18 secretion stimulation by ALUM crystal treatment of human macrophages while silencing of AEP reduces it. Validation of NLRP3 and AEP deficiency in respectively human THP-1 macrophages stably transfected with shRNA targeting NLRP3 (NLRP3 KD) (A) and human primary macrophages transfected with control siRNA (Ctrl) or siRNA targeting AEP (AEP KD) (D). IL-1 β and IL-18 ELISA of supernatants from PMA-primed human THP-1 Ctrl or NLRP3 KD (B, C) and LPS-primed human primary macrophages Ctrl or AEP KD (E, F) stimulated with ALUM crystals. Values are means $\pm$ SEM of experiments performed in duplicate or triplicate. [#]p<0.05, ^{##}p<0.01 and ^{###}p<0.001 versus respective non stimulated cells (None). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 versus cells transfected with control siRNA (Ctrl).

Figure 2. RNAi-mediated silencing of NLRP3 and AEP abolishes Caspase-1 activity stimulation by ALUM crystal treatment of human macrophages, the latter being due to impaired cathepsin B and L maturation Quantification of Caspase-1 activity with a colorimetric assessment in THP-1 macrophages Ctrl or stably transfected with shRNA targeting NLRP3 (NLRP3 KD) primed with PMA treated or not with ALUM crystals for 24 h (A), and in HMDM transfected with control siRNA (Ctrl) or siRNA targeting either AEP (AEP KD) primed with LPS treated or not with ALUM crystals for 24 h (B). Quantification of Caspase-1 mRNA levels by RT-QPCR assay in THP-1 macrophages Ctrl or stably transfected with shRNA targeting NLRP3 (NLRP3 KD) primed with both PMA and ALUM crystals for 24 h (C), HMDM transfected with control siRNA (Ctrl) or siRNA targeting either AEP (AEP KD) primed with both LPS and ALUM crystals for 24 h (D). Data were expressed as a fold change in OD_{420nm} (A, B) or mRNA expression (C, D) relative to control cells (Ctrl None). Values are means $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in duplicate or triplicate. [#]p<0.05, ^{##}p<0.01 and ^{###}p<0.001 versus respective non stimulated cells (None). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 versus cells transfected with control siRNA (Ctrl). Analysis of AEP, Cathepsin B, Cathepsin L and Annexin-1 protein levels by Western blot in Ctrl and AEP KD HMDM (E).

Figure 3. AEP silencing does not impact directly any NF- κ B target-gene expression, except IL-1 β and IL-1Ra in LPS and ALUM crystal stimulated human macrophages. Quantification of IL-1 β , IL-18, TNF α , IL-6, MCP-1, IL-10, NLRP3 and IL-1Ra mRNA levels by RT-QPCR assay in HMDM transfected with

control siRNA (Ctrl) or siRNA targeting either AEP (AEP KD) primed with both LPS and ALUM crystals for 24 h. Data were expressed as a fold change in mRNA expression relative to control cells (Ctrl). Values are means $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ and *** $p < 0.0005$ versus cells transfected with control siRNA (Ctrl).

Figure 4. AEP in vivo invalidation decreases neutrophile peritoneal recruitment, reluctant of IL-1 activation, upon ALUM crystal peritoneal injection. Quantification of AEP, IL-1 β , IL-18, and NLRP3 mRNA levels by RT-QPCR assay in bone-marrow derived macrophages (BMDM) extracted from WT or AEP^{-/-} mice. Data were expressed as a fold change in mRNA expression relative to control cells (Ctrl) (A). C57BL/6 ($n = 8$), or mice deficient in AEP ($n = 10$) were injected peritoneally with cholesterol crystals in PBS or with PBS alone (C57BL/6, $n = 14$; B6-129, $n = 4$). Peritoneal lavage cells were analysed for neutrophils after 15 h. Results are shown as means and SEM. for pooled groups of mice from experiments repeated twice. Values are means $\pm$ SEM for each animal group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus control group.

Figure 5. AEP invalidation in myeloid lineage decreases cholesterolemia, blood neutrophils and LY-6C^{high} monocytes and atherosclerosis development in LDL-R^{-/-} mice. Female LDL-R^{-/-} mice reconstituted with C57BL/6 ($n = 10$) or AEP^{-/-} ($n = 11$) bone marrow were fed a high cholesterol diet for 8 weeks. Bone marrow transplantation efficiency was assessed by AEP mRNA levels quantification by RT-QPCR in peritoneal macrophages isolated from each animal (A). and analysed for serum cholesterolemia (B), blood neutrophils, Ly-6C^{high} and LY-6C^{low} monocytes (C) and average aortic sinus lesion size (D, E, F). Each dot represents the mean lesion size of serial cross-sections from individual mice (D, F). Representative photographs of the aortic sinus stained with oil-red-o (F). Values are means $\pm$ SEM for each animal group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ versus C57BL/6 transplanted group.

Figure 1

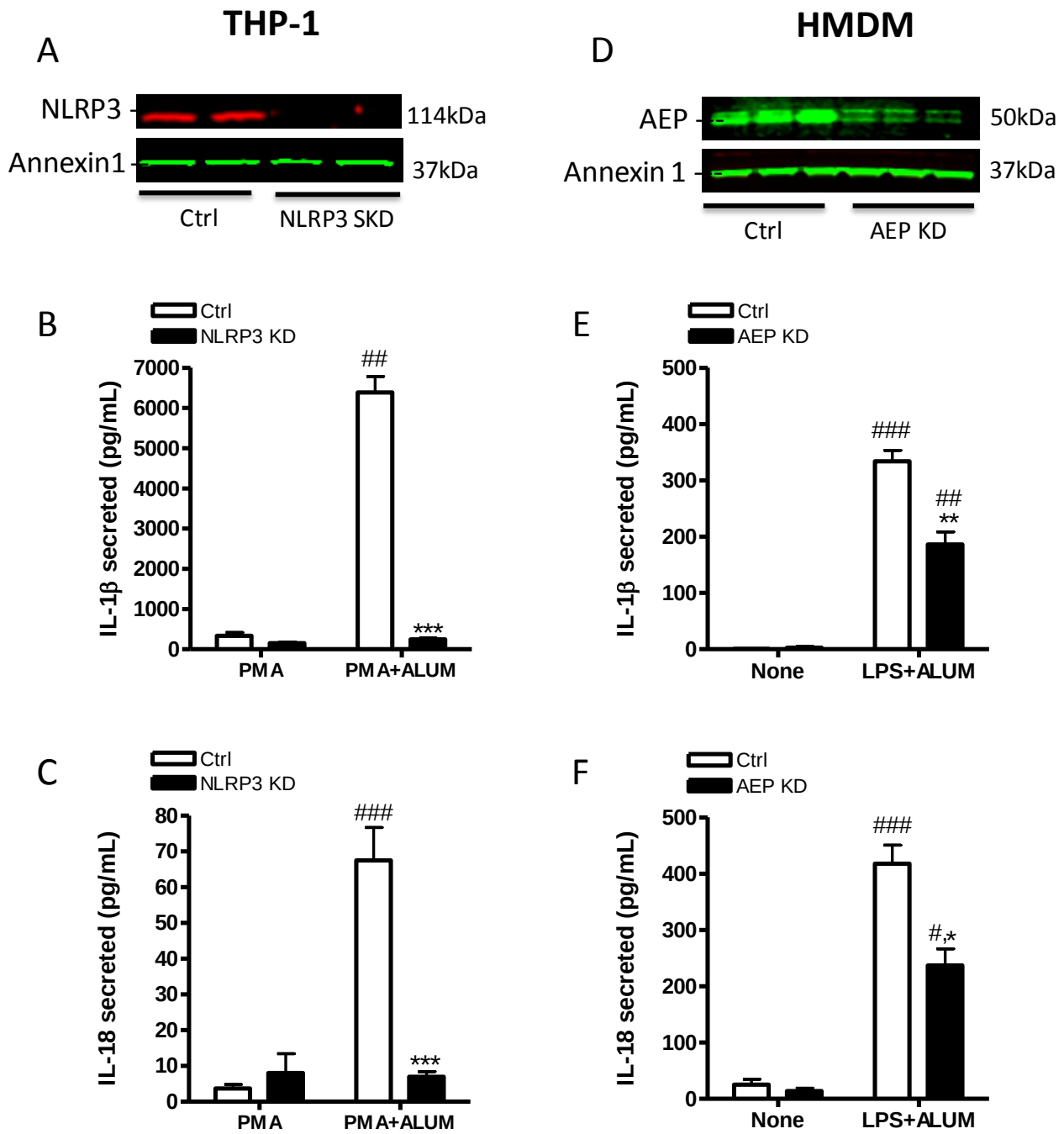


Figure 2

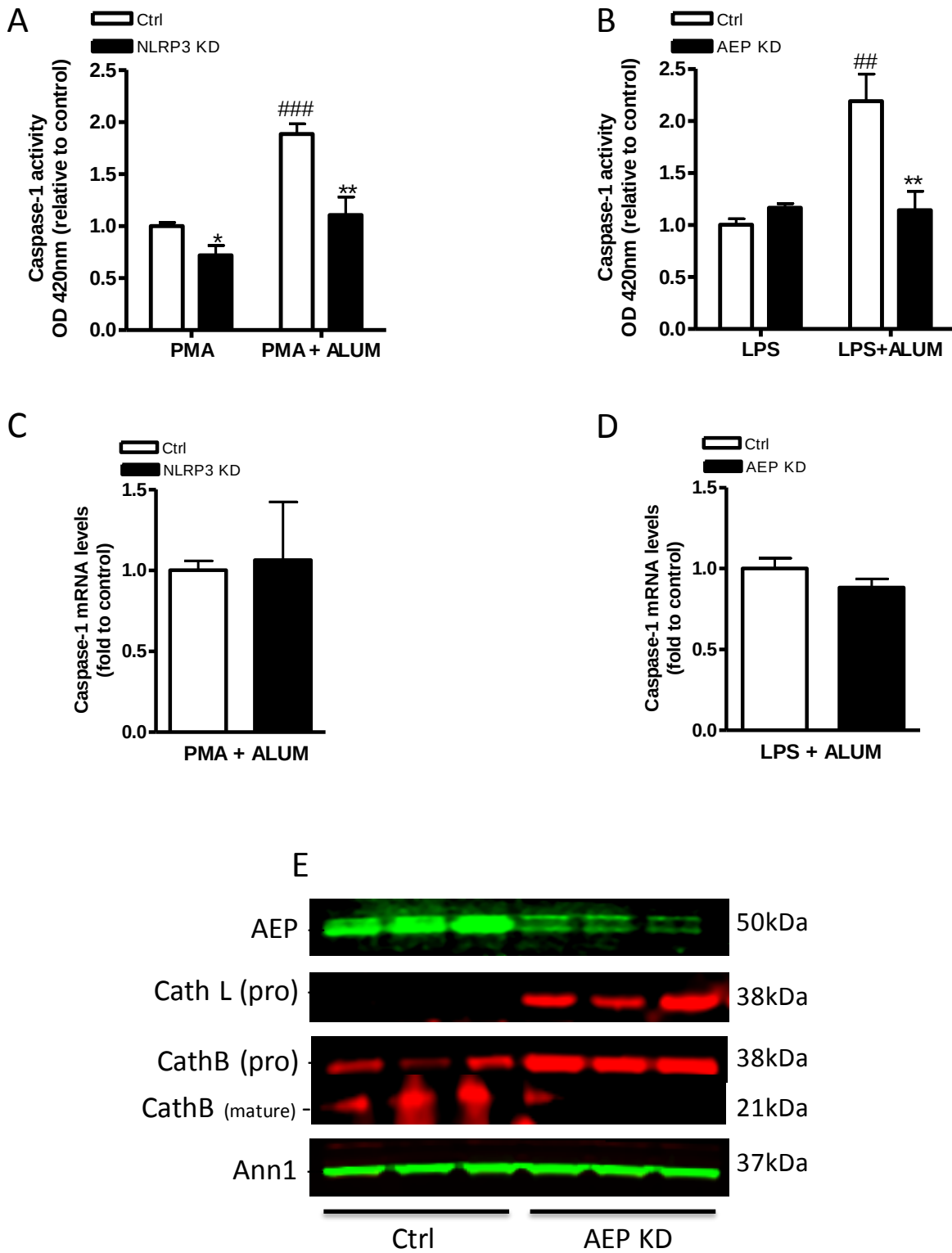


Figure 3

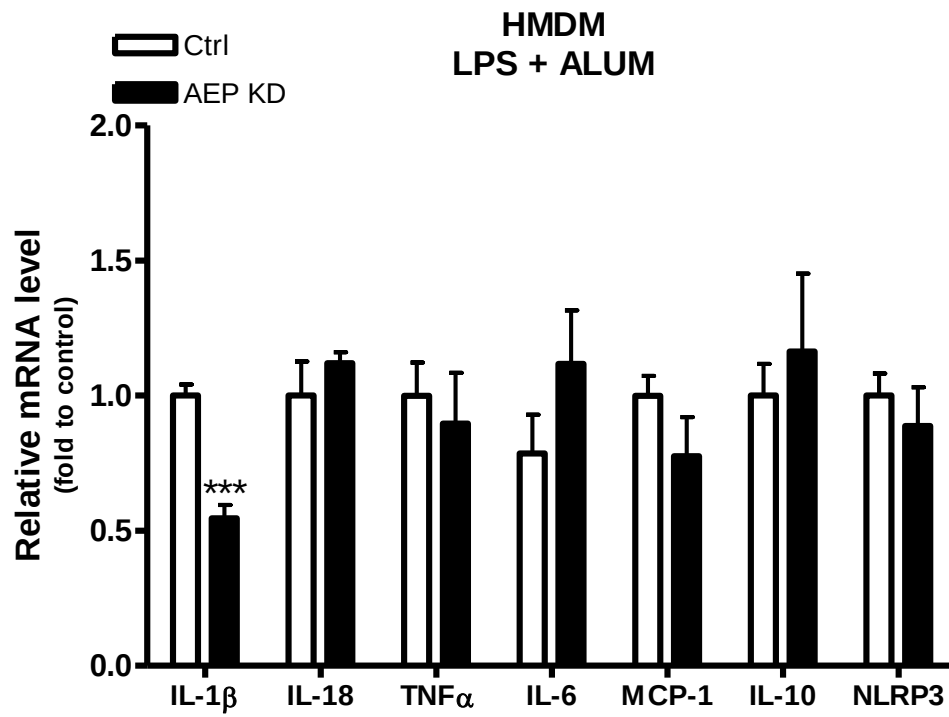


Figure 4

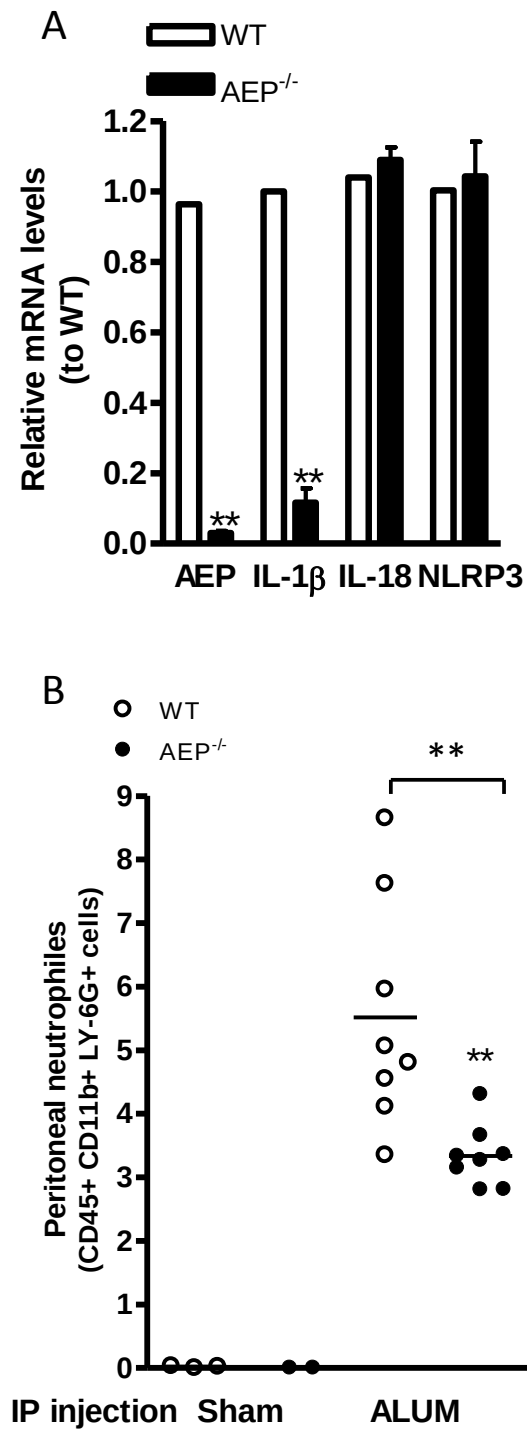
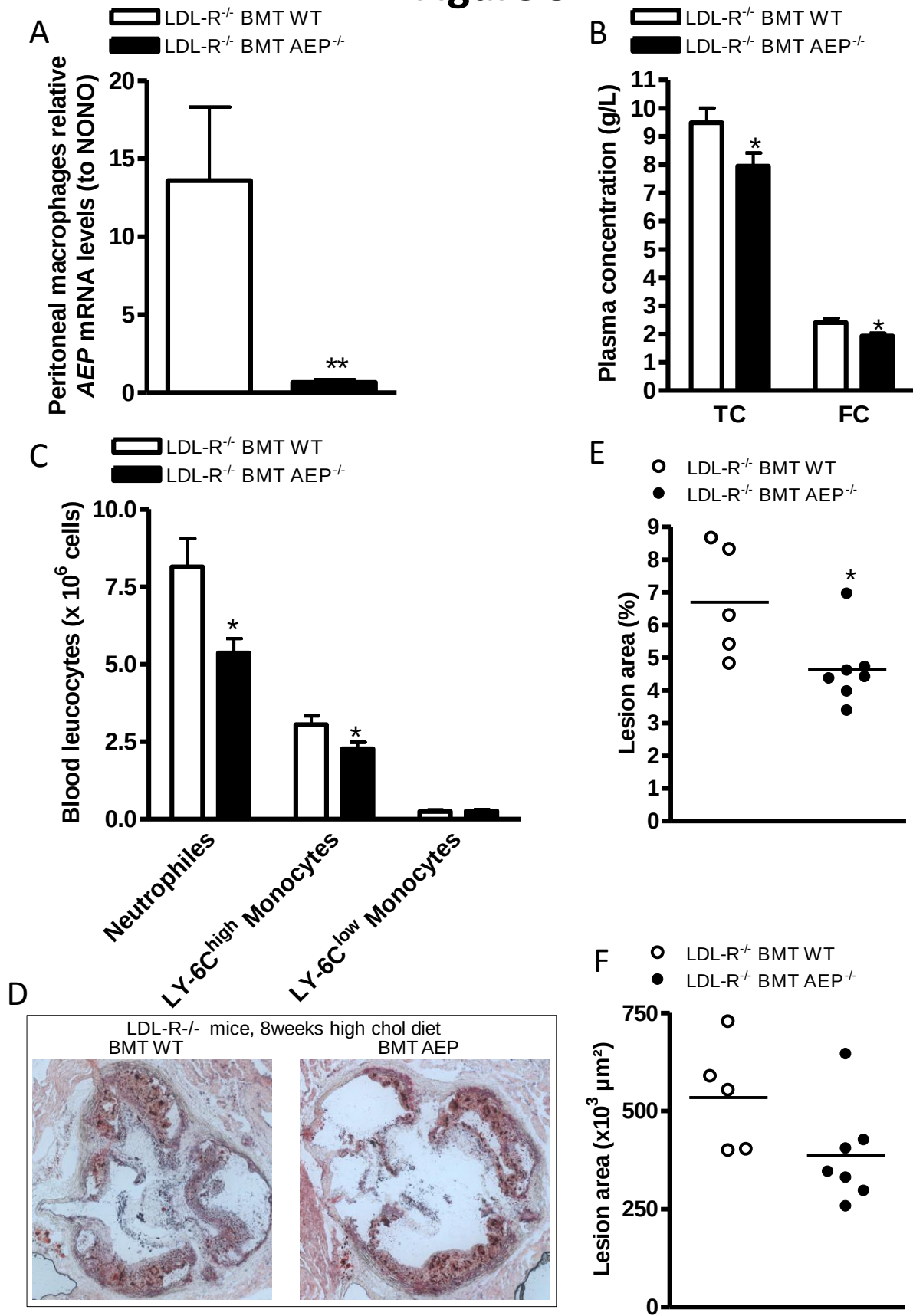


Figure 5



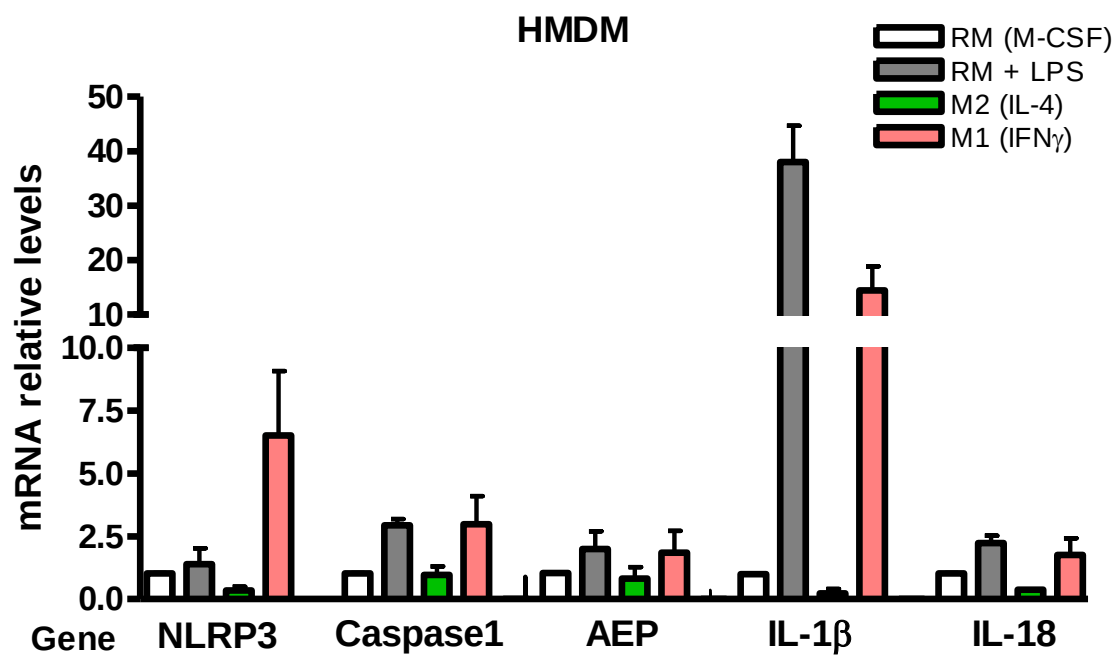
Supplementary materials.

Supplementary figure 1 Quantification of IL-1 β , IL-18, AEP, NLRP3 and Caspase-1 mRNA levels by RT-QPCR assay in HMDM differentiated with M-CSF, IL-4, IFN γ or M-CSF + LPS. Values are means $\pm$ SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. *p<0.05, **p<0.005 and ***p<0.0005 versus cells transfected with control siRNA (Ctrl).

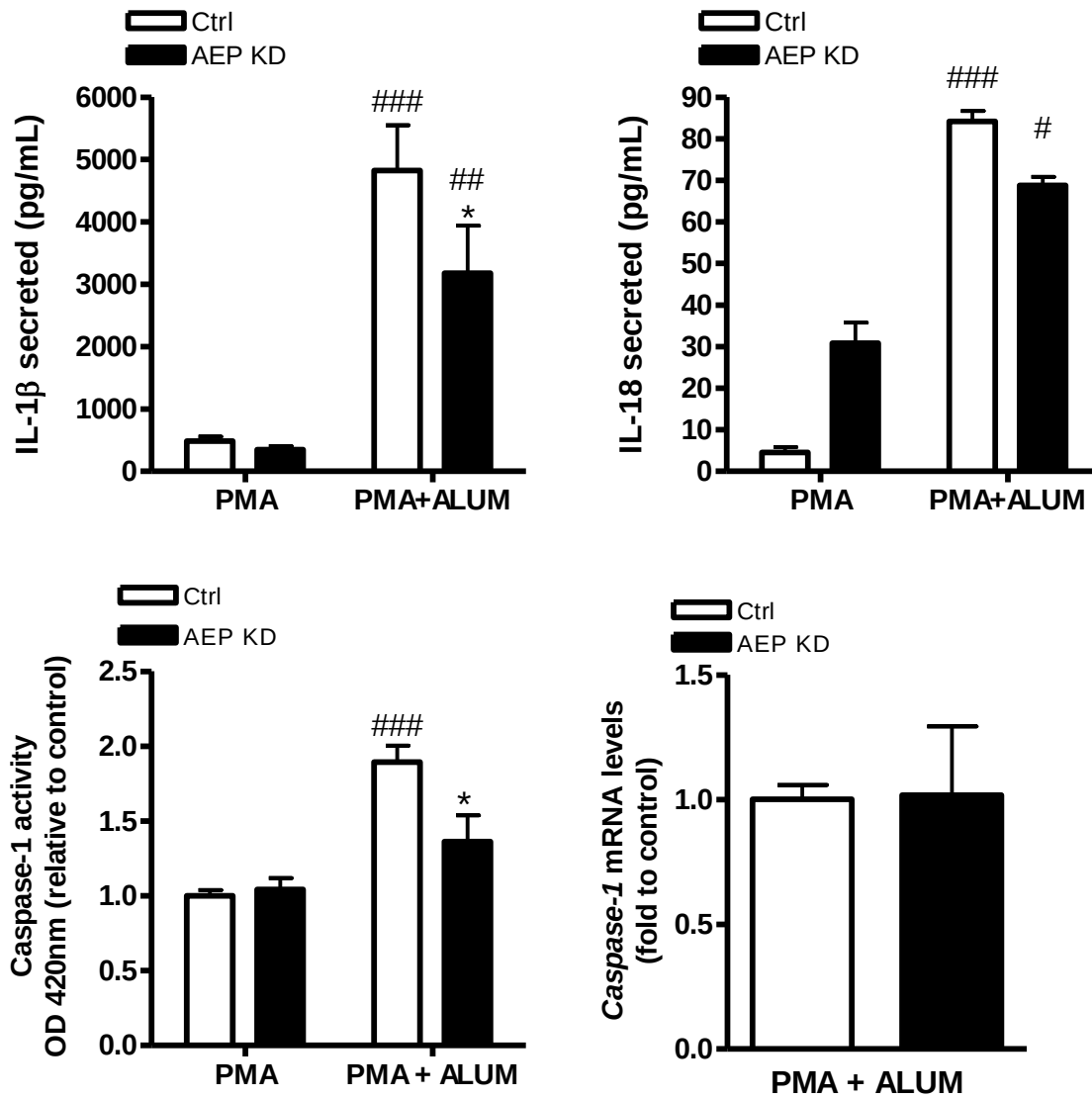
Supplementary figure 2. IL-1 β and IL-18 ELISA of supernatants from PMA-primed human THP-1 Ctrl or AEP KD (A,B) stimulated with ALUM crystals. Quantification of Caspase-1 activity with a colorimetric assay (C) or of Caspase-1 mRNA levels by RT-QPCR assay (D) in THP-1 macrophages Ctrl or transfected with siRNA targeting AEP (AEP KD) primed with PMA treated or not with ALUM crystals for 24 h (C). Values are means $\pm$ SEM of experiments performed in duplicate or triplicate. #p<0.05, ##p<0.01 and ###p<0.001 versus respective non stimulated cells (None). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 versus cells transfected with control siRNA (Ctrl).

Supplementary figure 3 Recruited upon ALUM crystal injection peritoneal neutrophils membrane LY-6G expression was quantified by flow cytometry in Ctrl and AEP KO mice.

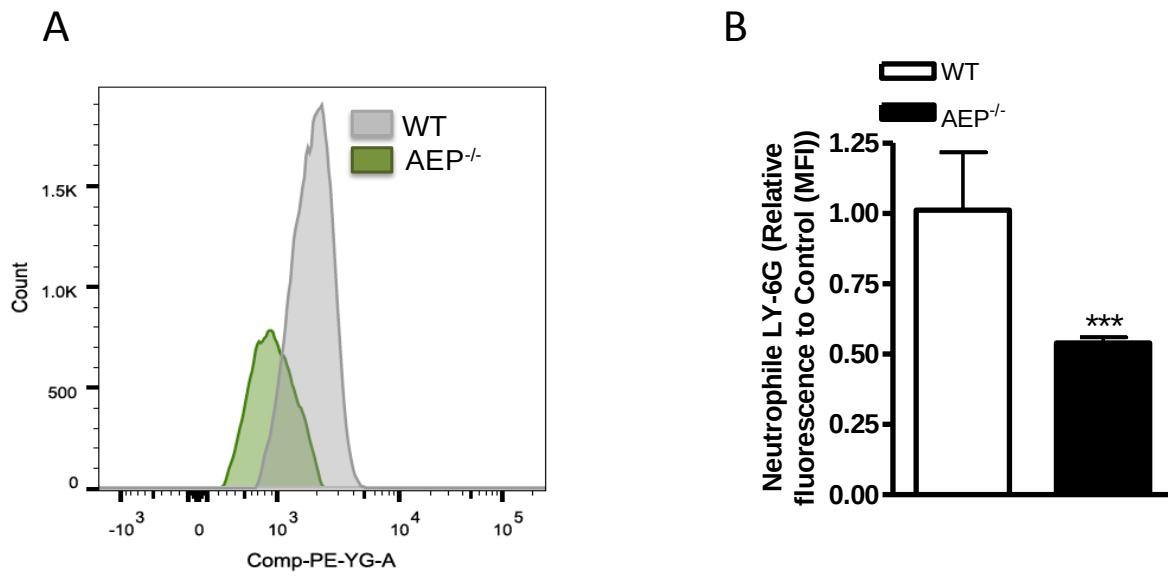
Supplementary figure 1



Supplementary figure 2



Supplementary figure 3



Etudes

Complémentaires

Durant mon doctorat, j'ai pu participer à d'autres projets de recherche collaboratifs au sein de mon équipe, en particulier aux études menées sur le transporteur ABCG1.

La première étude, faisant suite à celle de Larrède et al, a démontré qu'à défaut de stimuler l'efflux cellulaire de cholestérol vers les HDL, dans le macrophage humain ABCG1 contrôle l'activité LPL. En effet, en l'invalidation d'ABCG1 dans des macrophages humains primaires provoque la rétention de la LPL à la membrane plasmique. En conséquence son activité et sa sécrétion sont diminuées, ainsi que l'accumulation de lipides dans la cellule. ABCG1 participe donc par ce mécanisme à la formation de cellule spumeuse. (Olivier M. et al, ATVB 2014)

Dans la deuxième étude, le rôle d'ABCG1 dans l'accumulation de lipides et de tryglycérides en particulier dans le tissu adipeux et dans le développement de l'obésité a été étudié. Les adipocytes humains 3T3-L1 ABCG1 KD accumulent moins de TG, et l'inhibition locale d'ABCG1 dans le tissu adipeux murin diminue la prise de poids chez les souris exposées à un régime riche en graisses. De plus, une étude de polymorphismes a démontré qu'une forte expression d'ABCG1 chez des patients obèses est corrélée à un phénotype plus sévère de la maladie. L'ensemble de ces résultats démontrent également le rôle important et délétère du transporteur ABCG1 dans l'obésité. Cette étude est actuellement en fin de révision. (Frisdal E. et al, Diabetes, Submitted)

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION



Human ATP-Binding Cassette G1 Controls Macrophage Lipoprotein Lipase Bioavailability and Promotes Foam Cell Formation

Maryline Olivier, Michael W. Tanck, Ruud Out, Elise F. Villard, Bart Lammers, Laura Bouchareychas, Eric Frisdal, Alexandre Superville, Theo Van Berkel, John J. Kastelein, Miranda Van Eck, J. Wouter Jukema, M. John Chapman, Geesje M. Dallinga-Thie, Maryse Guerin and Wilfried Le Goff

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32:2223-2231; originally published online July 5, 2012;
doi: 10.1161/ATVBAHA.111.243519

Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology is published by the American Heart Association, 7272
Greenville Avenue, Dallas, TX 75231

Copyright © 2012 American Heart Association, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 1079-5642. Online ISSN: 1524-4636

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the
World Wide Web at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/32/9/2223>

Data Supplement (unedited) at:

<http://atvb.ahajournals.org/content/suppl/2012/07/05/ATVBAHA.111.243519.DC1.html>

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the [Permissions and Rights Question and Answer](#) document.

Reprints: Information about reprints can be found online at:
<http://www.lww.com/reprints>

Subscriptions: Information about subscribing to *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* is online at:
<http://atvb.ahajournals.org/subscriptions/>

Downloaded from <http://atvb.ahajournals.org/> by guest on July 31, 2014

Human ATP-Binding Cassette G1 Controls Macrophage Lipoprotein Lipase Bioavailability and Promotes Foam Cell Formation

Maryline Olivier, Michael W. Tanck, Ruud Out, Elise F. Villard, Bart Lammers, Laura Bouchareychas, Eric Frisdal, Alexandre Superville, Theo Van Berkel, John J. Kastelein, Miranda Van Eck, J. Wouter Jukema, M. John Chapman, Geesje M. Dallinga-Thie, Maryse Guerin, Wilfried Le Goff

Objective—The physiological function of the ATP-binding cassette G1 (ABCG1) transporter in humans is not yet elucidated, as no genetic disease caused by *ABCG1* mutations has been documented. The goal of our study was, therefore, to investigate the potential role(s) of ABCG1 in lipid metabolism in humans.

Methods and Results—Here we report that among the 104 polymorphisms present in the *ABCG1* gene, the analysis of the frequent functional rs1893590 and rs1378577 single nucleotide polymorphisms located in the regulatory region of *ABCG1* in the Regression Growth Evaluation Statin Study population revealed that both *ABCG1* single nucleotide polymorphisms were significantly associated with plasma lipoprotein lipase (LPL) activity. Moreover, we observed that plasma LPL activity was modestly reduced in *Abcg1*^{−/−} mice as compared with control mice. Adipose tissue and skeletal muscle are the major tissues accounting for levels and activity of plasma LPL in the body. However, beyond its lipolytic action in the plasma compartment, LPL was also described to act locally at the cellular level. Thus, macrophage LPL was reported to promote foam cell formation and atherosclerosis *in vivo*. Analysis of the relationship between ABCG1 and LPL in macrophages revealed that the knockdown of ABCG1 expression (ABCG1 knockdown) in primary cultures of human monocyte-derived macrophages using small interfering RNAs led to a marked reduction of both the secretion and activity of LPL. Indeed, LPL was trapped at the cell surface of ABCG1 knockdown human monocyte-derived macrophages, likely in cholesterol-rich domains, thereby reducing the bioavailability and activity of LPL. As a consequence, LPL-mediated lipid accumulation in human macrophage foam cells in the presence of triglyceride-rich lipoproteins was abolished when ABCG1 expression was repressed.

Conclusion—We presently report that ABCG1 controls LPL activity and promotes lipid accumulation in human macrophages in the presence of triglyceride-rich lipoproteins, thereby suggesting a potential deleterious role of macrophage ABCG1 in metabolic situations associated with high levels of circulating triglyceride-rich lipoproteins together with the presence of macrophages in the arterial wall. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2223–2231.)

Key Words: ATP-binding cassette G1 ■ lipoprotein lipase ■ macrophage ■ triglycerides ■ atherosclerosis

The ATP-binding cassette G1 (ABCG1) membrane transporter plays a key role in cellular lipid homeostasis in mice by mediating cellular free cholesterol efflux to high-density lipoprotein (HDL),¹ a major step in the reverse cholesterol transport pathway. Neutral lipid accumulation was observed in the lungs of *Abcg1*^{−/−} mice when fed a normal chow diet.² In addition, *Abcg1*^{−/−} mice failed to maintain cellular lipid homeostasis in both hepatocytes and in tissue macrophages after administration of a high-fat/high-cholesterol diet.

Atherosclerotic lesions are characterized by the presence of abundant lipid-laden, macrophage-derived foam cells, which result from the cellular uptake of modified low-density lipoprotein and triglyceride-rich lipoproteins (TRL) (mainly very low-density lipoprotein [VLDL] remnants) after infiltration into the arterial wall.³ In this context, it is relevant that ABCG1 was initially proposed to potentially protect against macrophage foam cell formation during atherogenesis. We and others have indeed observed that net cholesterol efflux

Received on: December 18, 2011; final version accepted on: June 18, 2012.

From the INSERM, UMR_S939, Paris, F-75013, France (M.O., E.F.V., L.B., E.F., A.S., M.J.C., M.G., W.L.G.); UPMC Univ Paris 06, UMR_S939, Paris, France (M.O., E.F.V., L.B., E.F., A.S., W.L.G., M.J.C., M.G.); Department of Cardiology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands (M.W.T., J.W.J.); Interuniversity Cardiology Institute of The Netherlands, Utrecht, The Netherlands (J.W.J.); Durrer Center for Cardiogenetic Research, Amsterdam, The Netherlands (J.W.J.); Laboratory of Vascular Medicine, AMC Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands (J.J.K., G.M.D.-T.); Division of Biopharmaceutics, Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, Gorlaeus Laboratories, Leiden, The Netherlands (R.O., B.L., T.V.B., M.V.E.); and Institute of Cardiomatobiology and Nutrition, Paris, France (M.O., E.F.V., L.B., E.F., A.S., M.J.C., M.G., W.L.G.).

This manuscript was sent to Linda Demer, Consulting Editor, for review by expert referees, editorial decision, and final disposition.

The online-only Data Supplement is available with this article at <http://atvb.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/ATVBAHA.111.243519/-DC1>. Correspondence to Wilfried Le Goff, PhD, INSERM UMR_S939, Hôpital de la Pitié, Pavillon Benjamin Delessert, 83, Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France. E-mail wilfried.le_goff@upmc.fr

© 2012 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.243519

Downloaded from <http://atvb.ahajournals.org/> by guest on July 31, 2014

**ADIPOCYTE ATP-BINDING CASSETTE G1 PROMOTES TRIGLYCERIDE STORAGE, FAT MASS
GROWTH AND HUMAN OBESITY**

Eric FRISDAL^{1,2,3}, Soazig LE LAY⁴, Henri HOOTON^{2,6}, Lucie POUPEL³, Maryline OLIVIER^{1,2}, Rohia
ALILI^{2,3,6}, Wanee PLENGPANICH^{1,8}, Elise F. VILLARD^{1,2,3}, Sophie GILIBERT^{1,2,3}, Marie LHOMME³,
Alexandre SUPERVILLE^{1,2,3}, Lobna MIFTAH-ALKHAIR¹, M. John CHAPMAN^{1,2}, Geesje M. DALLINGA-
THIE⁵, Nicolas VENTECLEF^{2,3,6}, Christine POITOU^{2,3,6,7}, Joan TORDJMAN^{2,3,6}, Philippe LESNIK^{1,2,3}, Anatol
KONTUSH^{1,2,3}, Thierry HUBY^{1,2,3}, Isabelle DUGAIL^{2,3,6}, Karine CLEMENT^{2,3,6,7}, Maryse GUERIN^{1,2,3} and
Wilfried LE GOFF^{1,2,3}

1- INSERM, UMR_S1166, Team 4, F-75013 Paris, France;

2- Université Pierre et Marie Curie-Paris6, F-75005 Paris, France;

3- Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Pitié-Salpêtrière hospital, F-75013 Paris, France;

4- INSERM, U1063, F-49933 Angers, France;

5- AMC Amsterdam, Laboratory of Vascular Medicine, Amsterdam, The Netherlands;

6- INSERM, U872, Nutriomique team 7, Cordeliers Research Center, F-75006, Paris, France;

7- Assistance-Publique Hôpitaux de Paris, Heart and Metabolism, Pitié-Salpêtrière hospital, F-75013, Paris, France;

8- King Chulalongkorn Memorial Hospital, Thai Red Cross Society, Patumwan, Bangkok 10330, Thailand.

Key Words: ABCG1, LPL, PPAR γ , RNAi, adipocyte, obesity

Abstract.

The role of ATP-binding Cassette G1 (ABCG1) transporter in human pathophysiology is still largely unknown. Indeed, beyond its role in mediating free cholesterol efflux to HDL, ABCG1 transporter equally promotes lipid accumulation in a triglyceride (TG)-rich environment through regulation of the bioavailability of Lipoprotein Lipase (LPL).

As both ABCG1 and LPL are expressed in adipose tissue, we hypothesize that ABCG1 is implicated in adipocyte TG storage and could be then a major actor in adipose tissue fat accumulation.

Silencing of *Abcg1* expression by RNAi in 3T3-L1 preadipocytes compromised LPL-dependent TG accumulation during initial phase of differentiation. Generation of stable *Abcg1* Knockdown 3T3-L1 adipocytes revealed that *Abcg1* deficiency reduces TG storage and diminishes lipid droplet size through inhibition of *Pparγ* expression. Strikingly, local inhibition of adipocyte *Abcg1* in adipose tissue from mice fed a high fat diet led to a rapid decrease of adiposity and weight gain. Analysis of two frequent *ABCG1* SNPs (rs1893590 (A/C) and rs1378577 (T/G)) in morbidly obese individuals indicated that elevated *ABCG1* expression in adipose tissue was associated with an increased *PPARγ* expression and adiposity concomitant to an increased fat mass and BMI (haplotype AT>GC). The critical role of ABCG1 regarding obesity was further confirmed in independent populations of severe obese and diabetic obese individuals.

For the first time, this study identifies a major role of adipocyte ABCG1 in adiposity and fat mass growth and suggests that adipose ABCG1 might represent a potential therapeutic target in obesity.

Discussion

Perspectives

Depuis la découverte des statines, la majorité des recherches sur les MCV se sont focalisées sur le développement de stratégies thérapeutiques modulant les facteurs lipidiques circulants. Notamment, la baisse des taux de LDL-C a un effet bénéfique sur l'incidence des maladies cardiovasculaires, alors que l'augmentation du HDL-C chez l'Homme a pour l'instant été un échec dans ce domaine.

Un des enjeux actuels est de comprendre la dynamique de la pathologie sous-jacente des MCV, l'athérosclérose, et l'interaction de ses trois composantes, oxydative, lipidique et inflammatoire. Le macrophage est la cellule la plus représentée au sein de la plaque d'athérome ; c'est elle qui est responsable de son initiation et est au carrefour des 3 composantes. C'est dans ce contexte que nous avons décidé d'élucider plus avant les mécanismes moléculaires impliqués dans la transformation de ces phagocytes piliers de l'immunité innée en cellules spumeuses, sécrétrices d'espèces réactives de l'oxygène et de cytokines pro-inflammatoires responsables d'une inflammation aiguë et délétère.

Dans les études effectuées au cours de mon doctorat, j'ai cherché à découvrir de nouvelles voies de régulations potentiellement athéroprotectrices dans le macrophage humain.

Les voies mises en évidence par ces travaux ont été résumées [figure 26](#). L'ensemble illustre le lien étroit qui existe entre les composantes lipidiques et inflammatoires, comme cela est le cas entre LXR et NLRP3.

Le mécanisme LXR α /ARL7/ABCA1 dépendant mis en évidence dans la première étude souligne l'importance de confirmer les études murines par des études de mécanistique dans des modèles humains. Cette étude décrit pour la première fois l'interaction entre ces 3 partenaires de façon intégrée dans le macrophage humain, et sera complétée par une analyse plus approfondie du mécanisme par lequel ARL7 est impliqué dans le transport du cholestérol au sein du macrophage humain, notamment son interaction avec les éléments

du cytosquelette tels que les microtubules qui permettent le transport vésiculaire (Wei SM et al, Biochem biophys res comm 2009). Une coloration par immunohistochimie d'ARL7, du cholestérol des vésicules et des microtubules, permettra de mettre en évidence le mécanisme de manière plus précise afin de définitivement valider le mécanisme. Enfin, dans le cadre de l'athérosclérose, ce mécanisme doit être intégré au niveau cellulaire et physiologique.

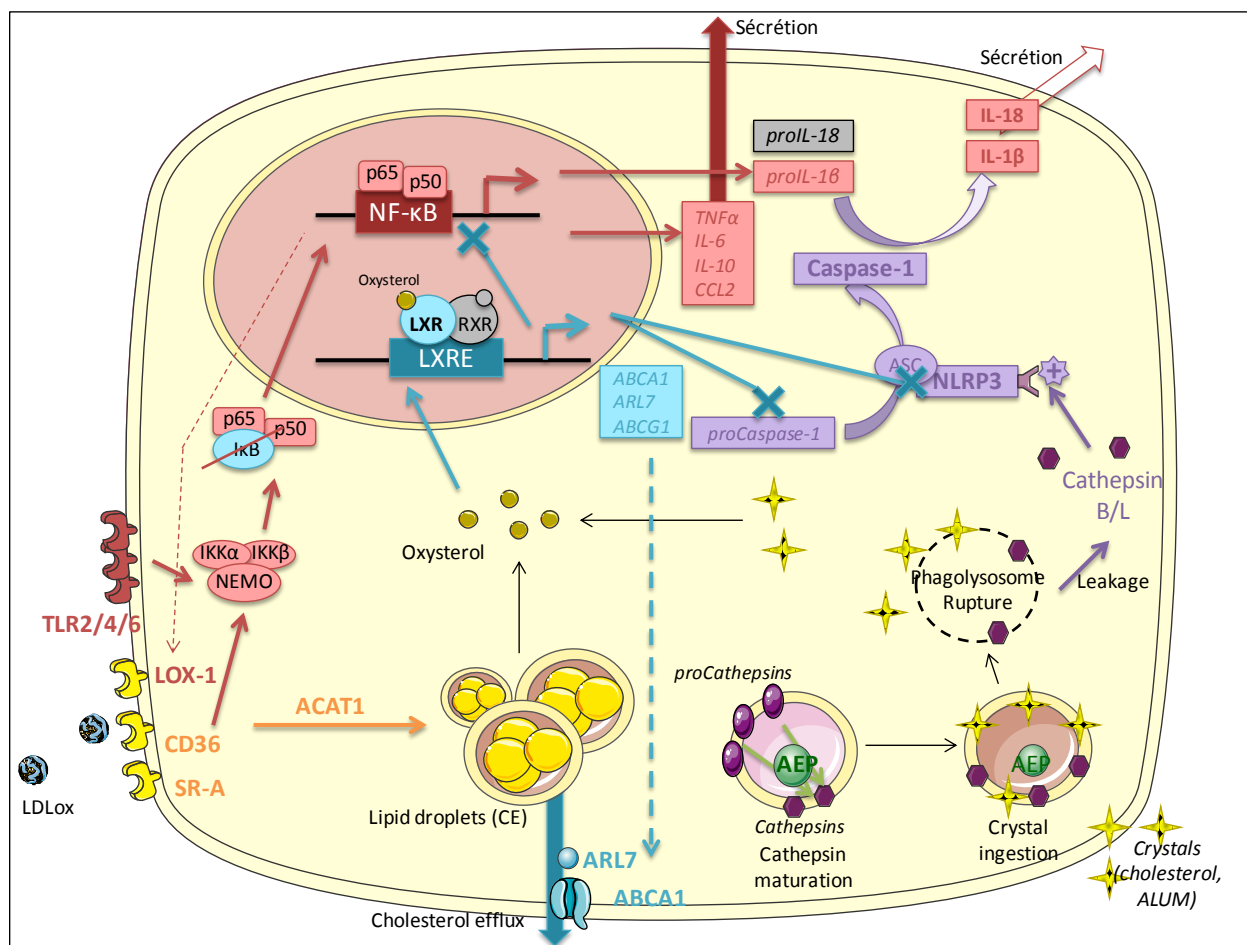


Figure 26 – Schéma de Synthèse des Nouvelles Voies

(Légende figure 26) L'activation isolée de LXR α par les oxystérols induit l'expression d'ARL7, qui transporte le cholestérol libre des endosomes/lysosomes vers les radeaux lipidiques, et l'expression d'ABCA1, qui l'exporte sur des ApoA-I et des HDL. Cette activation réprime également l'activation NF- κ B dépendante des cytokines pro-inflammatoires, en particulier celle d'IL-1 β , nécessaire à l'activation de l'inflammasome NLRP3. Elle inhibe aussi la transcription des gènes *NLRP3*, *ASC* et *Caspase-1*. Enfin, AEP mature les cathepsines B et L, qui seront relarguées dans le cytoplasme suite à l'ingestion de cristaux de cholestérol par le macrophage. C'est seulement sous forme active qu'elles pourront être détectées par NLRP3.

En effet, les récepteurs LXR présentent un double rôle dans l'homéostasie lipidique et dans l'inflammation (Ghisletti S. et al, *Genes Dev* 2009). La capacité des macrophages à promouvoir l'efflux de cholestérol lui-même est dépendant de l'environnement cytokinique et de la polarisation du macrophage : les macrophages humain M2, issus d'une réponse immunitaire Th2, bien qu'anti-inflammatoires, montrent une plus faible expression de LXR α et d'ABCA1, ainsi qu'une capacité réduite à promouvoir l'efflux cellulaire de cholestérol vers ApoA-I et les HDL (Chinetti-Gbaguidi G. et al, *Circ Res* 2011). D'autres connexions existent puisque le traitement de macrophages par certaines cytokines, tels le TNF α (Gerbode-Giannone MC., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007) et l'IL-6 (Frisdal E. et al, *J Biol Chem* 2011) augmentent l'expression d'ABCA1. L'ensemble de ces études vont dans le sens d'un efflux de cholestérol cellulaire plus efficace chez les macrophages pro-inflammatoire. Cependant l'IL-10 anti-inflammatoire et la voie STAT3 activent elles-aussi la voie de l'efflux (Han X. et al, *Faseb J* 2010). Enfin, dans le macrophage humain, l'activation LXR stimule l'expression de TLR4 et de la NADPH oxydase (Fontaine C. et al, *Circ Res* 2007): ce mécanisme est dépendant de temps. Un traitement prolongé (de 48h) par les agonistes LXR augmente ainsi la sécrétion de cibles de NF- κ B, et la réponse au LPS. Un traitement court tendrait davantage à réprimer l'inflammation. Une deuxième étude de la même équipe démontre que l'activation de TLR4 est autorégulée par l'activation simultanée de la transcription de son inhibiteur Rev-erb α (Fontaine C. et al, *Mol Endocrinol* 2008). Ce mécanisme, délétère, doit cependant être confirmé dans des conditions physiologiques plus proches de l'athérosclérose : soit, l'impact

de l'agoniste sur la réponse inflammatoire aux LDLox, passant par TLR4 mais pas seulement (TLR2 et TLR6), doit être quantifiée.

Tous ces mécanismes de régulation de l'homéostasie du cholestérol et de l'inflammation LXR-dépendants sont donc indissociables, puisqu'ils s'activent l'un l'autre, et que l'internalisation de cholestérol oxydé s'accompagne d'une activation TLR.

L'activation LXR stimule d'autres mécanismes athéroprotecteurs. Elle active notamment un nombre important de facteurs impliqués dans le contrôle de l'apoptose (Pehkonen P. et al, GMC Genomics 2012). Egalement, la stimulation de l'efférocytose (Rebé C. et al, Circ Res 2009) et de l'export du fer (Bories G. et al, Circ Res 2013, Boyle JJ. Et al, Circ Res 2012) semblent apporter leur pierre à l'édifice de l'athéroprotection médiée par LXR.

Cependant, l'efficacité de la stimulation de l'efflux de cholestérol cellulaire dans la plaque est de plus en plus remise en question (Shao B. et al, Circ Res 2014 ; Hewing B. et al, ATVB 2014 ; Huang Y. et al, Nat Med 2014). Il serait donc intéressant de quantifier l'ensemble des mécanismes impactés par LXR dans un même modèle, et d'évaluer leur capacité relative à inhiber la formation de la plaque, et leur impact sur sa cinétique.

L'activation de LXR α étant une stratégie thérapeutique inenvisageable à cause de l'hypertriglycéridémie qui en résulte, il serait d'autant plus intéressant d'étudier la capacité de LXR β à prévenir l'athérosclérose via :

- la stimulation de l'efférocytose
- l'augmentation de l'export du fer
- la répression de l'inflammation
- Le contrôle de l'apoptose par les agonistes LXR.

Tall et al. ont en effet observé que chez la souris, l'inactivation de l'efflux de cholestérol spécifiquement dans les lignées myéloïdes n'abolit pas les propriétés athéroprotectrices de l'activation LXR macrophage-spécifique (Kappus MS. et al., ATVB 2014).

L'idée est de vérifier si les mécanismes jouant un rôle important dans l'athéroprotection peuvent être activée de manière LXR β -spécifique dans le macrophage :

- l'argument en faveur de cette hypothèse étant que l'isoforme LXR α est exprimée spécifiquement dans des cellules impliquées dans l'homéostasie du cholestérol (Repa JJ. et al, Annu Rev Cell Dev Biol 2000). Il est possible qu'elle se fixe uniquement sur les promoteurs des gènes régulant cette dernière.

- par contre, LXR α est bien plus exprimé dans le macrophage humain que LXR β , l'autre hypothèse étant qu'il n'y aurait pas de différences concernant les sites de liaisons sur le génome. L'activation de LXR β aurait cependant un impact trop mineur dans le macrophage comparé à celui de LXR α .

La capacité de l'activation LXR à inhiber la signalisation de l'inflammasome NLRP3 mise en évidence dans l'étude 2 joue probablement également un rôle dans l'athéroprotection. L'inhibition de NLRP3 constitue en effet une stratégie thérapeutique intéressante pour lutter contre l'athérosclérose, un anticorps anti-IL-1 β étant actuellement testé cliniquement pour sa capacité à prévenir les MCV (CANTOS, Ridker PM et al, Am Heart J 2011) et IL-18 constituant un marqueur circulant du risque cardiovasculaire (Blankenberg S. et al, Circulation 2002). Il est cependant fort probable que les deux voies soient activées simultanément au cours de la formation de l'athérome, puisque des oxystérols, sont également capables d'activer NLRP3, notamment le 7-kéto-cholestérol (Menu P. et al, Cell Death Dis 2011). Ce dernier n'est pas un agoniste des LXR mais il est tout de même présent dans la plaque d'athérosclérose (Costet P. et al., J Biol Chem 2000) L'étude 2 met ainsi en évidence une autre capacité de LXR à détecter le stress oxydant et l'excès de cholestérol intracellulaire pour en réduire les conséquences.

Cependant une fois de plus il faut tenir compte des découvertes de l'équipe de Bart Staels, en mesurant la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 à plusieurs temps d'exposition à l'agoniste LXR et à un temps fixe de traitement LPS. L'effet anti-inflammatoire du GW3965 disparaît au cours du temps pour laisser place à une amplification de la réponse au LPS via l'induction du récepteur TLR4. Cela permettra de conclure si l'inhibition de NLRP3 est capable de contrecarrer cette amplification ou si les deux mécanismes collaborent à importance égale à la sécrétion de la cytokine IL-1 β . Dans le contexte de l'athérosclérose, on est plutôt dans une situation d'exposition chronique des macrophages aux oxystérols, puisque ceux-ci internalisent des LDLox de manière incontrôlée par les récepteurs Scavengers. Ceci porte à penser que l'effet de l'activation LXR sur *TLR4* serait délétère dans ces conditions, la répression de NF- κ B inefficace après 24h, sauf si l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 peut se révéler efficace pour contrer l'inflammation et inhiber la production d'IL-1 β .

Dans l'étude 3, j'ai démontré que l'invalidation d'AEP empêche l'activation de NLRP3 par des cristaux dans le macrophage ; un mécanisme athéroprotecteur *in vivo*. Une fois de plus ce mécanisme doit être intégré dans l'ensemble des régulations cellulaires. En effet, une baisse de la cholestérolémie, de la monocytose et de la neutrophilie est également associée avec l'inactivation d'AEP dans les lignées myéloïdes, lui conférant un impact à la fois lipidique et inflammatoire.

Une activation LXR associée à l'inactivation d'AEP pourrait empêcher l'activation de l'inflammasome par des cristaux mais aussi par le stress oxydant et certains acides gras. Il est également possible que l'ingestion de cristaux de cholestérol et leur relargage dans le cytoplasme du macrophage spumeux induise la formation d'oxystérols et ainsi l'activation de LXR.

Ensuite, l'AEP mature d'autres enzymes que les cathepsines B et L, maillons de la voie de signalisation NLRP3 ; notamment, la cathepsine D. Cette dernière étant impliquée dans le transport vésiculaire du cholestérol libre et d'ABCA1 à la membrane (Haidar B. et al, J Biol Chem 2006), des données non publiées du laboratoire ont démontré que l'invalidation d'AEP entraîne une diminution de l'efflux de cholestérol cellulaire du macrophage et du RCT *in vivo*. L'invalidation dans les lignées myéloïdes de l'AEP étant athéroprotectrice ici, nous pouvons conclure que l'effet anti-inflammatoire de l'invalidation de l'AEP prime sur son effet délétère sur la régulation de l'efflux de cholestérol.

La plaque d'athérome est donc un ensemble complexe, son développement étant étendu dans le temps et présentant des phases caractéristiques. De la même manière que l'apoptose a des effets contraires sur le développement des lésions en fonction du stade de développement (Gautier EL. et al, Circulation 2009), on peut formuler l'hypothèse d'un effet phase-dépendant pour chaque mécanisme athéroprotecteur.

En particulier, les conclusions de l'étude 3 portent à confirmer que l'augmentation de la capacité d'efflux des macrophages est une stratégie peu efficace dans le cadre de plaques plus avancées, à cause de leur environnement très oxydatif pouvant agir sur la fonctionnalité des accepteurs. Au contraire, diminuer l'inflammation dans ces plaques et permet de changer leur phénotype. Une inflammation résolue permettra de d'augmenter la fibrose et le rapport chappe fibreuse/cœur nécrotique de la plaque, ce qui diminuera le risque de thrombose. La cytokine IL-10, important médiateur de la résolution de l'inflammation, est

associée chez l'homme à un pronostic favorable pour le développement de MCV (Heeschen C. et al, *Circulation* 2003).

Les désordres lipidiques et l'oxydation initient la mise en place des plaques et les maintiennent. Mais ensuite, c'est une inflammation aiguë et chronique, non résolue, et liée intimement aux deux autres composantes, qui serait le principal facteur de progression vers la thrombose. Il serait intéressant de savoir à quel stade de la maladie les thérapies macrophage-spécifique visant chaque mécanisme pourraient s'avérer optimales.

La provenance, la proportion et le phénotype de ces macrophages varie tout au cours de la maladie. Certaines études démontrent que les CMLs, passé un stade avancé de développement deviendraient les cellules principales de l'athérome, amplifiant la fibrose, stabilisant la plaque et en limitant l'accès à de nouvelles cellules circulantes, mais également l'émigration des macrophages (Allahverdian S. et al, *Trends Cardiovasc Med* 2010). Les macrophages du cœur lipidique, déjà spumeux et inflammatoires, prolifèrent possiblement via l'activation de NF- κ B à l'intérieur même de plaque, amplifiant encore davantage l'inflammation et la potentielle nécrose (Robbin CS. Et al, *Nat Med* 2013). Egalement, les CMLs ont la capacité, lorsque chargées en lipides oxydés et exposés aux nombreux stimuli inflammatoire, de se trans-différencier en macrophages – tout du moins d'acquérir un phénotype proche (CD68⁺ SM- α -actine⁻). Les études *in vitro* présentées ici peuvent difficilement être replacées dans ce contexte complexe : elles ont cependant l'avantage de décrypter les mécanismes un à un, dans un type cellulaire particulier, le macrophage. De plus, sans intégrer ces résultats aux régulations ayant lieu dans les CMLs, il est difficile de replacer ces résultats dans le contexte de la plaque avancée.

L'étude des voies de régulations intracellulaire des macrophages peut également être utile dans d'autres pathologies, telles que l'obésité notamment.

Cette transposition serait en effet intéressante dans le cadre de mes études, en particulier de celles sur l'AEP et l'inflammasome NLRP3. En effet, le tissu adipeux contient des macrophages résidents. Le développement de l'obésité, accumulation excessive de lipide dans le tissu adipeux, est accompagné d'un état d'inflammation chronique, de l'activation et l'accumulation de ces macrophages, et d'une insulino-résistance (Weisberg SP. Et al, *J Clin Inv* 2003). Récemment, il a été démontré que le tissu adipeux de patients obèse

contenait des macrophages spumeux, de manière analogue à l'athérosclérose. La présence de ces cellules spumeuses est corrélée positivement à d'autres facteurs de risque, notamment l'insulino-résistance et l'inflammation systémique (Shapiro H. et al, J Clin Endocr Metab 2013). De manière intéressante, l'activation de l'inflammasome NLRP3 a un rôle dans le déclenchement de l'inflammation au cours de l'obésité et le développement d'une insulino-résistance (Vandanmagsar B. et al, Nat Med 2011). Plus précisément, l'inflammasome NLRP3 est activé par le palmitate, un des acides gras saturés plasmatiques majeurs via l'induction d'un stress oxydant. L'inactivation totale et myéloïde-spécifique de NLRP3/ASC démontre une augmentation marquée de l'insulino résistance (Wen H. et al, Nat Immunol 2011). Ainsi, il serait intéressant de transposer dans le contexte cette maladie les mécanismes mis en évidence ici, et par exemple d'étudier l'impact de l'inactivation de l'AEP sur le développement de l'insulino-resistance, de l'inflammation et d'autres paramètres du syndrome métabolique en général.

BIBLIOGRAPHIE

- Abifadel, M., Elbitar, S., Khoury, P.E., Ghaleb, Y., Chémaly, M., Moussalli, M.-L., Rabès, J.-P., Varret, M., and Boileau, C. (2014). Living the PCSK9 Adventure: from the Identification of a New Gene in Familial Hypercholesterolemia Towards a Potential New Class of Anticholesterol Drugs. *Curr Atheroscler Rep* 16, 1–23.
- Abifadel, M., Varret, M., Rabès, J.-P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D., et al. (2003). Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* 34, 154–156.
- Accad, M., Smith, S.J., Newland, D.L., Sanan, D.A., King, L.E., Jr, Linton, M.F., Fazio, S., and Farese, R.V., Jr (2000). Massive xanthomatosis and altered composition of atherosclerotic lesions in hyperlipidemic mice lacking acyl CoA:cholesterol acyltransferase 1. *J. Clin. Invest.* 105, 711–719.
- Acton, S.L., Scherer, P.E., Lodish, H.F., and Krieger, M. (1994). Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J. Biol. Chem.* 269, 21003–21009.
- Adorni, M.P., Zimetti, F., Billheimer, J.T., Wang, N., Rader, D.J., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (2007). The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J. Lipid Res.* 48, 2453–2462.
- A-Gonzalez, N., Guillen, J.A., Gallardo, G., Diaz, M., de la Rosa, J.V., Hernandez, I.H., Casanova-Acebes, M., Lopez, F., Tabraue, C., Beceiro, S., et al. (2013). The nuclear receptor LXR α controls the functional specialization of splenic macrophages. *Nat. Immunol.* 14, 831–839.
- Aiello, R.J., Brees, D., Bourassa, P.-A., Royer, L., Lindsey, S., Coskran, T., Haghpasand, M., and Francone, O.L. (2002). Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 630–637.
- Ait-Oufella, H., Taleb, S., Mallat, Z., and Tedgui, A. (2011). Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 969–979.
- Ali, K., Middleton, M., Puré, E., and Rader, D.J. (2005). Apolipoprotein E Suppresses the Type I Inflammatory Response In Vivo. *Circulation Research* 97, 922–927.
- Allahverdian, S., and Francis, G.A. (2010). Cholesterol homeostasis and high-density lipoprotein formation in arterial smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc. Med.* 20, 96–102.
- Alpy, F., and Tomasetto, C. (2005). Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals. *J. Cell. Sci.* 118, 2791–2801.
- Amento, E.P., Ehsani, N., Palmer, H., and Libby, P. (1991). Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb.* 11, 1223–1230.
- Annema, W., Dijkers, A., Freark de Boer, J., Gautier, T., Rensen, P.C.N., Rader, D.J., and Tietge, U.J.F. (2012). ApoE promotes hepatic selective uptake but not RCT due to increased ABCA1-mediated cholesterol efflux to plasma. *J. Lipid Res.* 53, 929–940.
- Apostolakis, S., Vogiatzi, K., Amanatidou, V., and Spandidos, D.A. (2009). Interleukin 8 and cardiovascular disease. *Cardiovasc. Res.* 84, 353–360.
- Arai, H. (2014). Oxidative modification of lipoproteins. *Subcell. Biochem.* 77, 103–114.
- Assanasen, C., Mineo, C., Seetharam, D., Yuhanna, I.S., Marcel, Y.L., Connelly, M.A., Williams, D.L., de la Llera-Moya, M., Shaul, P.W., and Silver, D.L. (2005). Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling. *J. Clin. Invest.* 115, 969–977.

- Aubry, M.-C., Riehle, D.L., Edwards, W.D., Maradit-Kremers, H., Roger, V.L., Sebo, T.J., and Gabriel, S.E. (2004). B-Lymphocytes in plaque and adventitia of coronary arteries in two patients with rheumatoid arthritis and coronary atherosclerosis: preliminary observations. *Cardiovasc. Pathol.* **13**, 233–236.
- Aukrust, P., Yndestad, A., Smith, C., Ueland, T., Gullestad, L., and Damås, J.K. (2007). Chemokines in cardiovascular risk prediction. *Thromb. Haemost.* **97**, 748–754.
- Azuma, Y., Takada, M., Shin, H.-W., Kioka, N., Nakayama, K., and Ueda, K. (2009). Retroendocytosis pathway of ABCA1/apoA-I contributes to HDL formation. *Genes Cells* **14**, 191–204.
- Baitsch, D., Bock, H.H., Engel, T., Telgmann, R., Müller-Tidow, C., Varga, G., Bot, M., Herz, J., Robenek, H., von Eckardstein, A., et al. (2011). Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1160–1168.
- Baldán, Á., Pei, L., Lee, R., Tarr, P., Tangirala, R.K., Weinstein, M.M., Frank, J., Li, A.C., Tontonoz, P., and Edwards, P.A. (2006). Impaired Development of Atherosclerosis in Hyperlipidemic Ldlr^{-/-} and ApoE^{-/-} Mice Transplanted With Abcg1^{-/-} Bone Marrow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 2301–2307.
- Barry-Lane, P.A., Patterson, C., van der Merwe, M., Hu, Z., Holland, S.M., Yeh, E.T., and Runge, M.S. (2001). p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE^(-/-) mice. *J. Clin. Invest.* **108**, 1513–1522.
- Barstad, R.M., Hamers, M.J.A.G., Kierulf, P., Westvik, Å.-B., and Sakariassen, K.S. (1995). Procoagulant Human Monocytes Mediate Tissue Factor/Factor VIIa-Dependent Platelet-Thrombus Formation When Exposed to Flowing Nonanticoagulated Human Blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 11–16.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–233.
- Barter, P.J., Caulfield, M., Eriksson, M., Grundy, S.M., Kastelein, J.J.P., Komajda, M., Lopez-Sendon, J., Mosca, L., Tardif, J.-C., Waters, D.D., et al. (2007). Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N. Engl. J. Med.* **357**, 2109–2122.
- Barthwal, M.K., Anzinger, J.J., Xu, Q., Bohnacker, T., Wymann, M.P., and Kruth, H.S. (2013). Fluid-phase pinocytosis of native low density lipoprotein promotes murine M-CSF differentiated macrophage foam cell formation. *PLoS ONE* **8**, e58054.
- Basurto-Islas, G., Grundke-Iqbal, I., Tung, Y.C., Liu, F., and Iqbal, K. (2013). Activation of asparaginyl endopeptidase leads to Tau hyperphosphorylation in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **288**, 17495–17507.
- Bauernfeind, F.G., Horvath, G., Stutz, A., Alnemri, E.S., MacDonald, K., Speert, D., Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Monks, B.G., Fitzgerald, K.A., et al. (2009). Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* **183**, 787–791.
- Beh, C.T., Alfaro, G., Duamel, G., Sullivan, D.P., Kersting, M.C., Dighe, S., Kozminski, K.G., and Menon, A.K. (2009). Yeast oxysterol-binding proteins: sterol transporters or regulators of cell polarization? *Mol. Cell. Biochem.* **326**, 9–13.
- Beh, C.T., and Rine, J. (2004). A role for yeast oxysterol-binding protein homologs in endocytosis and in the maintenance of intracellular sterol-lipid distribution. *J. Cell. Sci.* **117**, 2983–2996.
- Beh, C.T., Cool, L., Phillips, J., and Rine, J. (2001). Overlapping functions of the yeast oxysterol-binding protein homologues. *Genetics* **157**, 1117–1140.
- Berrougui, H., Loued, S., and Khalil, A. (2012). Purified human paraoxonase-1 interacts with plasma membrane lipid rafts and mediates cholesterol efflux from macrophages. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 1372–1381.
- Bischoff, E.D., Daige, C.L., Petrowski, M., Dedman, H., Pattison, J., Juliano, J., Li, A.C., and Schulman, I.G. (2010). Non-redundant roles for LXRA and LXRbeta in atherosclerosis susceptibility in low density lipoprotein receptor knockout mice. *J. Lipid Res.* **51**, 900–906.

Björkbacka, H., Kunjathoor, V.V., Moore, K.J., Koehn, S., Ordija, C.M., Lee, M.A., Means, T., Halmen, K., Luster, A.D., Golenbock, D.T., et al. (2004). Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat. Med.* 10, 416–421.

Blankenberg, S., Tiret, L., Bickel, C., Peetz, D., Cambien, F., Meyer, J., Rupprecht, H.J., and AtheroGene Investigators (2002). Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation* 106, 24–30.

Bode, W., Engh, R., Musil, D., Laber, B., Stubbs, M., Huber, R., and Turk, V. (1990). Mechanism of interaction of cysteine proteinases and their protein inhibitors as compared to the serine proteinase-inhibitor interaction. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371 Suppl, 111–118.

Böger, C.A., Fischereder, M., Deinzer, M., Aslanidis, C., Schmitz, G., Stubanus, M., Banas, B., Krüger, B., Riegger, G.A.J., and Krämer, B.K. (2005). RANTES gene polymorphisms predict all-cause and cardiac mortality in type 2 diabetes mellitus hemodialysis patients. *Atherosclerosis* 183, 121–129.

Bories, G., Colin, S., Vanhoutte, J., Derudas, B., Copin, C., Fanchon, M., Daoudi, M., Belloy, L., Haulon, S., Zawadzki, C., et al. (2013). Liver X Receptor Activation Stimulates Iron Export in Human Alternative Macrophages. *Circulation Research* 113, 1196–1205.

Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I.F. (1998). Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394, 894–897.

Bouhassani, M.E., Gilibert, S., Moreau, M., Saint-Charles, F., Tréguier, M., Poti, F., Chapman, M.J., Goff, W.L., Lesnik, P., and Huby, T. (2011). Cholesteryl Ester Transfer Protein Expression Partially Attenuates the Adverse Effects of SR-BI Receptor Deficiency on Cholesterol Metabolism and Atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 286, 17227–17238.

Boyle, J.J., Weissberg, P.L., and Bennett, M.R. (2003). Tumor necrosis factor- α promotes macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis by direct and autocrine mechanisms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1553–1558.

Bradley, M.N., Hong, C., Chen, M., Joseph, S.B., Wilpitz, D.C., Wang, X., Lusis, A.J., Collins, A., Hseuh, W.A., Collins, J.L., et al. (2007). Ligand activation of LXR beta reverses atherosclerosis and cellular cholesterol overload in mice lacking LXR alpha and apoE. *J. Clin. Invest.* 117, 2337–2346.

Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P.A., and Neumeier, D. (1996). Activated transcription factor nuclear factor- κ B is present in the atherosclerotic lesion. *J. Clin. Invest.* 97, 1715–1722.

Brånén, L., Hovgaard, L., Nitulescu, M., Bengtsson, E., Nilsson, J., and Jovinge, S. (2004). Inhibition of tumor necrosis factor- α reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 2137–2142.

Brasaemle, D.L. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* 48, 2547–2559.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2009). Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S15–27.

Brundert, M., Heeren, J., Bahar-Bayansar, M., Ewert, A., Moore, K.J., and Rinninger, F. (2006). Selective uptake of HDL cholesteryl esters and cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages independent of SR-BI. *J. Lipid Res.* 47, 2408–2421.

Bultel, S., Helin, L., Clavey, V., Chinetti-Gbaguidi, G., Rigamonti, E., Colin, M., Fruchart, J.-C., Staels, B., and Lestavel, S. (2008). Liver X receptor activation induces the uptake of cholesteryl esters from high density lipoproteins in primary human macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 2288–2295.

- Buono, C., Binder, C.J., Stavrakis, G., Witztum, J.L., Glimcher, L.H., and Lichtman, A.H. (2005). T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 1596–1601.
- Burleigh, M.E., Babaev, V.R., Oates, J.A., Harris, R.C., Gautam, S., Riendeau, D., Marnett, L.J., Morrow, J.D., Fazio, S., and Linton, M.F. (2002). Cyclooxygenase-2 Promotes Early Atherosclerotic Lesion Formation in LDL Receptor-Deficient Mice. *Circulation* *105*, 1816–1823.
- Bursill, C.A., Castro, M.L., Beattie, D.T., Nakhla, S., van der Vorst, E., Heather, A.K., Barter, P.J., and Rye, K.-A. (2010). High-density lipoproteins suppress chemokines and chemokine receptors in vitro and in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 1773–1778.
- Cai, L., Wang, Z., Meyer, J.M., Ji, A., and van der Westhuyzen, D.R. (2012). Macrophage SR-BI regulates LPS-induced pro-inflammatory signaling in mice and isolated macrophages. *J. Lipid Res.* *53*, 1472–1481.
- Camont, L., Lhomme, M., Rached, F., Le Goff, W., Nègre-Salvayre, A., Salvayre, R., Calzada, C., Lagarde, M., Chapman, M.J., and Kontush, A. (2013). Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 2715–2723.
- Cao, S., Zhang, X., Edwards, J.P., and Mosser, D.M. (2006). NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* *281*, 26041–26050.
- Cardaba, C.M., Kerr, J.S., and Mueller, A. (2008). CCR5 internalisation and signalling have different dependence on membrane lipid raft integrity. *Cell. Signal.* *20*, 1687–1694.
- Carter, A.B., Tephly, L.A., and Hunninghake, G.W. (2001). The absence of activator protein 1-dependent gene expression in THP-1 macrophages stimulated with phorbol esters is due to lack of p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* *276*, 33826–33832.
- Cathcart, M.K., Morel, D.W., and Chisolm, G.M., 3rd (1985). Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. *J. Leukoc. Biol.* *38*, 341–350.
- Chan, D.C., Ng, T.W.K., and Watts, G.F. (2012). Apolipoprotein A-II: evaluating its significance in dyslipidaemia, insulin resistance, and atherosclerosis. *Ann. Med.* *44*, 313–324.
- Chapman, C.M.L., McQuillan, B.M., Beilby, J.P., Thompson, P.L., and Hung, J. (2006). Interleukin-18 levels are not associated with subclinical carotid atherosclerosis in a community population. The Perth Carotid Ultrasound Disease Assessment Study (CUDAS). *Atherosclerosis* *189*, 414–419.
- Chase, A.J., Bond, M., Crook, M.F., and Newby, A.C. (2002). Role of Nuclear Factor- κ B Activation in Metalloproteinase-1, -3, and -9 Secretion by Human Macrophages In Vitro and Rabbit Foam Cells Produced In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *22*, 765–771.
- Chatzizisis, Y.S., Blankstein, R., and Libby, P. (2014). Inflammation goes with the flow: implications for non-invasive identification of high-risk plaque. *Atherosclerosis* *234*, 476–478.
- Chen, W., Silver, D.L., Smith, J.D., and Tall, A.R. (2000). Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1- mediated cholesterol efflux in macrophages. *J. Biol. Chem.* *275*, 30794–30800.
- Cheng, C.-C., Hsueh, C.-M., Chen, C.-Y., Chen, T.-H., and Hsu, S.-L. (2013). Interleukin-6 upregulates paraoxonase 1 gene expression via an AKT/NF- κ B-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *437*, 55–61.
- Chinetti-Gbaguidi, G., Baron, M., Bouhlef, M.A., Vanhoutte, J., Copin, C., Sebti, Y., Derudas, B., Mayi, T., Bories, G., Tailleux, A., et al. (2011a). Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPAR γ and LXR α pathways. *Circ. Res.* *108*, 985–995.

- Choi, S.-H., Harkewicz, R., Lee, J.H., Boullier, A., Almazan, F., Li, A.C., Witztum, J.L., Bae, Y.S., and Miller, Y.I. (2009). Lipoprotein accumulation in macrophages via toll-like receptor-4-dependent fluid phase uptake. *Circ. Res.* *104*, 1355–1363.
- Cimato, T.R., Palka, B.A., Lang, J.K., and Young, R.F. (2013). LDL cholesterol modulates human CD34+ HSPCs through effects on proliferation and the IL-17 G-CSF axis. *PLoS ONE* *8*, e73861.
- Cimato, T.R., Palka, B.A., Lang, J.K., and Young, R.F. (2013). LDL cholesterol modulates human CD34+ HSPCs through effects on proliferation and the IL-17 G-CSF axis. *PLoS ONE* *8*, e73861.
- Cipollone, F., Cicolini, G., and Bucci, M. (2008). Cyclooxygenase and prostaglandin synthases in atherosclerosis: recent insights and future perspectives. *Pharmacol. Ther.* *118*, 161–180.
- Cipollone, F., Prontera, C., Pini, B., Marini, M., Fazio, M., De Cesare, D., Iezzi, A., Uccino, S., Boccoli, G., Saba, V., et al. (2001). Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation* *104*, 921–927.
- Cipriani, S., Francisci, D., Mencarelli, A., Renga, B., Schiaroli, E., D'Amore, C., Baldelli, F., and Fiorucci, S. (2013). Efficacy of the CCR5 antagonist maraviroc in reducing early, ritonavir-induced atherogenesis and advanced plaque progression in mice. *Circulation* *127*, 2114–2124.
- Civelek, M., Manduchi, E., Riley, R.J., Stoeckert, C.J., and Davies, P.F. (2009). Chronic endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response in arterial endothelium in regions of susceptibility to atherosclerosis. *Circ. Res.* *105*, 453–461.
- Clarke, M.C.H., Figg, N., Maguire, J.J., Davenport, A.P., Goddard, M., Littlewood, T.D., and Bennett, M.R. (2006). Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat. Med.* *12*, 1075–1080.
- Cole, J.E., Kassiteridi, C., and Monaco, C. (2013). Toll-like receptors in atherosclerosis: a “Pandora’s box” of advances and controversies. *Trends Pharmacol. Sci.* *34*, 629–636.
- Combadière, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2008). Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation* *117*, 1649–1657.
- Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A.R. (2000). Sterol-dependent Transactivation of the ABC1 Promoter by the Liver X Receptor/Retinoid X Receptor. *J. Biol. Chem.* *275*, 28240–28245.
- Covey, S.D., Krieger, M., Wang, W., Penman, M., and Trigatti, B.L. (2003). Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *23*, 1589–1594.
- Crişan, T.O., Plantinga, T.S., van de Veerdonk, F.L., Farcaş, M.F., Stoffels, M., Kullberg, B.-J., van der Meer, J.W.M., Joosten, L.A.B., and Netea, M.G. (2011). Inflammasome-independent modulation of cytokine response by autophagy in human cells. *PLoS ONE* *6*, e18666.
- Curtiss, L.K., and Boisvert, W.A. (2000). Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* *11*, 243–251.
- Curtiss, L.K., and Tobias, P.S. (2007). The toll of Toll-like receptors, especially toll-like receptor 2, on murine atherosclerosis. *Curr Drug Targets* *8*, 1230–1238.
- Cziraky, M.J., Watson, K.E., and Talbert, R.L. (2008). Targeting low HDL-cholesterol to decrease residual cardiovascular risk in the managed care setting. *J Manag Care Pharm* *14*, S3–28; quiz S30–31.
- Dansky, H.M., Charlton, S.A., Harper, M.M., and Smith, J.D. (1997). T and B lymphocytes play a minor role in atherosclerotic plaque formation in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 4642–4646.

- Davidson, W.S., Gillotte, K.L., Lund-Katz, S., Johnson, W.J., Rothblat, G.H., and Phillips, M.C. (1995). The effect of high density lipoprotein phospholipid acyl chain composition on the efflux of cellular free cholesterol. *J. Biol. Chem.* **270**, 5882–5890.
- Davies, J.P., and Ioannou, Y.A. (2000a). Topological analysis of Niemann-Pick C1 protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activating protein. *J. Biol. Chem.* **275**, 24367–24374.
- Davies, M.J. (1996). Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* **94**, 2013–2020.
- Davis, H.R., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Maguire, M., Zhu, L., Graziano, M.P., and Altmann, S.W. (2007). Deficiency of Niemann-Pick C1 Like 1 prevents atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 841–849.
- De la Llera-Moya, M., Rothblat, G.H., Connelly, M.A., Kellner-Weibel, G., Sakr, S.W., Phillips, M.C., and Williams, D.L. (1999). Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. *J. Lipid Res.* **40**, 575–580.
- Deguchi, J.-O., Aikawa, E., Libby, P., Vachon, J.R., Inada, M., Krane, S.M., Whittaker, P., and Aikawa, M. (2005). Matrix metalloproteinase-13/collagenase-3 deletion promotes collagen accumulation and organization in mouse atherosclerotic plaques. *Circulation* **112**, 2708–2715.
- Depre, C., Havaux, X., Renkin, J., Vanoverschelde, J.L., and Wijns, W. (1999a). Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc. Res.* **41**, 465–472.
- Depre, C., Havaux, X., Renkin, J., Vanoverschelde, J.L., and Wijns, W. (1999b). Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc. Res.* **41**, 465–472.
- Desurmont, C., Caillaud, J.-M., Emmanuel, F., Benoit, P., Fruchart, J.C., Castro, G., Branellec, D., Heard, J.-M., and Duverger, N. (2000). Complete Atherosclerosis Regression After Human ApoE Gene Transfer in ApoE-Deficient/Nude Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 435–442.
- Devlin, C.M., Kuriakose, G., Hirsch, E., and Tabas, I. (2002). Genetic alterations of IL-1 receptor antagonist in mice affect plasma cholesterol level and foam cell lesion size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6280–6285.
- Dollery, C.M., and Libby, P. (2006). Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc. Res.* **69**, 625–635.
- Doran, A.C., Lipinski, M.J., Oldham, S.N., Garmey, J.C., Campbell, K.A., Skafien, M.D., Cutchins, A., Lee, D.J., Glover, D.K., Kelly, K.A., et al. (2012). B-cell aortic homing and atheroprotection depend on Id3. *Circ. Res.* **110**, e1–12.
- Döring, Y., Manthey, H.D., Drechsler, M., Lievens, D., Megens, R.T.A., Soehnlein, O., Busch, M., Manca, M., Koenen, R.R., Pelisek, J., et al. (2012). Auto-antigenic protein-DNA complexes stimulate plasmacytoid dendritic cells to promote atherosclerosis. *Circulation* **125**, 1673–1683.
- Drechsler, M., Megens, R.T.A., van Zandvoort, M., Weber, C., and Soehnlein, O. (2010). Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation* **122**, 1837–1845.
- Duan, H., Li, Z., and Mazzone, T. (1995). Tumor necrosis factor- α modulates monocyte/macrophage apoprotein E gene expression. *J. Clin. Invest.* **96**, 915–922.
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., et al. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357–1361.

Duong, P.T., Collins, H.L., Nickel, M., Lund-Katz, S., Rothblat, G.H., and Phillips, M.C. (2006a). Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-I. *J. Lipid Res.* 47, 832–843.

Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. (2009). Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect.* 11, 1050–1062.

Eckardstein, A.V., Langer, C., Engel, T., Schaukal, I., Cignarella, A., Reinhardt, J., Lorkowski, S., Li, Z., Zhou, X., Cullen, P., et al. (2001). ATP binding cassette transporter ABCA1 modulates the secretion of apolipoprotein E from human monocyte-derived macrophages. *FASEB J* 15, 1555–1561.

Elhage, R., Jawien, J., Rudling, M., Ljunggren, H.-G., Takeda, K., Akira, S., Bayard, F., and Hansson, G.K. (2003). Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc. Res.* 59, 234–240.

Elhage, R., Maret, A., Pieraggi, M.T., Thiers, J.C., Arnal, J.F., and Bayard, F. (1998). Differential effects of interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein on fatty-streak formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 97, 242–244.

Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.

Endemann, G., Stanton, L.W., Madden, K.S., Bryant, C.M., White, R.T., and Protter, A.A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 268, 11811–11816.

Engel, T., Lueken, A., Bode, G., Hobohm, U., Lorkowski, S., Schlueter, B., Rust, S., Cullen, P., Pech, M., Assmann, G., et al. (2004). ADP-ribosylation factor (ARF)-like 7 (ARL7) is induced by cholesterol loading and participates in apolipoprotein AI-dependent cholesterol export. *FEBS Lett.* 566, 241–246.

Fabunmi, R.P., Sukhova, G.K., Sugiyama, S., and Libby, P. (1998). Expression of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3 in Human Atheroma and Regulation in Lesion-Associated Cells A Potential Protective Mechanism in Plaque Stability. *Circulation Research* 83, 270–278.

Fazio, S., Babaev, V.R., Burleigh, M.E., Major, A.S., Hasty, A.H., and Linton, M.F. (2002a). Physiological expression of macrophage apoE in the artery wall reduces atherosclerosis in severely hyperlipidemic mice. *J. Lipid Res.* 43, 1602–1609.

Feig, J.E., Pineda-Torra, I., Sanson, M., Bradley, M.N., Vengrenyuk, Y., Bogunovic, D., Gautier, E.L., Rubinstein, D., Hong, C., Liu, J., et al. (2010). LXR promotes the maximal egress of monocyte-derived cells from mouse aortic plaques during atherosclerosis regression. *J. Clin. Invest.* 120, 4415–4424.

Feig, J.E., Rong, J.X., Shamir, R., Sanson, M., Vengrenyuk, Y., Liu, J., Rayner, K., Moore, K., Garabedian, M., and Fisher, E.A. (2011a). HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 7166–7171.

Feig, J.E., Shang, Y., Rotllan, N., Vengrenyuk, Y., Wu, C., Shamir, R., Torra, I.P., Fernandez-Hernando, C., Fisher, E.A., and Garabedian, M.J. (2011b). Statins promote the regression of atherosclerosis via activation of the CCR7-dependent emigration pathway in macrophages. *PLoS ONE* 6, e28534.

Feng, B., Yao, P.M., Li, Y., Devlin, C.M., Zhang, D., Harding, H.P., Sweeney, M., Rong, J.X., Kuriakose, G., Fisher, E.A., et al. (2003). The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat. Cell Biol.* 5, 781–792.

Fernández-Hernando, C., Yu, J., Dávalos, A., Prendergast, J., and Sessa, W.C. (2010). Endothelial-Specific Overexpression of Caveolin-1 Accelerates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *The American Journal of Pathology* 177, 998–1003.

Fernández-Hernando, C., Yu, J., Suárez, Y., Rahner, C., Dávalos, A., Lasunción, M.A., and Sessa, W.C. (2009). Genetic evidence supporting a critical role of endothelial caveolin-1 during the progression of atherosclerosis. *Cell Metab.* 10, 48–54.

- Ferreira, V., van Dijk, K.W., Groen, A.K., Vos, R.M., van der Kaa, J., Gijbels, M.J.J., Havekes, L.M., and Pannekoek, H. (2007). Macrophage-specific inhibition of NF-kappaB activation reduces foam-cell formation. *Atherosclerosis* 192, 283–290.
- Fisslthaler, B., Loot, A.E., Mohamed, A., Busse, R., and Fleming, I. (2008). Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by proline-rich tyrosine kinase 2 in response to fluid shear stress and insulin. *Circ. Res.* 102, 1520–1528.
- Fleetwood, A.J., Dinh, H., Cook, A.D., Hertzog, P.J., and Hamilton, J.A. (2009). GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on Type I interferon signaling. *J Leukoc Biol* 86, 411–421.
- Fontaine, C., Rigamonti, E., Nohara, A., Gervois, P., Teissier, E., Fruchart, J.-C., Staels, B., and Chinetti-Gbaguidi, G. (2007). Liver X receptor activation potentiates the lipopolysaccharide response in human macrophages. *Circ. Res.* 101, 40–49.
- Fontaine, C., Rigamonti, E., Pourcet, B., Duez, H., Duhem, C., Fruchart, J.-C., Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2008). The nuclear receptor Rev-erbalpha is a liver X receptor (LXR) target gene driving a negative feedback loop on select LXR-induced pathways in human macrophages. *Mol. Endocrinol.* 22, 1797–1811.
- Fournier, N., Atger, V., Paul, J.L., Sturm, M., Duverger, N., Rothblat, G.H., and Moatti, N. (2000). Human ApoA-IV overexpression in transgenic mice induces cAMP-stimulated cholesterol efflux from J774 macrophages to whole serum. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1283–1292.
- Franchi, L., Kanneganti, T.-D., Dubyak, G.R., and Núñez, G. (2007). Differential requirement of P2X7 receptor and intracellular K⁺ for caspase-1 activation induced by intracellular and extracellular bacteria. *J. Biol. Chem.* 282, 18810–18818.
- Frank, P.G., Lee, H., Park, D.S., Tandon, N.N., Scherer, P.E., and Lisanti, M.P. (2004). Genetic Ablation of Caveolin-1 Confers Protection Against Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 98–105.
- Freeman, M.W. (1997). Scavenger receptors in atherosclerosis. *Curr. Opin. Hematol.* 4, 41–47.
- Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B.G., Jensen, G.B., and Tybjaerg-Hansen, A. (2004a). Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. *J. Clin. Invest.* 114, 1343–1353.
- Frisdal, E., Lesnik, P., Olivier, M., Robillard, P., Chapman, M.J., Huby, T., Guerin, M., and Le Goff, W. (2011). Interleukin-6 protects human macrophages from cellular cholesterol accumulation and attenuates the proinflammatory response. *J. Biol. Chem.* 286, 30926–30936.
- Fuhrman, B., Volkova, N., and Aviram, M. (2002). Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis* 161, 307–316.
- Funk, S.D., and Orr, A.W. (2013). Ephs and ephrins resurface in inflammation, immunity, and atherosclerosis. *Pharmacol. Res.* 67, 42–52.
- Furuyama, S., Uehara, Y., Zhang, B., Baba, Y., Abe, S., Iwamoto, T., Miura, S.-I., and Saku, K. (2009). Genotypic Effect of ABCG1 gene promoter -257T>G polymorphism on coronary artery disease severity in Japanese men. *J. Atheroscler. Thromb.* 16, 194–200.
- Gage, J., Hasu, M., Thabet, M., and Whitman, S.C. (2012a). Caspase-1 deficiency decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Can J Cardiol* 28, 222–229.
- Gage, J., Hasu, M., Thabet, M., and Whitman, S.C. (2012b). Caspase-1 deficiency decreases atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Can J Cardiol* 28, 222–229.

- Galetto, R., Albajar, M., Polanco, J.I., Zakin, M.M., and Rodríguez-Rey, J.C. (2001). Identification of a peroxisome-proliferator-activated-receptor response element in the apolipoprotein E gene control region. *Biochem. J.* 357, 521–527.
- Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Kränzhöfer, R., Clark, S., and Libby, P. (1995). Macrophage foam cells from experimental atheroma constitutively produce matrix-degrading proteinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 402–406.
- Gallardo-Soler, A., Gómez-Nieto, C., Campo, M.L., Marathe, C., Tontonoz, P., Castrillo, A., and Corraliza, I. (2008). Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. *Mol. Endocrinol.* 22, 1394–1402.
- Gareus, R., Kotsaki, E., Xanthoulea, S., van der Made, I., Gijbels, M.J.J., Kardakaris, R., Polykratis, A., Kollias, G., de Winther, M.P.J., and Pasparakis, M. (2008). Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis. *Cell Metab.* 8, 372–383.
- Gaudreault, N., Kumar, N., Posada, J.M., Stephens, K.B., Reyes de Mochel, N.S., Eberlé, D., Olivas, V.R., Kim, R.Y., Harms, M.J., Johnson, S., et al. (2012). ApoE suppresses atherosclerosis by reducing lipid accumulation in circulating monocytes and the expression of inflammatory molecules on monocytes and vascular endothelium. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 264–272.
- Gaus, K., Gooding, J.J., Dean, R.T., Kritharides, L., and Jessup, W. (2001). A kinetic model to evaluate cholesterol efflux from THP-1 macrophages to apolipoprotein A-1. *Biochemistry* 40, 9363–9373.
- Gaus, K., Kritharides, L., Schmitz, G., Boettcher, A., Drobnik, W., Langmann, T., Quinn, C.M., Death, A., Dean, R.T., and Jessup, W. (2004). Apolipoprotein A-1 interaction with plasma membrane lipid rafts controls cholesterol export from macrophages. *FASEB J.* 18, 574–576.
- Gaus, K., Rodriguez, M., Ruberu, K.R., Gelissen, I., Sloane, T.M., Kritharides, L., and Jessup, W. (2005). Domain-specific lipid distribution in macrophage plasma membranes. *J. Lipid Res.* 46, 1526–1538.
- Gautier, E.L., Huby, T., Ouzilleau, B., Doucet, C., Saint-Charles, F., Gremy, G., Chapman, M.J., and Lesnik, P. (2007). Enhanced immune system activation and arterial inflammation accelerates atherosclerosis in lupus-prone mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1625–1631.
- Gautier, E.L., Huby, T., Saint-Charles, F., Ouzilleau, B., Pirault, J., Deswaerte, V., Ginhoux, F., Miller, E.R., Witztum, J.L., Chapman, M.J., et al. (2009). Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis. *Circulation* 119, 2367–2375.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity* 19, 71–82.
- Gelissen, I.C., Harris, M., Rye, K.-A., Quinn, C., Brown, A.J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L., and Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1 Synergize to Mediate Cholesterol Export to ApoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 534–540.
- Gerbod-Giannone, M.-C., Li, Y., Holleboom, A., Han, S., Hsu, L.-C., Tabas, I., and Tall, A.R. (2006). TNFalpha induces ABCA1 through NF-kappaB in macrophages and in phagocytes ingesting apoptotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3112–3117.
- Ghisletti, S., Huang, W., Jepsen, K., Benner, C., Hardiman, G., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2009). Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes Dev.* 23, 681–693.
- Ghisletti, S., Huang, W., Ogawa, S., Pascual, G., Lin, M.-E., Willson, T.M., Rosenfeld, M.G., and Glass, C.K. (2007). Parallel SUMOylation-dependent pathways mediate gene- and signal-specific transrepression by LXRs and PPARgamma. *Mol. Cell* 25, 57–70.

- Ghosh, S., Zhao, B., Bie, J., and Song, J. (2010). Macrophage cholesteryl ester mobilization and atherosclerosis. *Vascul. Pharmacol.* 52, 1–10.
- Gilbert, J., Lekstrom-Himes, J., Donaldson, D., Lee, Y., Hu, M., Xu, J., Wyant, T., Davidson, M., and MLN1202 Study Group (2011). Effect of CC chemokine receptor 2 CCR2 blockade on serum C-reactive protein in individuals at atherosclerotic risk and with a single nucleotide polymorphism of the monocyte chemoattractant protein-1 promoter region. *Am. J. Cardiol.* 107, 906–911.
- Gilibert, S., Galle-Treger, L., Moreau, M., Saint-Charles, F., Costa, S., Ballaire, R., Couvert, P., Carrié, A., Lesnik, P., and Huby, T. (2014). Adrenocortical Scavenger Receptor Class B Type I Deficiency Exacerbates Endotoxic Shock and Precipitates Sepsis-Induced Mortality in Mice. *J Immunol* 1303164.
- Gillotte-Taylor, K., Boullier, A., Witztum, J.L., Steinberg, D., and Quehenberger, O. (2001). Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 42, 1474–1482.
- Girard, E., Chmest, D., Fournier, N., Johannes, L., Paul, J.-L., Védie, B., and Lamaze, C. (2014). Rab7 Is Functionally Required for Selective Cargo Sorting at the Early Endosome: Early Endosomal Sorting by Rab7. *Traffic* 15, 309–326.
- Girard, E., Paul, J.L., Fournier, N., Beaune, P., Johannes, L., Lamaze, C., and Védie, B. (2011). The Dynamin Chemical Inhibitor Dynasore Impairs Cholesterol Trafficking and Sterol-Sensitive Genes Transcription in Human HeLa Cells and Macrophages. *PLoS ONE* 6, e29042.
- Glass, C.K., and Witztum, J.L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104, 503–516.
- Glomset, J.A., and Wright, J.L. (1964). SOME PROPERTIES OF A CHOLESTEROL ESTERIFYING ENZYME IN HUMAN PLASMA. *Biochim. Biophys. Acta* 89, 266–276.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1977). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.* 46, 897–930.
- Gomes, A.L., Carvalho, T., Serpa, J., Torre, C., and Dias, S. (2010). Hypercholesterolemia promotes bone marrow cell mobilization by perturbing the SDF-1: CXCR4 axis. *Blood* 115, 3886–3894.
- Goossens, P., Gijbels, M.J.J., Zernecke, A., Eijgelaar, W., Vergouwe, M.N., van der Made, I., Vanderlocht, J., Beckers, L., Buurman, W.A., Daemen, M.J.A.P., et al. (2010). Myeloid type I interferon signaling promotes atherosclerosis by stimulating macrophage recruitment to lesions. *Cell Metab.* 12, 142–153.
- Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593–604.
- Gotto, A.M., and Moon, J.E. (2012). Recent clinical studies of the effects of lipid-modifying therapies. *Am. J. Cardiol.* 110, 15A–26A.
- Graf, G.A., Connell, P.M., van der Westhuyzen, D.R., and Smart, E.J. (1999). The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol ethers into caveolae. *J. Biol. Chem.* 274, 12043–12048.
- Graf, G.A., Yu, L., Li, W.-P., Gerard, R., Tuma, P.L., Cohen, J.C., and Hobbs, H.H. (2003). ABCG5 and ABCG8 Are Obligate Heterodimers for Protein Trafficking and Biliary Cholesterol Excretion. *J. Biol. Chem.* 278, 48275–48282.
- Guo, J., Van Eck, M., Twisk, J., Maeda, N., Benson, G.M., Groot, P.H.E., and Van Berkel, T.J.C. (2003). Transplantation of monocyte CC-chemokine receptor 2-deficient bone marrow into ApoE3-Leiden mice inhibits atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 447–453.
- Haas, M.J., and Mooradian, A.D. (2011). Inflammation, high-density lipoprotein and cardiovascular dysfunction. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 24, 265–272.

- Haidar, B., Kiss, R.S., Sarov-Blat, L., Brunet, R., Harder, C., McPherson, R., and Marcel, Y.L. (2006). Cathepsin D, a lysosomal protease, regulates ABCA1-mediated lipid efflux. *J. Biol. Chem.* **281**, 39971–39981.
- Hajra, L., Evans, A.I., Chen, M., Hyduk, S.J., Collins, T., and Cybulsky, M.I. (2000). The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 9052–9057.
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J., and Golenbock, D.T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat. Immunol.* **9**, 857–865.
- Han, X., Kitamoto, S., Wang, H., and Boisvert, W.A. (2010). Interleukin-10 overexpression in macrophages suppresses atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *FASEB J.* **24**, 2869–2880.
- Hanna, R.N., Carlin, L.M., Hubbeling, H.G., Nackiewicz, D., Green, A.M., Punt, J.A., Geissmann, F., and Hedrick, C.C. (2011). The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁺ monocytes. *Nat. Immunol.* **12**, 778–785.
- Hannuksela, M.L., Brousseau, M.E., Meyn, S.M., Nazih, H., Bader, G., Shamburek, R.D., Alaupovic, P., and Brewer, H.B. (2002). In vivo metabolism of apolipoprotein E within the HDL subpopulations LpE, LpE:A-I, LpE:A-II and LpE:A-I:A-II. *Atherosclerosis* **165**, 205–220.
- Hara-Nishimura, I., Takeuchi, Y., and Nishimura, M. (1993). Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*. *Plant Cell* **5**, 1651–1659.
- Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* **18**, 2195–2224.
- He, X., Mekasha, S., Mavrogiorgos, N., Fitzgerald, K.A., Lien, E., and Ingalls, R.R. (2010). Inflammation and fibrosis during *Chlamydia pneumoniae* infection is regulated by IL-1 and the NLRP3/ASC inflammasome. *J. Immunol.* **184**, 5743–5754.
- Henriksen, T., Evensen, S.A., and Carlander, B. (1979). Injury to human endothelial cells in culture induced by low density lipoproteins. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **39**, 361–368.
- Henriksen, T., Mahoney, E.M., and Steinberg, D. (1981). Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 6499–6503.
- Hewing, B., Parathath, S., Barrett, T., Chung, W.K.K., Astudillo, Y.M., Hamada, T., Ramkhalawon, B., Tallant, T.C., Yusufshah, M.S.S., Didonato, J.A., et al. (2014). Effects of native and myeloperoxidase-modified apolipoprotein a-I on reverse cholesterol transport and atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 779–789.
- Hong, C., Walczak, R., Dhamko, H., Bradley, M.N., Marathe, C., Boyadjian, R., Salazar, J.V., and Tontonoz, P. (2011). Constitutive activation of LXR in macrophages regulates metabolic and inflammatory gene expression: identification of ARL7 as a direct target. *J. Lipid Res.* **52**, 531–539.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono, H., Rock, K.L., Fitzgerald, K.A., and Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat. Immunol.* **9**, 847–856.
- Horton, J.D., Shah, N.A., Warrington, J.A., Anderson, N.N., Park, S.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 12027–12032.
- Hozoji-Inada, M., Munehira, Y., Nagao, K., Kioka, N., and Ueda, K. (2011). Liver X receptor beta (LXRbeta) interacts directly with ATP-binding cassette A1 (ABCA1) to promote high density lipoprotein formation during acute cholesterol accumulation. *J. Biol. Chem.* **286**, 20117–20124.

- Hu, X., Li, S., Wu, J., Xia, C., and Lala, D.S. (2003). Liver X receptors interact with corepressors to regulate gene expression. *Mol. Endocrinol.* **17**, 1019–1026.
- Hua, Y., and Nair, S. (2014). Proteases in cardiometabolic diseases: Pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications. *Biochim. Biophys. Acta*.
- Huang, W., Ishii, I., Zhang, W.-Y., Sonobe, M., and Kruth, H.S. (2002). PMA activation of macrophages alters macrophage metabolism of aggregated LDL. *J. Lipid Res.* **43**, 1275–1282.
- Huang, Y., DiDonato, J.A., Levison, B.S., Schmitt, D., Li, L., Wu, Y., Buffa, J., Kim, T., Gerstenecker, G.S., Gu, X., et al. (2014). An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. *Nat. Med.* **20**, 193–203.
- Huber, S.A., Sakkinen, P., Conze, D., Hardin, N., and Tracy, R. (1999). Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 2364–2367.
- Huby, T., Doucet, C., Dachet, C., Ouzilleau, B., Ueda, Y., Afzal, V., Rubin, E., Chapman, M.J., and Lesnik, P. (2006). Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *J. Clin. Invest.* **116**, 2767–2776.
- Hussain, M.M., Kancha, R.K., Zhou, Z., Luchoomun, J., Zu, H., and Bakillah, A. (1996). Chylomicron assembly and catabolism: role of apolipoproteins and receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1300**, 151–170.
- Igarashi, M., Osuga, J., Uozaki, H., Sekiya, M., Nagashima, S., Takahashi, M., Takase, S., Takanashi, M., Li, Y., Ohta, K., et al. (2010). The critical role of neutral cholesterol ester hydrolase 1 in cholesterol removal from human macrophages. *Circ. Res.* **107**, 1387–1395.
- Ikonen, E. (2008). Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 125–138.
- Ishibashi, M., Filomenko, R., Rébé, C., Chevriaux, A., Varin, A., Derangère, V., Bessède, G., Gamber, P., Lagrost, L., and Masson, D. (2013a). Knock-down of the oxysterol receptor LXR α impairs cholesterol efflux in human primary macrophages: lack of compensation by LXR β activation. *Biochem. Pharmacol.* **86**, 122–129.
- Ishibashi, M., Varin, A., Filomenko, R., Lopez, T., Athias, A., Gamber, P., Blache, D., Thomas, C., Gautier, T., Lagrost, L., et al. (2013b). Liver x receptor regulates arachidonic acid distribution and eicosanoid release in human macrophages: a key role for lysophosphatidylcholine acyltransferase 3. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **33**, 1171–1179.
- Ivandic, B., Castellani, L.W., Wang, X.P., Qiao, J.H., Mehrabian, M., Navab, M., Fogelman, A.M., Grass, D.S., Swanson, M.E., de Beer, M.C., et al. (1999). Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 1284–1290.
- Jabaut, J., Ather, J.L., Taracanova, A., Poynter, M.E., and Ckless, K. (2013). Mitochondria-targeted drugs enhance Nlrp3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in association with alterations in cellular redox and energy status. *Free Radic. Biol. Med.* **60**, 233–245.
- Jacobs, S., Schilf, C., Fliegert, F., Koling, S., Weber, Y., Schürmann, A., and Joost, H.-G. (1999). ADP-ribosylation factor (ARF)-like 4, 6, and 7 represent a subgroup of the ARF family characterized by rapid nucleotide exchange and a nuclear localization signal. *FEBS Letters* **456**, 384–388.
- Jacquel, A., Obba, S., Boyer, L., Dufies, M., Robert, G., Gounon, P., Lemichez, E., Luciano, F., Solary, E., and Auberger, P. (2012). Autophagy is required for CSF-1-induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions. *Blood* **119**, 4527–4531.
- Jakobsson, T., Venteclef, N., Toresson, G., Damdimopoulos, A.E., Ehrlund, A., Lou, X., Sanyal, S., Steffensen, K.R., Gustafsson, J.-A., and Treuter, E. (2009). GPS2 is required for cholesterol efflux by triggering histone demethylation, LXR recruitment, and coregulator assembly at the ABCG1 locus. *Mol. Cell* **34**, 510–518.

- Ji, Q., Zeng, Q., Huang, Y., Shi, Y., Lin, Y., Lu, Z., Meng, K., Wu, B., Yu, K., Chai, M., et al. (2014). Elevated plasma IL-37, IL-18, and IL-18BP concentrations in patients with acute coronary syndrome. *Mediators Inflamm.* 2014, 165742.
- Jiang, Y., Wang, M., Huang, K., Zhang, Z., Shao, N., Zhang, Y., Wang, W., and Wang, S. (2012). Oxidized low-density lipoprotein induces secretion of interleukin-1 β by macrophages via reactive oxygen species-dependent NLRP3 inflammasome activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 121–126.
- Jun, H., Hoang, M.-H., Yeo, S.-K., Jia, Y., and Lee, S.-J. (2013). Induction of ABCA1 and ABCG1 expression by the liver X receptor modulator cineole in macrophages. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 579–583.
- Kadl, A., Meher, A.K., Sharma, P.R., Lee, M.Y., Doran, A.C., Johnstone, S.R., Elliott, M.R., Gruber, F., Han, J., Chen, W., et al. (2010). Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ. Res.* 107, 737–746.
- Kamari, Y., Shaish, A., Shemesh, S., Vax, E., Grosskopf, I., Dotan, S., White, M., Voronov, E., Dinarello, C.A., Apte, R.N., et al. (2011). Reduced atherosclerosis and inflammatory cytokines in apolipoprotein-E-deficient mice lacking bone marrow-derived interleukin-1 α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 197–203.
- Kanters, E., Gijbels, M.J.J., van der Made, I., Vergouwe, M.N., Heeringa, P., Kraal, G., Hofker, M.H., and de Winther, M.P.J. (2004). Hematopoietic NF-kappaB1 deficiency results in small atherosclerotic lesions with an inflammatory phenotype. *Blood* 103, 934–940.
- Kanters, E., Pasparakis, M., Gijbels, M.J.J., Vergouwe, M.N., Partouns-Hendriks, I., Fijneman, R.J.A., Clausen, B.E., Förster, I., Kockx, M.M., Rajewsky, K., et al. (2003). Inhibition of NF-kappaB activation in macrophages increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 112, 1176–1185.
- Kappus, M.S., Murphy, A.J., Abramowicz, S., Ntonga, V., Welch, C.L., Tall, A.R., and Westerterp, M. (2014). Activation of liver X receptor decreases atherosclerosis in *Ldlr*^{-/-} mice in the absence of ATP-binding cassette transporters A1 and G1 in myeloid cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 279–284.
- Karlin, J.B., Johnson, W.J., Benedict, C.R., Chacko, G.K., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (1987). Cholesterol flux between cells and high density lipoprotein. Lack of relationship to specific binding of the lipoprotein to the cell surface. *J. Biol. Chem.* 262, 12557–12564.
- Kastelein, J.J.P., Akdim, F., Stroes, E.S.G., Zwinderman, A.H., Bots, M.L., Stalenhoef, A.F.H., Visseren, F.L.J., Sijbrands, E.J.G., Trip, M.D., Stein, E.A., et al. (2008). Simvastatin with or without ezetimibe in familial hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* 358, 1431–1443.
- Kellner-Weibel, G., de La Llera-Moya, M., Connelly, M.A., Stoudt, G., Christian, A.E., Haynes, M.P., Williams, D.L., and Rothblat, G.H. (2000). Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution. *Biochemistry* 39, 221–229.
- Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldán, A., Tarr, P., Fishbein, M.C., Frank, J., Francone, O.L., and Edwards, P.A. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 1, 121–131.
- Khera, A.V., Cuchel, M., de la Llera-Moya, M., Rodrigues, A., Burke, M.F., Jafri, K., French, B.C., Phillips, J.A., Mucksavage, M.L., Wilensky, R.L., et al. (2011). Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.* 364, 127–135.
- Kirii, H., Niwa, T., Yamada, Y., Wada, H., Saito, K., Iwakura, Y., Asano, M., Moriwaki, H., and Seishima, M. (2003). Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 656–660.
- Kockx, M., Guo, D.L., Huby, T., Lesnik, P., Kay, J., Sabaretnam, T., Jary, E., Hill, M., Gaus, K., Chapman, J., et al. (2007). Secretion of Apolipoprotein E From Macrophages Occurs via a Protein Kinase A– and Calcium-Dependent Pathway Along the Microtubule Network. *Circulation Research* 101, 607–616.

- Kockx, M., Guo, D.L., Traini, M., Gaus, K., Kay, J., Wimmer-Kleikamp, S., Rentero, C., Burnett, J.R., Goff, W.L., Eck, M.V., et al. (2009). Cyclosporin A Decreases Apolipoprotein E Secretion from Human Macrophages via a Protein Phosphatase 2B-dependent and ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1)-independent Pathway. *J. Biol. Chem.* **284**, 24144–24154.
- Kockx, M., Rye, K.-A., Gaus, K., Quinn, C.M., Wright, J., Sloane, T., Sviridov, D., Fu, Y., Sullivan, D., Burnett, J.R., et al. (2004). Apolipoprotein A-I-stimulated apolipoprotein E secretion from human macrophages is independent of cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* **279**, 25966–25977.
- Kodama, T., Freeman, M., Rohrer, L., Zabrecky, J., Matsudaira, P., and Krieger, M. (1990). Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature* **343**, 531–535.
- Kolodgie, F.D., Narula, J., Burke, A.P., Haider, N., Farb, A., Hui-Liang, Y., Smialek, J., and Virmani, R. (2000). Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am. J. Pathol.* **157**, 1259–1268.
- Kominami, E., Tsukahara, T., Hara, K., and Katunuma, N. (1988). Biosyntheses and processing of lysosomal cysteine proteinases in rat macrophages. *FEBS Lett.* **231**, 225–228.
- Kontush, A., and Chapman, M.J. (2006). Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis. *Pharmacol. Rev.* **58**, 342–374.
- Korzeniowski, M., Kwiatkowska, K., and Sobota, A. (2003). Insights into the association of FcγRII and TCR with detergent-resistant membrane domains: isolation of the domains in detergent-free density gradients facilitates membrane fragment reconstitution. *Biochemistry* **42**, 5358–5367.
- Kratzer, A., Buchebner, M., Pfeifer, T., Becker, T.M., Uray, G., Miyazaki, M., Miyazaki-Anzai, S., Ebner, B., Chandak, P.G., Kadam, R.S., et al. (2009). Synthetic LXR agonist attenuates plaque formation in apoE^{-/-} mice without inducing liver steatosis and hypertriglyceridemia. *J. Lipid Res.* **50**, 312–326.
- Kronenberg, F., Stühlinger, M., Trenkwalder, E., Geethanjali, F.S., Pachinger, O., von Eckardstein, A., and Dieplinger, H. (2000). Low apolipoprotein A-IV plasma concentrations in men with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 751–757.
- Kruth, H.S. (2002). Sequestration of aggregated low-density lipoproteins by macrophages. *Curr. Opin. Lipidol.* **13**, 483–488.
- Kruth, H.S., Jones, N.L., Huang, W., Zhao, B., Ishii, I., Chang, J., Combs, C.A., Malide, D., and Zhang, W.-Y. (2005b). Macropinocytosis Is the Endocytic Pathway That Mediates Macrophage Foam Cell Formation with Native Low Density Lipoprotein. *J. Biol. Chem.* **280**, 2352–2360.
- Kuhlencordt, P.J., Chen, J., Han, F., Astern, J., and Huang, P.L. (2001). Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* **103**, 3099–3104.
- Kunjathoor, V.V., Febbraio, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff, H.F., and Freeman, M.W. (2002). Scavenger Receptors Class A-I/II and CD36 Are the Principal Receptors Responsible for the Uptake of Modified Low Density Lipoprotein Leading to Lipid Loading in Macrophages. *J. Biol. Chem.* **277**, 49982–49988.
- Kwiatkowska, K., Frey, J., and Sobota, A. (2003). Phosphorylation of FcγRIIA is required for the receptor-induced actin rearrangement and capping: the role of membrane rafts. *J. Cell. Sci.* **116**, 537–550.
- Kwon, H.J., Abi-Mosleh, L., Wang, M.L., Deisenhofer, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Infante, R.E. (2009). Structure of N-terminal domain of NPC1 reveals distinct subdomains for binding and transfer of cholesterol. *Cell* **137**, 1213–1224.
- Kzhyshkowska, J., Neyer, C., and Gordon, S. (2012). Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunobiology* **217**, 492–502.

- Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Walczak, R., Pei, L., Wilpitz, D.C., Collins, J.L., and Tontonoz, P. (2001). Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7558–7568.
- Lakomy, D., Rébé, C., Sberna, A.-L., Masson, D., Gautier, T., Chevriaux, A., Raveneau, M., Ogier, N., Nguyen, A.T., Gambert, P., et al. (2009). Liver X receptor-mediated induction of cholesteryl ester transfer protein expression is selectively impaired in inflammatory macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1923–1929.
- Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2009). Inflammasomes: guardians of cytosolic sanctity. *Immunol. Rev.* 227, 95–105.
- Lari, R., Fleetwood, A.J., Kitchener, P.D., Cook, A.D., Pavasovic, D., Hertzog, P.J., and Hamilton, J.A. (2007). Macrophage lineage phenotypes and osteoclastogenesis--complexity in the control by GM-CSF and TGF-beta. *Bone* 40, 323–336.
- Larrede, S., Quinn, C.M., Jessup, W., Frisdal, E., Olivier, M., Hsieh, V., Kim, M.-J., Van Eck, M., Couvert, P., Carrie, A., et al. (2009). Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1930–1936.
- Lazar, M. (2003). Nuclear Receptor Corepressors. *Nuclear Receptor Signaling* 1.
- Le Guezennec, X., Brichkina, A., Huang, Y.-F., Kostromina, E., Han, W., and Bulavin, D.V. (2012). Wip1-dependent regulation of autophagy, obesity, and atherosclerosis. *Cell Metab.* 16, 68–80.
- Le Lay, S., Rodriguez, M., Jessup, W., Rentero, C., Li, Q., Cartland, S., Grewal, T., and Gaus, K. (2011). Caveolin-1-mediated apolipoprotein A-I membrane binding sites are not required for cholesterol efflux. *PLoS ONE* 6, e23353.
- Lee-Rueckert, M., Blanco-Vaca, F., Kovanen, P.T., and Escola-Gil, J.C. (2013). The role of the gut in reverse cholesterol transport – Focus on the enterocyte. *Progress in Lipid Research* 52, 317–328.
- Lefranc, M.-P., Giudicelli, V., Ginestoux, C., Jabado-Michaloud, J., Folch, G., Bellahcene, F., Wu, Y., Gemrot, E., Brochet, X., Lane, J., et al. (2009). IMGT(R), the international ImMunoGeneTics information system(R). *Nucleic Acids Research* 37, D1006–D1012.
- Leibundgut, G., Witztum, J.L., and Tsimikas, S. (2013). Oxidation-specific epitopes and immunological responses: Translational biotheranostic implications for atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 13, 168–179.
- Lemaire-Ewing, S., Lagrost, L., and Néel, D. (2012). Lipid rafts: A signalling platform linking lipoprotein metabolism to atherogenesis. *Atherosclerosis* 221, 303–310.
- Lesnik, P., Haskell, C.A., and Charo, I.F. (2003). Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 111, 333–340.
- Levin, N., Bischoff, E.D., Daige, C.L., Thomas, D., Vu, C.T., Heyman, R.A., Tangirala, R.K., and Schulman, I.G. (2005). Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 135–142.
- Lewis, G.F., and Rader, D.J. (2005). New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ. Res.* 96, 1221–1232.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678–689.
- Li, G., Biju, K.C., Xu, X., Zhou, Q., Chen, C., Valente, A.J., He, W., Reddick, R.L., Freeman, G.L., Ahuja, S.S., et al. (2011). Macrophage LXRA gene therapy ameliorates atherosclerosis as well as hypertriglyceridemia in LDLR^{-/-} mice. *Gene Ther.* 18, 835–841.

- Li, J., Fu, Q., Cui, H., Qu, B., Pan, W., Shen, N., and Bao, C. (2011). Interferon- α priming promotes lipid uptake and macrophage-derived foam cell formation: a novel link between interferon- α and atherosclerosis in lupus. *Arthritis Rheum.* 63, 492–502.
- Li, Q., and Verma, I.M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 725–734.
- Li, W., and Yuan, X.-M. (2004). Increased expression and translocation of lysosomal cathepsins contribute to macrophage apoptosis in atherogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1030, 427–433.
- Li, W., Dalen, H., Eaton, J.W., and Yuan, X.M. (2001). Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1124–1130.
- Li, X., Zhang, S., Blander, G., Tse, J.G., Krieger, M., and Guarente, L. (2007). SIRT1 deacetylates and positively regulates the nuclear receptor LXR. *Mol. Cell* 28, 91–106.
- Li, Y., Gerbod-Giannone, M.-C., Seitz, H., Cui, D., Thorp, E., Tall, A.R., Matsushima, G.K., and Tabas, I. (2006). Cholesterol-induced apoptotic macrophages elicit an inflammatory response in phagocytes, which is partially attenuated by the Mer receptor. *J. Biol. Chem.* 281, 6707–6717.
- Li, Y., Xu, S., Jiang, B., Cohen, R.A., and Zang, M. (2013). Activation of sterol regulatory element binding protein and NLRP3 inflammasome in atherosclerotic lesion development in diabetic pigs. *PLoS ONE* 8, e67532.
- Liao, X., Sluimer, J.C., Wang, Y., Subramanian, M., Brown, K., Pattison, J.S., Robbins, J., Martinez, J., and Tabas, I. (2012). Macrophage Autophagy Plays a Protective Role in Advanced Atherosclerosis. *Cell Metabolism* 15, 545–553.
- Libby, P. (2012). Inflammation in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 2045–2051.
- Lind, L., Simon, T., Johansson, L., Kotti, S., Hansen, T., Machecourt, J., Ninio, E., Tedgui, A., Danchin, N., Ahlström, H., et al. (2012). Circulating levels of secretory- and lipoprotein-associated phospholipase A2 activities: relation to atherosclerotic plaques and future all-cause mortality. *Eur. Heart J.* 33, 2946–2954.
- Linton, M.F., Babaev, V.R., Gleaves, L.A., and Fazio, S. (1999). A Direct Role for the Macrophage Low Density Lipoprotein Receptor in Atherosclerotic Lesion Formation. *J. Biol. Chem.* 274, 19204–19210.
- Lipinski, K. von W., Keul, P., Ferri, N., Lucke, S., Heusch, G., Fischer, J.W., and Levkau, B. (2006a). Integrin-Mediated Transcriptional Activation of Inhibitor of Apoptosis Proteins Protects Smooth Muscle Cells Against Apoptosis Induced by Degraded Collagen. *Circulation Research* 98, 1490–1497.
- Liscum, L., and Sturley, S.L. (2004). Intracellular trafficking of Niemann–Pick C proteins 1 and 2: obligate components of subcellular lipid transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1685, 22–27.
- Liu, N., Raja, S.M., Zazzeroni, F., Metkar, S.S., Shah, R., Zhang, M., Wang, Y., Brömme, D., Russin, W.A., Lee, J.C., et al. (2003). NF-kappaB protects from the lysosomal pathway of cell death. *EMBO J.* 22, 5313–5322.
- Llorente-Cortés, V., Royo, T., Juan-Babot, O., and Badimon, L. (2007). Adipocyte differentiation-related protein is induced by LRP1-mediated aggregated LDL internalization in human vascular smooth muscle cells and macrophages. *J. Lipid Res.* 48, 2133–2140.
- Lu, R., Arakawa, R., Ito-Osumi, C., Iwamoto, N., and Yokoyama, S. (2008). ApoA-I Facilitates ABCA1 Recycle/Accumulation to Cell Surface by Inhibiting Its Intracellular Degradation and Increases HDL Generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 1820–1824.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151.
- Lucas, M., Zhang, X., Prasanna, V., and Mosser, D.M. (2005). ERK activation following macrophage Fc γ 3R ligand leads to chromatin modifications at the IL-10 locus. *J. Immunol.* 175, 469–477.

- Luchtefeld, M., Grothusen, C., Gaglick, A., Jagavelu, K., Schuett, H., Tietge, U.J.F., Pabst, O., Grote, K., Drexler, H., Förster, R., et al. (2010). Chemokine receptor 7 knockout attenuates atherosclerotic plaque development. *Circulation* 122, 1621–1628.
- Lucic, D., Huang, Z.H., Gu, D.S., Altenburg, M.K., Maeda, N., and Mazzone, T. (2007). Regulation of macrophage apoE secretion and sterol efflux by the LDL receptor. *J. Lipid Res.* 48, 366–372.
- Lund, E.G., Menke, J.G., and Sparrow, C.P. (2003). Liver X receptor agonists as potential therapeutic agents for dyslipidemia and atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1169–1177.
- Lund, E.G., Peterson, L.B., Adams, A.D., Lam, M.-H.N., Burton, C.A., Chin, J., Guo, Q., Huang, S., Latham, M., Lopez, J.C., et al. (2006). Different roles of liver X receptor alpha and beta in lipid metabolism: effects of an alpha-selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. *Biochem. Pharmacol.* 71, 453–463.
- Lutgens, E., Lutgens, S.P.M., Faber, B.C.G., Heeneman, S., Gijbels, M.M.J., de Winther, M.P.J., Frederik, P., van der Made, I., Daugherty, A., Sijbers, A.M., et al. (2006). Disruption of the cathepsin K gene reduces atherosclerosis progression and induces plaque fibrosis but accelerates macrophage foam cell formation. *Circulation* 113, 98–107.
- Lutgens, S.P.M., Cleutjens, K.B.J.M., Daemen, M.J.A.P., and Heeneman, S. (2007). Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *FASEB J.* 21, 3029–3041.
- Ma, Y., Ashraf, M.Z., and Podrez, E.A. (2010). Scavenger receptor BI modulates platelet reactivity and thrombosis in dyslipidemia. *Blood* 116, 1932–1941.
- Maderna, P., and Godson, C. (2003). Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1639, 141–151.
- Maehr, R., Hang, H.C., Mintern, J.D., Kim, Y.-M., Cuvillier, A., Nishimura, M., Yamada, K., Shirahama-Noda, K., Hara-Nishimura, I., and Ploegh, H.L. (2005). Asparagine endopeptidase is not essential for class II MHC antigen presentation but is required for processing of cathepsin L in mice. *J. Immunol.* 174, 7066–7074.
- Majumdar, S.B., Bhattacharya, P., Bhattacharjee, S., Majumder, S., Banerjee, S., and Majumdar, S. (2014). Toll like receptor 2 and CC chemokine receptor 5 cluster in the lipid raft enhances the susceptibility of *Leishmania donovani* infection in macrophages. *Indian J. Exp. Biol.* 52, 17–29.
- Mallat, Z., Besnard, S., Duriez, M., Deleuze, V., Emmanuel, F., Bureau, M.F., Soubrier, F., Esposito, B., Duez, H., Fievet, C., et al. (1999). Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ. Res.* 85, e17–24.
- Mallat, Z., Corbaz, A., Scoazec, A., Besnard, S., Lesèche, G., Chvatchko, Y., and Tedgui, A. (2001). Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation* 104, 1598–1603.
- Mallat, Z., Gojova, A., Marchiol-Fournigault, C., Esposito, B., Kamaté, C., Merval, R., Fradelizi, D., and Tedgui, A. (2001). Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ. Res.* 89, 930–934.
- Mallat, Z., Taleb, S., Ait-Oufella, H., and Tedgui, A. (2009). The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S364–369.
- Manning-Tobin, J.J., Moore, K.J., Seimon, T.A., Bell, S.A., Sharuk, M., Alvarez-Leite, J.I., de Winther, M.P.J., Tabas, I., and Freeman, M.W. (2009). Loss of SR-A and CD36 activity reduces atherosclerotic lesion complexity without abrogating foam cell formation in hyperlipidemic mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 19–26.
- Manoury, B., Mazzeo, D., Fugger, L., Viner, N., Ponsford, M., Streeter, H., Mazza, G., Wraith, D.C., and Watts, C. (2002). Destructive processing by asparagine endopeptidase limits presentation of a dominant T cell epitope in MBP. *Nat. Immunol.* 3, 169–174.

- Marsillach, J., Aragonès, G., Mackness, B., Mackness, M., Rull, A., Beltrán-Debón, R., Pedro-Botet, J., Alonso-Villaverde, C., Joven, J., and Camps, J. (2010). Decreased paraoxonase-1 activity is associated with alterations of high-density lipoprotein particles in chronic liver impairment. *Lipids Health Dis* 9, 46.
- Martinez, L.O., Jacquet, S., Esteve, J.-P., Rolland, C., Cabezón, E., Champagne, E., Pineau, T., Georgeaud, V., Walker, J.E., Tercé, F., et al. (2003). Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 421, 75–79.
- Martínez-Hervás, S., Vinué, A., Núñez, L., Andrés-Blasco, I., Piqueras, L., Real, J.T., Ascaso, J.F., Burks, D.J., Sanz, M.J., and González-Navarro, H. (2014). Insulin resistance aggravates atherosclerosis by reducing vascular smooth muscle cell survival and increasing CX3CL1/CX3CR1 axis. *Cardiovasc. Res.*
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol. Cell* 10, 417–426.
- Matsuura, F., Wang, N., Chen, W., Jiang, X.-C., and Tall, A.R. (2006). HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway. *J. Clin. Invest.* 116, 1435–1442.
- Mattock, K.L., Gough, P.J., Humphries, J., Burnand, K., Patel, L., Suckling, K.E., Cuello, F., Watts, C., Gautel, M., Avkiran, M., et al. (2010). Legumain and cathepsin-L expression in human unstable carotid plaque. *Atherosclerosis* 208, 83–89.
- Mauerer, R., Ebert, S., and Langmann, T. (2009). High glucose, unsaturated and saturated fatty acids differentially regulate expression of ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1 in human macrophages. *Exp. Mol. Med.* 41, 126–132.
- Maxfield, F.R., and Tabas, I. (2005). Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* 438, 612–621.
- Mayi, T.H., Rigamonti, E., Pattou, F., Staels, B., and Chinetti-Gbaguidi, G. (2011). Liver X Receptor (LXR) activation negatively regulates visfatin expression in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 404, 458–462.
- Mazzone, T., Basheeruddin, K., and Poulos, C. (1989). Regulation of macrophage apolipoprotein E gene expression by cholesterol. *J. Lipid Res.* 30, 1055–1064.
- McGilligan, V.E., Gregory-Ksander, M.S., Li, D., Moore, J.E., Hodges, R.R., Gilmore, M.S., Moore, T.C.B., and Dartt, D.A. (2013). *Staphylococcus aureus* activates the NLRP3 inflammasome in human and rat conjunctival goblet cells. *PLoS ONE* 8, e74010.
- McMahon, H.T., and Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 517–533.
- Mei, C., Chen, Z., Liao, Y., Wang, Y., Peng, H., and Chen, Y. (2007). Interleukin-10 inhibits the down-regulation of ATP binding cassette transporter A1 by tumour necrosis factor-alpha in THP-1 macrophage-derived foam cells. *Cell Biol. Int.* 31, 1456–1461.
- Mei, S., Gu, H., Ward, A., Yang, X., Guo, H., He, K., Liu, Z., and Cao, W. (2012). p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) promotes cholesterol ester accumulation in macrophages through inhibition of macroautophagy. *J. Biol. Chem.* 287, 11761–11768.
- Menu, P., Mayor, A., Zhou, R., Tardivel, A., Ichijo, H., Mori, K., and Tschopp, J. (2012). ER stress activates the NLRP3 inflammasome via an UPR-independent pathway. *Cell Death Dis* 3, e261.
- Menu, P., Pellegrin, M., Aubert, J.-F., Bouzourene, K., Tardivel, A., Mazzolai, L., and Tschopp, J. (2011). Atherosclerosis in ApoE-deficient mice progresses independently of the NLRP3 inflammasome. *Cell Death Dis* 2, e137.

- Merhi-Soussi, F., Kwak, B.R., Magne, D., Chadjichristos, C., Berti, M., Pelli, G., James, R.W., Mach, F., and Gabay, C. (2005). Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc. Res.* 66, 583–593.
- Mesmin, B., and Maxfield, F.R. (2009). Intracellular sterol dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791, 636–645.
- Mesmin, B., Antonny, B., and Drin, G. (2013). Insights into the mechanisms of sterol transport between organelles. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3405–3421.
- Meurs, I., Lammers, B., Zhao, Y., Out, R., Hildebrand, R.B., Hoekstra, M., Van Berkel, T.J.C., and Van Eck, M. (2012). The effect of ABCG1 deficiency on atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice depends on the stage of atherogenesis. *Atherosclerosis* 221, 41–47.
- Miao, B., Zondlo, S., Gibbs, S., Cromley, D., Hosagrahara, V.P., Kirchgessner, T.G., Billheimer, J., and Mukherjee, R. (2004). Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator. *J. Lipid Res.* 45, 1410–1417.
- Miller, A.M., Xu, D., Asquith, D.L., Denby, L., Li, Y., Sattar, N., Baker, A.H., McInnes, I.B., and Liew, F.Y. (2008). IL-33 reduces the development of atherosclerosis. *J. Exp. Med.* 205, 339–346.
- Miller, G., Matthews, S.P., Reinheckel, T., Fleming, S., and Watts, C. (2011). Asparagine endopeptidase is required for normal kidney physiology and homeostasis. *FASEB J.* 25, 1606–1617.
- Mineo, C., Deguchi, H., Griffin, J.H., and Shaul, P.W. (2006). Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ. Res.* 98, 1352–1364.
- Mogilenko, D.A., Kudriavtsev, I.V., Trulioff, A.S., Shavva, V.S., Dizhe, E.B., Missyul, B.V., Zhakhov, A.V., Ischenko, A.M., Perevozchikov, A.P., and Orlov, S.V. (2012). Modified low density lipoprotein stimulates complement C3 expression and secretion via liver X receptor and Toll-like receptor 4 activation in human macrophages. *J. Biol. Chem.* 287, 5954–5968.
- Monaco, C., Grogan, S.M., Navin, T.J., Foxwell, B.M.J., Davies, A.H., and Feldmann, M. (2009). Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis. *Circulation* 120, 2462–2469.
- Moore, K.J., Sheedy, F.J., and Fisher, E.A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 709–721.
- Morel, D.W., Hessler, J.R., and Chisolm, G.M. (1983). Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J. Lipid Res.* 24, 1070–1076.
- Muller, W.A. (2014). How endothelial cells regulate transmigration of leukocytes in the inflammatory response. *Am. J. Pathol.* 184, 886–896.
- Mullick, A.E., Tobias, P.S., and Curtiss, L.K. (2005). Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2. *J. Clin. Invest.* 115, 3149–3156.
- Murphy, A.J., Akhtari, M., Tolani, S., Pagler, T., Bijl, N., Kuo, C.-L., Wang, M., Sanson, M., Abramowicz, S., Welch, C., et al. (2011). ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytoysis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 4138–4149.
- Naik, S.U., Wang, X., Da Silva, J.S., Jaye, M., Macphee, C.H., Reilly, M.P., Billheimer, J.T., Rothblat, G.H., and Rader, D.J. (2006). Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 113, 90–97.
- Naik, S.U., Wang, X., Silva, J.S.D., Jaye, M., Macphee, C.H., Reilly, M.P., Billheimer, J.T., Rothblat, G.H., and Rader, D.J. (2006). Pharmacological Activation of Liver X Receptors Promotes Reverse Cholesterol Transport In Vivo. *Circulation* 113, 90–97.

- Netea, M.G., Joosten, L.A.B., Lewis, E., Jensen, D.R., Voshol, P.J., Kullberg, B.J., Tack, C.J., van Krieken, H., Kim, S.-H., Stalenhoef, A.F., et al. (2006). Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. *Nat. Med.* *12*, 650–656.
- Neufeld, E.B., Stonik, J.A., Demosky, S.J., Knapper, C.L., Combs, C.A., Cooney, A., Comly, M., Dwyer, N., Blanchette-Mackie, J., Remaley, A.T., et al. (2004). The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease. *J. Biol. Chem.* *279*, 15571–15578.
- Neven, B., Callebaut, I., Prieur, A.-M., Feldmann, J., Bodemer, C., Lepore, L., Derfalvi, B., Benjaponpitak, S., Vesely, R., Sauvain, M.J., et al. (2004). Molecular basis of the spectral expression of CIAS1 mutations associated with phagocytic cell-mediated autoinflammatory disorders CINCA/NOMID, MWS, and FCU. *Blood* *103*, 2809–2815.
- Newby, A.C. (2008). Metalloproteinase Expression in Monocytes and Macrophages and its Relationship to Atherosclerotic Plaque Instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *28*, 2108–2114.
- Niessner, A., Shin, M.S., Pryshchep, O., Goronzy, J.J., Chaikof, E.L., and Weyand, C.M. (2007). Synergistic proinflammatory effects of the antiviral cytokine interferon-alpha and Toll-like receptor 4 ligands in the atherosclerotic plaque. *Circulation* *116*, 2043–2052.
- Nikkari, S.T., O'Brien, K.D., Ferguson, M., Hatsukami, T., Welgus, H.G., Alpers, C.E., and Clowes, A.W. (1995). Interstitial collagenase (MMP-1) expression in human carotid atherosclerosis. *Circulation* *92*, 1393–1398.
- Nishimura, M., Umehara, H., Nakayama, T., Yoneda, O., Hieshima, K., Kakizaki, M., Dohmae, N., Yoshie, O., and Imai, T. (2002). Dual Functions of Fractalkine/CX3C Ligand 1 in Trafficking of Perforin+/Granzyme B+ Cytotoxic Effector Lymphocytes That Are Defined by CX3CR1 Expression. *J Immunol* *168*, 6173–6180.
- Novick, P., and Zerial, M. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 496–504.
- Ogunrinade, O., Kameya, G.T., and Truskey, G.A. (2002). Effect of fluid shear stress on the permeability of the arterial endothelium. *Ann Biomed Eng* *30*, 430–446.
- Ohta, H., Wada, H., Niwa, T., Kirii, H., Iwamoto, N., Fujii, H., Saito, K., Sekikawa, K., and Seishima, M. (2005). Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* *180*, 11–17.
- Oörni, K., and Kovanen, P.T. (2009). Lipoprotein modification by secretory phospholipase A(2) enzymes contributes to the initiation and progression of atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* *20*, 421–427.
- Ouimet, M., and Marcel, Y.L. (2012). Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *32*, 575–581.
- Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I., and Marcel, Y.L. (2011). Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab.* *13*, 655–667.
- Ouimet, M., Wang, M.-D., Cadotte, N., Ho, K., and Marcel, Y.L. (2008). Epoxycholesterol impairs cholesteryl ester hydrolysis in macrophage foam cells, resulting in decreased cholesterol efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 1144–1150.
- Out, R., Hoekstra, M., Habets, K., Meurs, I., de Waard, V., Hildebrand, R.B., Wang, Y., Chimini, G., Kuiper, J., Van Berkel, T.J.C., et al. (2008a). Combined deletion of macrophage ABCA1 and ABCG1 leads to massive lipid accumulation in tissue macrophages and distinct atherosclerosis at relatively low plasma cholesterol levels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *28*, 258–264.
- Out, R., Hoekstra, M., Hildebrand, R.B., Kruit, J.K., Meurs, I., Li, Z., Kuipers, F., Berkel, T.J.C.V., and Eck, M.V. (2006). Macrophage ABCG1 Deletion Disrupts Lipid Homeostasis in Alveolar Macrophages and Moderately Influences Atherosclerotic Lesion Development in LDL Receptor-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *26*, 2295–2300.

- Out, R., Hoekstra, M., Meurs, I., Vos, P. de, Kuiper, J., Eck, M.V., and Berkel, T.J.C.V. (2007). Total Body ABCG1 Expression Protects Against Early Atherosclerotic Lesion Development in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 594–599.
- Out, R., Jessup, W., Le Goff, W., Hoekstra, M., Gelissen, I.C., Zhao, Y., Kritharides, L., Chimini, G., Kuiper, J., Chapman, M.J., et al. (2008b). Coexistence of foam cells and hypocholesterolemia in mice lacking the ABC transporters A1 and G1. *Circ. Res.* 102, 113–120.
- Pamukcu, B., Lip, G.Y.H., and Shantsila, E. (2011). The nuclear factor- κ B pathway in atherosclerosis: a potential therapeutic target for atherothrombotic vascular disease. *Thromb. Res.* 128, 117–123.
- Parameswaran, N., and Patial, S. (2010). Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 20, 87–103.
- Passerini, A.G., Polacek, D.C., Shi, C., Francesco, N.M., Manduchi, E., Grant, G.R., Pritchard, W.F., Powell, S., Chang, G.Y., Stoeckert, C.J., Jr, et al. (2004). Coexisting proinflammatory and antioxidative endothelial transcription profiles in a disturbed flow region of the adult porcine aorta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2482–2487.
- Paul, A., Chang, B.H.-J., Li, L., Yechoor, V.K., and Chan, L. (2008). Deficiency of adipose differentiation-related protein impairs foam cell formation and protects against atherosclerosis. *Circ. Res.* 102, 1492–1501.
- Paulson, K.E., Zhu, S.-N., Chen, M., Nurmohamed, S., Jongstra-Bilen, J., and Cybulsky, M.I. (2010). Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis. *Circ. Res.* 106, 383–390.
- Peet, D.J., Janowski, B.A., and Mangelsdorf, D.J. (1998). The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 571–575.
- Pehkonen, P., Welter-Stahl, L., Diwo, J., Ryyänänen, J., Wienecke-Baldacchino, A., Heikkinen, S., Treuter, E., Steffensen, K.R., and Carlberg, C. (2012). Genome-wide landscape of liver X receptor chromatin binding and gene regulation in human macrophages. *BMC Genomics* 13, 50.
- Peng, D., Hiipakka, R.A., Dai, Q., Guo, J., Reardon, C.A., Getz, G.S., and Liao, S. (2008). Antiatherosclerotic effects of a novel synthetic tissue-selective steroidal liver X receptor agonist in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 332–342.
- Pentchev, P.G. (2004). Niemann-Pick C research from mouse to gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1685, 3–7.
- Persson, J., Degerman, E., Nilsson, J., and Lindholm, M.W. (2007). Perilipin and adipophilin expression in lipid loaded macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 1020–1026.
- Petrides, F., Shearston, K., Chatelais, M., Guilbaud, F., Meilhac, O., and Lambert, G. (2013). The promises of PCSK9 inhibition. *Curr. Opin. Lipidol.* 24, 307–312.
- Pfenniger, A., Wong, C., Sutter, E., Cuhlmann, S., Dunoyer-Geindre, S., Mach, F., Horrevoets, A.J., Evans, P.C., Krams, R., and Kwak, B.R. (2012a). Shear stress modulates the expression of the atheroprotective protein Cx37 in endothelial cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 53, 299–309.
- Piras, V., and Selvarajoo, K. (2014). Beyond MyD88 and TRIF Pathways in Toll-Like Receptor Signaling. *Front Immunol* 5, 70.
- Pirillo, A., Norata, G.D., and Catapano, A.L. (2013). LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2013, 152786.
- Pons, V., Serhan, N., Gayral, S., Malaval, C., Nauze, M., Malet, N., Laffargue, M., Galés, C., and Martinez, L.O. (2014). Role of the ubiquitin-proteasome system in the regulation of P2Y₁₃ receptor expression: impact on hepatic HDL uptake. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 1775–1788.

Poupel, L., Boissonnas, A., Hermand, P., Dorgham, K., Guyon, E., Auvynet, C., Charles, F.S., Lesnik, P., Deterre, P., and Combadiere, C. (2013). Pharmacological inhibition of the chemokine receptor, CX3CR1, reduces atherosclerosis in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2297–2305.

Qamar, A., and Rader, D.J. (2012). Effect of interleukin 1 β inhibition in cardiovascular disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 23, 548–553.

Quinet, E.M., Savio, D.A., Halpern, A.R., Chen, L., Schuster, G.U., Gustafsson, J.-Å., Basso, M.D., and Nambi, P. (2006). Liver X Receptor (LXR)- β Regulation in LXR α -Deficient Mice: Implications for Therapeutic Targeting. *Mol Pharmacol* 70, 1340–1349.

Rader, D.J., Schäfer, J., Lohse, P., Verges, B., Kindt, M., Zech, L.A., Steinmetz, A., and Brewer, H.B. (1993). Rapid in vivo transport and catabolism of human apolipoprotein A-IV-1 and slower catabolism of the apoA-IV-2 isoprotein. *J. Clin. Invest.* 92, 1009–1017.

Raffai, R. (2012). Apolipoprotein E regulation of myeloid cell plasticity in atherosclerosis. [Miscellaneous Article]. *Current Opinion in Lipidology* October 2012 23, 471–478.

Ranalletta, M., Wang, N., Han, S., Yvan-Charvet, L., Welch, C., and Tall, A.R. (2006). Decreased Atherosclerosis in Low-Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice Transplanted With Abcg1 $^{-/-}$ Bone Marrow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2308–2315.

Rauch, U., Osende, J.I., Fuster, V., Badimon, J.J., Fayad, Z., and Chesebro, J.H. (2001). Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann. Intern. Med.* 134, 224–238.

Rayner, K.J., Sheedy, F.J., Esau, C.C., Hussain, F.N., Temel, R.E., Parathath, S., van Gils, J.M., Rayner, A.J., Chang, A.N., Suarez, Y., et al. (2011). Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 121, 2921–2931.

Razani, B., Feng, C., Coleman, T., Emanuel, R., Wen, H., Hwang, S., Ting, J.P., Virgin, H.W., Kastan, M.B., and Semenkovich, C.F. (2012). Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. *Cell Metab.* 15, 534–544.

Réb  , C., Raveneau, M., Chevriaux, A., Lakomy, D., Sberna, A.-L., Costa, A., Bess  de, G., Athias, A., Steinmetz, E., Lobaccaro, J.M.A., et al. (2009). Induction of transglutaminase 2 by a liver X receptor/retinoic acid receptor alpha pathway increases the clearance of apoptotic cells by human macrophages. *Circ. Res.* 105, 393–401.

Reddy, V.Y., Zhang, Q.Y., and Weiss, S.J. (1995). Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3849–3853.

Reimer, T., Brcic, M., Schweizer, M., and Jungi, T.W. (2008). poly(I:C) and LPS induce distinct IRF3 and NF- κ B signaling during type-I IFN and TNF responses in human macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 83, 1249–1257.

Repa, J.J., and Mangelsdorf, D.J. (2000). The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 459–481.

Ridker, P.M., Danielson, E., Fonseca, F.A.H., Genest, J., Gotto, A.M., Jr, Kastelein, J.J.P., Koenig, W., Libby, P., Lorenzatti, A.J., MacFadyen, J.G., et al. (2008). Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N. Engl. J. Med.* 359, 2195–2207.

Ridker, P.M., Howard, C.P., Walter, V., Everett, B., Libby, P., Hensen, J., Thuren, T., and CANTOS Pilot Investigative Group (2012). Effects of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on hemoglobin A1c, lipids, C-reactive protein, interleukin-6, and fibrinogen: a phase IIb randomized, placebo-controlled trial. *Circulation* 126, 2739–2748.

Ridker, P.M., Rifai, N., Stampfer, M.J., and Hennekens, C.H. (2000). Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 101, 1767–1772.

- Ridker, P.M., Thuren, T., Zalewski, A., and Libby, P. (2011). Interleukin-1 β inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Am. Heart J.* 162, 597–605.
- Rigamonti, E., Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2008). Regulation of macrophage functions by PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LXRs in mice and men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1050–1059.
- Rigamonti, E., Helin, L., Lestavel, S., Mutka, A.L., Lepore, M., Fontaine, C., Bouhrel, M.A., Bultel, S., Fruchart, J.C., Ikonen, E., et al. (2005). Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. *Circ. Res.* 97, 682–689.
- Robbins, C.S., Hilgendorf, I., Weber, G.F., Theurl, I., Iwamoto, Y., Figueiredo, J.-L., Gorbato, R., Sukhova, G.K., Gerhardt, L.M.S., Smyth, D., et al. (2013). Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat. Med.* 19, 1166–1172.
- Rodriguez-Agudo, D., Ren, S., Wong, E., Marques, D., Redford, K., Gil, G., Hylemon, P., and Pandak, W.M. (2008a). Intracellular cholesterol transporter StarD4 binds free cholesterol and increases cholesteryl ester formation. *J. Lipid Res.* 49, 1409–1419.
- Rodriguez-Feo, J.A., Hellings, W.E., Moll, F.L., De Vries, J.-P.P.M., van Middelaar, B.J., Algra, A., Sluijter, J., Velema, E., van der Broek, T., Sessa, W.C., et al. (2008). Caveolin-1 Influences Vascular Protease Activity and Is a Potential Stabilizing Factor in Human Atherosclerotic Disease. *PLoS ONE* 3, e2612.
- Rogacev, K.S., Cremers, B., Zawada, A.M., Seiler, S., Binder, N., Ege, P., Große-Dunker, G., Heisel, I., Hornof, F., Jeken, J., et al. (2012). CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 1512–1520.
- Rolin, J., and Maghazachi, A.A. (2014). Implications of chemokines, chemokine receptors, and inflammatory lipids in atherosclerosis. *J. Leukoc. Biol.* 95, 575–585.
- Rozenberg, O., Shih, D.M., and Aviram, M. (2005). Paraoxonase 1 (PON1) attenuates macrophage oxidative status: studies in PON1 transfected cells and in PON1 transgenic mice. *Atherosclerosis* 181, 9–18.
- Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J.C., Deleuze, J.F., Brewer, H.B., Duverger, N., Denèfle, P., et al. (1999). Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat. Genet.* 22, 352–355.
- Rutkowski, D.T., and Kaufman, R.J. (2007). That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem. Sci.* 32, 469–476.
- Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.-G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., et al. (2008). Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 456, 264–268.
- Sallam, T., Ito, A., Rong, X., Kim, J., van Stijn, C., Chamberlain, B.T., Jung, M.E., Chao, L.C., Jones, M., Gilliland, T., et al. (2014). The macrophage LBP gene is an LXR target that promotes macrophage survival and atherosclerosis. *J. Lipid Res.* 55, 1120–1130.
- Santos, R.D., Schaefer, E.J., Asztalos, B.F., Polisecki, E., Wang, J., Hegele, R.A., Martinez, L.R.C., Miname, M.H., Rochitte, C.E., Da Luz, P.L., et al. (2008). Characterization of high density lipoprotein particles in familial apolipoprotein A-I deficiency. *J. Lipid Res.* 49, 349–357.
- Schaeffer, D.F., Riaz, M., Parhar, K.S., Chen, J.H., Duronio, V., Sawamura, T., and Steinbrecher, U.P. (2009). LOX-1 augments oxLDL uptake by lysoPC-stimulated murine macrophages but is not required for oxLDL clearance from plasma. *J. Lipid Res.* 50, 1676–1684.
- Schieffer, B., and Luchtefeld, M. (2011). Emerging role of chemokine receptor 7 in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 21, 211–216.

- Schieffer, B., Selle, T., Hilfiker, A., Hilfiker-Kleiner, D., Grote, K., Tietge, U.J.F., Trautwein, C., Luchtefeld, M., Schmittkamp, C., Heeneman, S., et al. (2004). Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 110, 3493–3500.
- Schiro, A., Wilkinson, F.L., Weston, R., Smyth, J.V., Serracino-Inglott, F., and Alexander, M.Y. (2014). Endothelial microparticles as conveyors of information in atherosclerotic disease. *Atherosclerosis* 234, 295–302.
- Schrijvers, D.M., Meyer, G.R.Y.D., Kockx, M.M., Herman, A.G., and Martinet, W. (2005). Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages Is Impaired in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 1256–1261.
- Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell* 140, 821–832.
- Seetharam, D., Mineo, C., Gormley, A.K., Gibson, L.L., Vongpatanasin, W., Chambliss, K.L., Hahner, L.D., Cummings, M.L., Kitchens, R.L., Marcel, Y.L., et al. (2006). High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ. Res.* 98, 63–72.
- Seimon, T.A., Nadolski, M.J., Liao, X., Magallon, J., Nguyen, M., Feric, N.T., Koschinsky, M.L., Harkewicz, R., Witztum, J.L., Tsimikas, S., et al. (2010). Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab.* 12, 467–482.
- Seimon, T.A., Obstfeld, A., Moore, K.J., Golenbock, D.T., and Tabas, I. (2006). Combinatorial pattern recognition receptor signaling alters the balance of life and death in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 19794–19799.
- Sekiya, M., Osuga, J.-I., Nagashima, S., Ohshiro, T., Igarashi, M., Okazaki, H., Takahashi, M., Tazoe, F., Wada, T., Ohta, K., et al. (2009). Ablation of neutral cholesterol ester hydrolase 1 accelerates atherosclerosis. *Cell Metab.* 10, 219–228.
- Seneviratne, A.N., Sivagurunathan, B., and Monaco, C. (2012). Toll-like receptors and macrophage activation in atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta* 413, 3–14.
- Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* 7, 311–317.
- Seres, L., Cserepes, J., Elkind, N.B., Törőcsik, D., Nagy, L., Sarkadi, B., and Homolya, L. (2008). Functional ABCG1 expression induces apoptosis in macrophages and other cell types. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778, 2378–2387.
- Seta, Y., Kanda, T., Tanaka, T., Arai, M., Sekiguchi, K., Yokoyama, T., Kurimoto, M., Tamura, J., and Kurabayashi, M. (2000). Interleukin 18 in acute myocardial infarction. *Heart* 84, 668.
- Shao, B., Tang, C., Sinha, A., Mayer, P.S., Davenport, G.D., Brot, N., Oda, M.N., Zhao, X.-Q., and Heinecke, J.W. (2014). Humans with atherosclerosis have impaired ABCA1 cholesterol efflux and enhanced high-density lipoprotein oxidation by myeloperoxidase. *Circ. Res.* 114, 1733–1742.
- Shapiro, H., Pecht, T., Shaco-Levy, R., Harman-Boehm, I., Kirshtein, B., Kuperman, Y., Chen, A., Blüher, M., Shai, I., and Rudich, A. (2013). Adipose tissue foam cells are present in human obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 1173–1181.
- Shearn, A.I.U., Deswaerte, V., Gautier, E.L., Saint-Charles, F., Pirault, J., Bouchareychas, L., Rucker, E.B., 3rd, Beliard, S., Chapman, J., Jessup, W., et al. (2012). Bcl-x inactivation in macrophages accelerates progression of advanced atherosclerotic lesions in Apoe(-/-) mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1142–1149.
- Shemesh, S., Kamari, Y., Shaish, A., Olteanu, S., Kandel-Kfir, M., Almog, T., Grosskopf, I., Apte, R.N., and Harats, D. (2012). Interleukin-1 receptor type-1 in non-hematopoietic cells is the target for the pro-atherogenic effects of interleukin-1 in apoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 222, 329–336.
- Shi, C., and Pamer, E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* 11, 762–774.

- Shon, S.-M., Choi, Y., Kim, J.-Y., Lee, D.K., Park, J.-Y., Schellingerhout, D., and Kim, D.-E. (2013). Photodynamic therapy using a protease-mediated theranostic agent reduces cathepsin-B activity in mouse atheromata in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 1360–1365.
- Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* *122*, 787–795.
- Simeoni, E., Winkelmann, B.R., Hoffmann, M.M., Fleury, S., Ruiz, J., Kappenberger, L., März, W., and Vassalli, G. (2004). Association of RANTES G-403A gene polymorphism with increased risk of coronary arteriosclerosis. *Eur. Heart J.* *25*, 1438–1446.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 31–39.
- Singaraja, R.R., Visscher, H., James, E.R., Chroni, A., Coutinho, J.M., Brunham, L.R., Kang, M.H., Zannis, V.I., Chimini, G., and Hayden, M.R. (2006). Specific Mutations in ABCA1 Have Discrete Effects on ABCA1 Function and Lipid Phenotypes Both In Vivo and In Vitro. *Circulation Research* *99*, 389–397.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* *458*, 1131–1135.
- Smale, S.T. (2011). Hierarchies of NF- κ B target-gene regulation. *Nat Immunol* *12*, 689–694.
- Soehnlein, O. (2012). Multiple Roles for Neutrophils in Atherosclerosis. *Circulation Research* *110*, 875–888.
- Soehnlein, O., Drechsler, M., Döring, Y., Lievens, D., Hartwig, H., Kemmerich, K., Ortega-Gómez, A., Mandl, M., Vijayan, S., Projahn, D., et al. (2013). Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes: Control of atherogenic classical monocytes. *EMBO Molecular Medicine* *5*, 471–481.
- Soifer, H.S., Rossi, J.J., and Saetrom, P. (2007). MicroRNAs in disease and potential therapeutic applications. *Mol. Ther.* *15*, 2070–2079.
- Song, L., and Schindler, C. (2004). IL-6 and the acute phase response in murine atherosclerosis. *Atherosclerosis* *177*, 43–51.
- Sorrentino, V., Nelson, J.K., Maspero, E., Marques, A.R.A., Scheer, L., Polo, S., and Zelcer, N. (2013). The LXR-IDOL axis defines a clathrin-, caveolae-, and dynamin-independent endocytic route for LDLR internalization and lysosomal degradation. *The Journal of Lipid Research* *54*, 2174–2184.
- Spann, N.J., Garmire, L.X., McDonald, J.G., Myers, D.S., Milne, S.B., Shibata, N., Reichart, D., Fox, J.N., Shaked, I., Heudobler, D., et al. (2012). Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell* *151*, 138–152.
- Stark, M.A., Huo, Y., Burcin, T.L., Morris, M.A., Olson, T.S., and Ley, K. (2005). Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* *22*, 285–294.
- Stark, M.A., Huo, Y., Burcin, T.L., Morris, M.A., Olson, T.S., and Ley, K. (2005). Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* *22*, 285–294.
- Steinman, R.M. (2012). Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu. Rev. Immunol.* *30*, 1–22.
- Stewart, C.R., Stuart, L.M., Wilkinson, K., van Gils, J.M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K.J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W.A., et al. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat. Immunol.* *11*, 155–161.
- Subbaiah, P.V., and Liu, M. (1993). Role of sphingomyelin in the regulation of cholesterol esterification in the plasma lipoproteins. Inhibition of lecithin-cholesterol acyltransferase reaction. *J. Biol. Chem.* *268*, 20156–20163.

- Sukhova, G.K., Zhang, Y., Pan, J.-H., Wada, Y., Yamamoto, T., Naito, M., Kodama, T., Tsimikas, S., Witztum, J.L., Lu, M.L., et al. (2003). Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **111**, 897–906.
- Sullivan, D.P., Ohvo-Rekilä, H., Baumann, N.A., Beh, C.T., and Menon, A.K. (2006a). Sterol trafficking between the endoplasmic reticulum and plasma membrane in yeast. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 356–358.
- Sun, D., Zhang, J., Xie, J., Wei, W., Chen, M., and Zhao, X. (2012). MiR-26 controls LXR-dependent cholesterol efflux by targeting ABCA1 and ARL7. *FEBS Lett.* **586**, 1472–1479.
- Sun, X., He, S., Wara, A.K.M., Icli, B., Shvartz, E., Tesmenitsky, Y., Belkin, N., Li, D., Blackwell, T.S., Sukhova, G.K., et al. (2014). Systemic delivery of microRNA-181b inhibits nuclear factor- κ B activation, vascular inflammation, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circ. Res.* **114**, 32–40.
- Swirski, F.K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F.W., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J. Clin. Invest.* **117**, 195–205.
- Tacke, F., Alvarez, D., Kaplan, T.J., Jakubzick, C., Spanbroek, R., Llodra, J., Garin, A., Liu, J., Mack, M., van Rooijen, N., et al. (2007). Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* **117**, 185–194.
- Tang, C., Kanter, J.E., Bornfeldt, K.E., Leboeuf, R.C., and Oram, J.F. (2010). Diabetes reduces the cholesterol exporter ABCA1 in mouse macrophages and kidneys. *J. Lipid Res.* **51**, 1719–1728.
- Tang, C., Liu, Y., Kessler, P.S., Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2009). The Macrophage Cholesterol Exporter ABCA1 Functions as an Anti-inflammatory Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 32336–32343.
- Tangirala, R.K., Bischoff, E.D., Joseph, S.B., Wagner, B.L., Walczak, R., Laffitte, B.A., Daige, C.L., Thomas, D., Heyman, R.A., Mangelsdorf, D.J., et al. (2002). Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 11896–11901.
- Tani, S., Nagao, K., Anazawa, T., Kawamata, H., Furuya, S., Takahashi, H., Iida, K., Matsumoto, M., Washio, T., Kumabe, N., et al. (2009). Association of Leukocyte Subtype Counts With Coronary Atherosclerotic Regression Following Pravastatin Treatment. *The American Journal of Cardiology* **104**, 464–469.
- Tardif, J.-C. (2006). Antioxidants: the good, the bad and the ugly. *Can J Cardiol* **22 Suppl B**, 61B–65B.
- Tarling, E.J., and Edwards, P.A. (2011). ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 19719–19724.
- Tchoua, U., Gillard, B.K., and Pownall, H.J. (2010). HDL superphospholipidation enhances key steps in reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* **209**, 430–435.
- Tenger, C., Sundborger, A., Jawien, J., and Zhou, X. (2005). IL-18 accelerates atherosclerosis accompanied by elevation of IFN- γ and CXCL16 expression independently of T cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 791–796.
- Thorp, E., Li, G., Seimon, T.A., Kuriakose, G., Ron, D., and Tabas, I. (2009). Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe $^{-/-}$ and Ldlr $^{-/-}$ mice lacking CHOP. *Cell Metab.* **9**, 474–481.
- Tian, X., Pascal, G., and Monget, P. (2009). Evolution and functional divergence of NLRP genes in mammalian reproductive systems. *BMC Evol. Biol.* **9**, 202.
- Tontonoz, P. (2011). Transcriptional and Posttranscriptional Control of Cholesterol Homeostasis by Liver X Receptors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **76**, 129–137.
- Trøseid, M., Seljeflot, I., and Arnesen, H. (2010). The role of interleukin-18 in the metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol* **9**, 11.

- Tward, A., Xia, Y.-R., Wang, X.-P., Shi, Y.-S., Park, C., Castellani, L.W., Lusis, A.J., and Shih, D.M. (2002). Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 106, 484–490.
- Ueda, Y., Gong, E., Royer, L., Cooper, P.N., Francone, O.L., and Rubin, E.M. (2000). Relationship between expression levels and atherogenesis in scavenger receptor class B, type I transgenics. *J. Biol. Chem.* 275, 20368–20373.
- Valacchi, G., Sticozzi, C., Lim, Y., and Pecorelli, A. (2011). Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1229, E1–E7.
- Van de Laar, L., Coffey, P.J., and Woltman, A.M. (2012). Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* 119, 3383–3393.
- Van der Stoep, M., Li, Z., Calpe-Berdiel, L., van der Sluis, R.J., Saleh, P., McKinnon, H.J., Smit, M.J., Korpelaar, S.J.A., Van Berkel, T.J.C., Van Eck, M., et al. (2013). Elimination of macrophages drives LXR-induced regression both in initial and advanced stages of atherosclerotic lesion development. *Biochem. Pharmacol.* 86, 1594–1602.
- Van Eck, M., Bos, I.S.T., Hildebrand, R.B., Van Rij, B.T., and Van Berkel, T.J.C. (2004). Dual role for scavenger receptor class B, type I on bone marrow-derived cells in atherosclerotic lesion development. *Am. J. Pathol.* 165, 785–794.
- Van Gils, J.M., Derby, M.C., Fernandes, L.R., Ramkhalawon, B., Ray, T.D., Rayner, K.J., Parathath, S., Distel, E., Feig, J.L., Alvarez-Leite, J.I., et al. (2012). The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques. *Nat. Immunol.* 13, 136–143.
- Van Gils, J.M., Ramkhalawon, B., Fernandes, L., Stewart, M.C., Guo, L., Seibert, T., Menezes, G.B., Cara, D.C., Chow, C., Kinane, T.B., et al. (2013). Endothelial expression of guidance cues in vessel wall homeostasis dysregulation under proatherosclerotic conditions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 911–919.
- Van Lenten, B.J., Wagner, A.C., Navab, M., and Fogelman, A.M. (2001). Oxidized phospholipids induce changes in hepatic paraoxonase and ApoI but not monocyte chemoattractant protein-1 via interleukin-6. *J. Biol. Chem.* 276, 1923–1929.
- Vandanmagsar, B., Youm, Y.-H., Ravussin, A., Galgani, J.E., Stadler, K., Mynatt, R.L., Ravussin, E., Stephens, J.M., and Dixit, V.D. (2011). The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat. Med.* 17, 179–188.
- Vaughan, A.M., Tang, C., and Oram, J.F. (2009). ABCA1 mutants reveal an interdependency between lipid export function, apoA-I binding activity, and Janus kinase 2 activation. *J. Lipid Res.* 50, 285–292.
- Vergeer, M., Korpelaar, S.J.A., Franssen, R., Meurs, I., Out, R., Hovingh, G.K., Hoekstra, M., Sierts, J.A., Dallinga-Thie, G.M., Motazacker, M.M., et al. (2011). Genetic variant of the scavenger receptor BI in humans. *N. Engl. J. Med.* 364, 136–145.
- Viennois, E., Pommier, A.J., Mouzat, K., Oumeddour, A., Hajjaji, F.-Z.E., Dufour, J., Caira, F., Volle, D.H., Baron, S., and Lobaccaro, J.-M.A. (2011). Targeting liver X receptors in human health: deadlock or promising trail? *Expert Opin. Ther. Targets* 15, 219–232.
- Villard, E.F., El Khoury, P., Frisdal, E., Bruckert, E., Clement, K., Bonnefont-Rousselot, D., Bittar, R., Le Goff, W., and Guerin, M. (2013). Genetic determination of plasma cholesterol efflux capacity is gender-specific and independent of HDL-cholesterol levels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 822–828.
- Vinod, M., Chennamsetty, I., Colin, S., Belloy, L., De Paoli, F., Schaidt, H., Graier, W.F., Frank, S., Kratky, D., Staels, B., et al. (2014). miR-206 controls LXRA expression and promotes LXR-mediated cholesterol efflux in macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 827–835.

- Vishnyakova, T.G., Bocharov, A.V., Baranova, I.N., Chen, Z., Remaley, A.T., Csako, G., Eggerman, T.L., and Patterson, A.P. (2003). Binding and internalization of lipopolysaccharide by Cla-1, a human orthologue of rodent scavenger receptor B1. *J. Biol. Chem.* **278**, 22771–22780.
- Voight, B.F., Peloso, G.M., Orho-Melander, M., Frikke-Schmidt, R., Barbalic, M., Jensen, M.K., Hindy, G., Hólm, H., Ding, E.L., Johnson, T., et al. (2012). Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet* **380**, 572–580.
- Wagner, B.L., Valledor, A.F., Shao, G., Daige, C.L., Bischoff, E.D., Petrowski, M., Jepsen, K., Baek, S.H., Heyman, R.A., Rosenfeld, M.G., et al. (2003). Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5780–5789.
- Waldo, S.W., Li, Y., Buono, C., Zhao, B., Billings, E.M., Chang, J., and Kruth, H.S. (2008). Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques. *Am. J. Pathol.* **172**, 1112–1126.
- Wan, W., Lionakis, M.S., Liu, Q., Roffè, E., and Murphy, P.M. (2013). Genetic deletion of chemokine receptor Ccr7 exacerbates atherogenesis in ApoE-deficient mice. *Cardiovasc. Res.* **97**, 580–588.
- Wang, M., Subramanian, M., Abramowicz, S., Murphy, A.J., Gonen, A., Witztum, J., Welch, C., Tabas, I., Westerterp, M., and Tall, A.R. (2014). Interleukin-3/Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor Promotes Stem Cell Expansion, Monocytosis, and Atheroma Macrophage Burden in Mice With Hematopoietic ApoE Deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**, 976–984.
- Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., and Tall, A.R. (2004). ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 9774–9779.
- Wang, N., Ranalletta, M., Matsuura, F., Peng, F., and Tall, A.R. (2006). LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**, 1310–1316.
- Wang, X., Collins, H.L., Ranalletta, M., Fuki, I.V., Billheimer, J.T., Rothblat, G.H., Tall, A.R., and Rader, D.J. (2007). Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J. Clin. Invest.* **117**, 2216–2224.
- Wang, Y., Wang, G.Z., Rabinovitch, P.S., and Tabas, I. (2014). Macrophage mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and nuclear factor- κ B-mediated inflammation in macrophages. *Circ. Res.* **114**, 421–433.
- Watson, A.D., Berliner, J.A., Hama, S.Y., La Du, B.N., Faull, K.F., Fogelman, A.M., and Navab, M. (1995). Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J. Clin. Invest.* **96**, 2882–2891.
- Wei, S., Xie, C., Abe, Y., and Cai, J. (2009). ADP-ribosylation factor like 7 (ARL7) interacts with alpha-tubulin and modulates intracellular vesicular transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **384**, 352–356.
- Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* **112**, 1796–1808.
- Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M.T.-H., Brickey, W.J., and Ting, J.P.-Y. (2011). Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling. *Nat. Immunol.* **12**, 408–415.
- Westerterp, M., Murphy, A.J., Wang, M., Pagler, T.A., Vengrenyuk, Y., Kappus, M.S., Gorman, D.J., Nagareddy, P.R., Zhu, X., Abramowicz, S., et al. (2013). Deficiency of ATP-binding cassette transporters A1 and G1 in macrophages increases inflammation and accelerates atherosclerosis in mice. *Circ. Res.* **112**, 1456–1465.
- White, G.E., Tan, T.C.C., John, A.E., Whatling, C., McPheat, W.L., and Greaves, D.R. (2010). Fractalkine has anti-apoptotic and proliferative effects on human vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor signalling. *Cardiovasc Res* **85**, 825–835.

- Whitman, S.C., Ravisankar, P., and Daugherty, A. (2002). Interleukin-18 enhances atherosclerosis in apolipoprotein E(-/-) mice through release of interferon-gamma. *Circ. Res.* 90, E34–38.
- Williams, H., Johnson, J.L., Jackson, C.L., White, S.J., and George, S.J. (2010). MMP-7 mediates cleavage of N-cadherin and promotes smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 87, 137–146.
- Wilson, S.H., Caplice, N.M., Simari, R.D., Holmes, D.R., Carlson, P.J., and Lerman, A. (2000). Activated nuclear factor-kappaB is present in the coronary vasculature in experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 148, 23–30.
- Wilund, K.R., Yu, L., Xu, F., Hobbs, H.H., and Cohen, J.C. (2004). High-level expression of ABCG5 and ABCG8 attenuates diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in Ldlr-/- mice. *J. Lipid Res.* 45, 1429–1436.
- Witztum, J.L., and Lichtman, A.H. (2014). The Influence of Innate and Adaptive Immune Responses on Atherosclerosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 9, 73–102.
- Witztum, J.L., and Steinberg, D. (2001). The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: does it hold for humans? *Trends Cardiovasc. Med.* 11, 93–102.
- Woollard, K.J., and Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* 7, 77–86.
- Wright, S.D., Burton, C., Hernandez, M., Hassing, H., Montenegro, J., Mundt, S., Patel, S., Card, D.J., Hermanowski-Vosatka, A., Bergstrom, J.D., et al. (2000). Infectious agents are not necessary for murine atherogenesis. *J. Exp. Med.* 191, 1437–1442.
- Wu, Z., Wagner, M.A., Zheng, L., Parks, J.S., Shy, J.M., Smith, J.D., Gogonea, V., and Hazen, S.L. (2007). The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 861–868.
- Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496, 445–455.
- Xu, S., Benoff, B., Liou, H.-L., Lobel, P., and Stock, A.M. (2007). Structural basis of sterol binding by NPC2, a lysosomal protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease. *J. Biol. Chem.* 282, 23525–23531.
- Xu, X.-P., Meisel, S.R., Ong, J.M., Kaul, S., Cercek, B., Rajavashisth, T.B., Sharifi, B., and Shah, P.K. (1999). Oxidized Low-Density Lipoprotein Regulates Matrix Metalloproteinase-9 and Its Tissue Inhibitor in Human Monocyte-Derived Macrophages. *Circulation* 99, 993–998.
- Xu, Y., Wang, W., Zhang, L., Qi, L.-P., Li, L.-Y., Chen, L.-F., Fang, Q., Dang, A.-M., and Yan, X.-W. (2011). A polymorphism in the ABCG1 promoter is functionally associated with coronary artery disease in a Chinese Han population. *Atherosclerosis* 219, 648–654.
- Yabe, D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2002a). Insig-2, a second endoplasmic reticulum protein that binds SCAP and blocks export of sterol regulatory element-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 12753–12758.
- Yagyu, H., Kitamine, T., Osuga, J., Tozawa, R., Chen, Z., Kaji, Y., Oka, T., Perrey, S., Tamura, Y., Ohashi, K., et al. (2000). Absence of ACAT-1 attenuates atherosclerosis but causes dry eye and cutaneous xanthomatosis in mice with congenital hyperlipidemia. *J. Biol. Chem.* 275, 21324–21330.
- Yancey, P.G., Bortnick, A.E., Kellner-Weibel, G., de la Llera-Moya, M., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (2003). Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 712–719.
- Yancey, P.G., de la Llera-Moya, M., Swarnakar, S., Monzo, P., Klein, S.M., Connelly, M.A., Johnson, W.J., Williams, D.L., and Rothblat, G.H. (2000). High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J. Biol. Chem.* 275, 36596–36604.

- Ye, X., Jiang, X., Guo, W., Clark, K., and Gao, Z. (2013). Overexpression of NF- κ B p65 in macrophages ameliorates atherosclerosis in apoE-knockout mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *305*, E1375–1383.
- Yin, K., Chen, W.-J., Zhou, Z.-G., Zhao, G.-J., Lv, Y.-C., Ouyang, X.-P., Yu, X.-H., Fu, Y., Jiang, Z.-S., and Tang, C.-K. (2012). Apolipoprotein A-I inhibits CD40 proinflammatory signaling via ATP-binding cassette transporter A1-mediated modulation of lipid raft in macrophages. *J. Atheroscler. Thromb.* *19*, 823–836.
- Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 454–465.
- Yoshimura, T., Robinson, E.A., Tanaka, S., Appella, E., and Leonard, E.J. (1989). Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *J. Immunol.* *142*, 1956–1962.
- Yu, X.-H., Fu, Y.-C., Zhang, D.-W., Yin, K., and Tang, C.-K. (2013). Foam cells in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta* *424*, 245–252.
- Yvan-Charvet, L., Pagler, T., Gautier, E.L., Avagyan, S., Siry, R.L., Han, S., Welch, C.L., Wang, N., Randolph, G.J., Snoeck, H.W., et al. (2010). ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science* *328*, 1689–1693.
- Yvan-Charvet, L., Pagler, T.A., Wang, N., Senokuchi, T., Brundert, M., Li, H., Rinninger, F., and Tall, A.R. (2008). SR-BI inhibits ABCG1-stimulated net cholesterol efflux from cells to plasma HDL. *J. Lipid Res.* *49*, 107–114.
- Yvan-Charvet, L., Ranalletta, M., Wang, N., Han, S., Terasaka, N., Li, R., Welch, C., and Tall, A.R. (2007). Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.* *117*, 3900–3908.
- Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., and Tontonoz, P. (2009). LXR Regulates Cholesterol Uptake Through Idol-Dependent Ubiquitination of the LDL Receptor. *Science* *325*, 100–104.
- Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 107–117.
- Zernecke, A. (2014). Distinct Functions of Specialized Dendritic Cell Subsets in Atherosclerosis and the Road Ahead. *Scientifica (Cairo)* *2014*, 952625.
- Zernecke, A., and Weber, C. (2014). Chemokines in atherosclerosis: proceedings resumed. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *34*, 742–750.
- Zhang, W., Yancey, P.G., Su, Y.R., Babaev, V.R., Zhang, Y., Fazio, S., and Linton, M.F. (2003). Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* *108*, 2258–2263.
- Zhang, Y., Breevoort, S.R., Angdisen, J., Fu, M., Schmidt, D.R., Holmstrom, S.R., Kliewer, S.A., Mangelsdorf, D.J., and Schulman, I.G. (2012). Liver LXR α expression is crucial for whole body cholesterol homeostasis and reverse cholesterol transport in mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 1688–1699.
- Zheng, F., Xing, S., Gong, Z., Mu, W., and Xing, Q. (2014). Silence of NLRP3 Suppresses Atherosclerosis and Stabilizes Plaques in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Mediators Inflamm.* *2014*, 507208.
- Zhong, D., Huang, G., Zhang, Y., Zeng, Y., Xu, Z., Zhao, Y., He, X., and He, F. (2013). MicroRNA-1 and microRNA-206 suppress LXR α -induced lipogenesis in hepatocytes. *Cell. Signal.* *25*, 1429–1437.
- Zhong, Z., Zhai, Y., Liang, S., Mori, Y., Han, R., Sutterwala, F.S., and Qiao, L. (2013). TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun* *4*, 1611.
- Zhu, X., Owen, J.S., Wilson, M.D., Li, H., Griffiths, G.L., Thomas, M.J., Hiltbold, E.M., Fessler, M.B., and Parks, J.S. (2010). Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol. *J. Lipid Res.* *51*, 3196–3206.
- Zylbersztejn, K., and Galli, T. (2011). Vesicular traffic in cell navigation. *FEBS Journal* *278*, 4497–4505.

RESUME

Nouvelles voies de régulation contrôlant l'homéostasie lipidique et l'inflammation dans le macrophage humain au cours de l'athérosclérose

L'accumulation de cellules spumeuses dans l'intima des artères est le point critique de l'initiation de l'athérosclérose. L'accumulation de cholestérol et l'activation des voies pro-inflammatoires sont responsables de l'acquisition par les macrophages de ce phénotype délétère. Les dérivés oxydés du cholestérol accumulés vont stimuler les récepteurs nucléaires LXR et incidemment l'efflux de cholestérol athéroprotecteur, tandis que la phagocytose de cholestérol cristallisé dans la lésion causera une perturbation du trafic vésiculaire qui activera l'inflammasome NLRP3, verrou de l'inflammation IL-1. Cette étude a pour but de décrypter ces voies dans le macrophage humain.

La stimulation de l'efflux de cholestérol par un agoniste LXR dans le macrophage humain m'a été médiée par l'activation transcriptionnelle LXR α -dépendante d'ARL7 - qui permet le transport du cholestérol libre de la membrane des endosomes et lysosomes aux radeaux lipidiques – et du transporteur ABCA1 – l'exportant vers les HDL, lipoprotéines athéroprotectrices.

L'activation du complexe multi-protéique NLRP3 dans le macrophage, et la sécrétion des cytokines délétères IL-1 β et IL-18, est également réprimée par l'agoniste LXR. L'activation des cathepsines B et L par l'enzyme AEP est aussi nécessaire pour l'activation de NLRP3 par des cristaux. Inactiver l'AEP protège ainsi contre le développement de l'athérosclérose.

Ces travaux ont démontré la nécessité des études chez l'humain pour la mise en évidence des mécanismes moléculaires et la nécessité d'intégrer les signalisations lipidiques et inflammatoires étroitement liées dans la cellule spumeuse.

New insights in signaling pathways controlling lipid homeostasis and inflammation in human macrophages during atherosclerosis

Foam cell accumulation in arterial walls is the critical initiating event of atheroma plaque development. Macrophages acquire this phenotype by cholesterol ester accumulation and pro-inflammatory signaling pathways activation. Oxidized form of cholesterol activates LXR and subsequently atheroprotective cellular cholesterol efflux. In parallel, crystallized cholesterol phagocytosis will impair vesicular traffic, activating NLRP3 and deleterious IL-1 cytokines release. Here we describe further those pathways in human macrophages and to evidence new key factors in atherosclerosis development.

First, stimulation of cellular cholesterol efflux to ApoA-I and HDL from human macrophage by LXR agonist is LXR α -dependent. Transcriptional activation of ARL7 increases cholesterol transport from endolysosomal membrane to efflux-prone plasmic membrane pools, lipid rafts. From there, cholesterol will be exported on ApoA-I containing lipoproteins by ABCA1 transporter, whose expression is stimulated by LXR α agonists as well.

Cholesterol crystals phagocytosis will lead to inflammasome NLRP3 activation, leading to pro-atherogenous IL-1 β and IL-18 secretion. We first showed LXR agonist GW3965 role in repressing transcription of

NLRP3 partners. Also, we evidenced the importance of cathepsin B and L maturation by asparagin endopeptidase (AEP) in human macrophages, and atheroprotective properties of AEP silencing.

Overall, this work demonstrated the necessity of using human models to confirm murine data about molecular mechanisms. Also, it is important to integrate lipid homeostasis and inflammation signaling in foam cells, for there is a strong molecular link between both.