



Rôle de la signalisation LRP1/Wnt5a dans le métabolisme du cholestérol

Marion Jenty

► To cite this version:

Marion Jenty. Rôle de la signalisation LRP1/Wnt5a dans le métabolisme du cholestérol. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2016. Français. NNT: 2016STRAJ025 . tel-01492892

HAL Id: tel-01492892

<https://theses.hal.science/tel-01492892>

Submitted on 20 Mar 2017

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

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



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

LABORATOIRE DE BIOPHOTONIQUE ET PHARMACOLOGIE

UMR CNRS 7213 Faculté de Pharmacie

Thèse présentée par

Marion JENTY

soutenue le 8 juin 2016

pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline : Sciences du Vivant - Aspects Moléculaires et Cellulaire de la Biologie

**Rôle de la signalisation LRP1/Wnt5a dans le
métabolisme du cholestérol.**

THÈSE dirigée par :

M. Boucher Philippe

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

M. Collet Xavier

Directeur de recherche, I2MC, Toulouse

M. Staels Bart

Professeur, Institut Pasteur, Lille

AUTRES MEMBRES DU JURY :

MM. Kilhoffer Marie-Claude

Professeur, Université de Strasbourg

A Charles

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement le docteur Xavier Collet et les professeurs Marie-Claude Kilhoffer, Bart Staels et Daniel Metzger, membres de mon jury, de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail de thèse.

Je remercie le professeur Philippe Boucher de m'avoir offert l'opportunité de faire cette thèse au sein de son laboratoire et pour son encadrement lors des expériences et de la rédaction pendant ces années de thèse.

Un grand merci au docteur Véronique Bruban-Schann pour l'encadrement, les conseils, les discussions et les nombreuses expériences réalisées. J'espère que ta rigueur expérimentale aura un peu déteint sur moi. Merci d'avoir partagé ce projet avec moi.

Je remercie le docteur Jérôme Terrand pour les discussions scientifiques qui m'ont fait progresser, pour les conseils techniques et pour ton aide précieuse. Merci au docteur Rachel Matz-Westphal qui m'a enseigné l'immunomarquage. Merci pour tes précieux conseils tout au long de cette thèse. Enfin merci à Ingrid pour toute la logistique.

Merci également à Hélène Justiniano pour l'aide technique sur le projet, au docteur Christian Boudier pour m'avoir initié et aidé lors de la purification de protéine. Un grand merci à Jean-Marie Garnier pour votre aide infiniment précieuse sur le clonage, pour votre écoute et pour les chocolats chauds...

Lionel Host. Merci pour tout, pour ton aide dans les manip, pour ta rigueur, ta gentillesse et ton humour. Savoir que je pouvais compter sur toi m'a été très précieux pendant cette thèse...

Merci à l'équipe de Monique Dontenwill : Monique, Sophie, Laurence, Fanny, Isabelle et Maxime avec qui j'ai eu grand plaisir à partager ce couloir. Un merci tout particulier à Guillaume Renner, je te souhaite plein de réussite pour la suite.

Merci au docteur Anne-Marie Ray-Desaphy pour m'avoir accueillie à mon arrivée dans ce bureau et m'avoir fait découvrir Strasbourg. Je te souhaite une belle carrière et une belle vie.

Merci à Thomas et Florian. Des belles rencontres, je suis ravie qu'elles se prolongent comme ça.

Un merci à tous ces gens que j'ai côtoyé et qui ont contribué à la bonne ambiance du labo : Manu, Kamal, Sarah, Gaëlle, Nedal, Sarwat, Jérémy, Marielle, Marie ect...

Docteur Anne-Florence Blandin, Anneflo. Ton soutien et ton amitié m'ont été plus qu'indispensable. Je n'y serais pas arrivée sans toi, merci merci merci.

Marine, Coralie, Heidi et Rafik. Merci pour votre soutien moral pendant toutes ces années, pour être toujours disponibles, pour vos parcours de thèse qui m'ont inspiré et m'ont aidé à m'accrocher, merci pour les bons souvenirs ensemble. Merci d'avoir été là dans les moments difficiles et dans ceux bien plus drôles. Je vous souhaite à tous la brillante carrière que vous méritez !

Rebecca. Merci d'être toujours dans le coin et pour tes petits mots d'encouragement. Je vous souhaite plein de bonheur à toi et ta petite famille.

Merci à mes frères Valentin et Mathieu et Claire pour votre soutien, pour notre complicité qui m'a été précieuse pendant ces années trop loin de vous. On est tous en ce moment à des tournants de nos vies et je vous (nous) souhaite beaucoup de bonheur et de réussite.

Merci à toute ma grande famille pour votre présence et vos encouragements, spécialement à Monique pour l'orthographe ! Merci à ma Grand-Mère pour tout ce qu'elle a fait pour moi.

Un merci infini à mes parents qui sont parfaits. Quand je serai grande, je veux être comme vous.

Merci Maman de me montrer l'importance d'être passionnée par son travail, d'être toujours là pour moi, pour m'encourager et discuter de tout. Merci Papa de me montrer qu'il ne faut jamais avoir peur de faire ce qu'il faut pour être heureux, que rien n'est jamais définitif si on s'en donne les moyens et qu'on peut avoir plein de vies dans une vie. Ton courage est un exemple pour moi et m'a aidé pendant ces 3 ans. Merci pour votre soutien sans faille et votre fierté.

Laurent. Merci d'avoir rendu ces 3 ans plus légers par ta présence et de rendre ma vie plus belle. Merci de m'avoir suivi jusqu'ici pour cette thèse, et merci pour ta promesse de partager avec moi les années qui arrivent...

Résumé

Les conséquences cliniques de l'athérosclérose sont la première cause de mortalité dans les pays industrialisés. Le principal facteur de risque de cette pathologie inflammatoire est un taux de cholestérol sanguin élevé, favorisant son accumulation dans les cellules de la paroi artérielle et conduisant à la formation des plaques d'athérome. Les traitements à base de statines visant à faire baisser le taux de cholestérol sont efficaces pour traiter la maladie, cependant, certains patients peuvent présenter une résistance à ces molécules. Comprendre les mécanismes de développement de l'athérosclérose est donc nécessaire à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le récepteur membranaire LRP1 protège de l'athérosclérose en contrôlant des voies de signalisation cellulaire impliquées dans la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle. Il prévient également l'accumulation de cholestérol dans ces cellules, par une signalisation impliquant la protéine sécrétée Wnt5a, mais dont les mécanismes restent à élucider.

Notre projet de recherche s'articule autour de l'identification de ces mécanismes moléculaires et de la vérification de l'effet protecteur de Wnt5a *in vivo*. *In vitro* et dans le tissu adipeux de souris surexprimant Wnt5a, nous avons montré que l'expression de cette protéine stimule l'expression des transporteurs impliqués dans l'efflux de cholestérol et inhibe l'expression du gène codant l'enzyme clé de la synthèse de cholestérol, concourant à faire diminuer la quantité intracellulaire de cholestérol. La validation de l'effet protecteur de Wnt5a *in vivo* a été débutée avec des souris ayant un fond génétique déficient en récepteur aux LDL et invalidées pour le gène de Wnt5a spécifiquement dans les cellules musculaires lisses. Si le mécanisme observé *in vitro* se vérifie, ces souris devraient présenter plus de lésions que les contrôles après un régime riche en cholestérol. Nous avons par ailleurs observé chez ces souris un phénotype de mortalité périnatale élevée par rapport aux souris contrôles. Ce projet ouvre donc des perspectives de recherche fondamentale sur l'étude du rôle de Wnt5a dans le développement embryonnaire du système cardiovasculaire.

Abstract

Atherosclerosis and its cardiovascular complications are the leading cause of morbidity and mortality in industrialized countries. A high plasma LDL cholesterol level is the major pro-atherogenic factor, involved in both the initiation and progression of atherosclerotic lesions. We and other laboratories have demonstrated that the LDL-Receptor Related Protein 1 (LRP1) expressed in vascular smooth muscle cells protects against atherosclerosis by controlling proliferative TGF β and PDGF signaling pathways. We also demonstrate that LRP1 limits cholesterol intracellular accumulation and we identified the secreted protein Wnt5a as a partner of this protective effect of LRP1.

The aim of this thesis is to determine the molecular mechanisms by which the LRP1 / Wnt5a signaling pathway prevents cholesterol accumulation in cells and to study the antiatherogenic potential of Wnt5a *in vivo*.

In the first part of our work, we used cultured cells to show that Wnt5a decreases cellular cholesterol content by stimulating its efflux through the induction of cholesterol transporters expression and by down-regulating the expression of HMGCoA-reductase. We confirmed those data *in vivo* using transgenic mice overexpressing Wnt5a in adipose tissue.

In the second part, we used mice deleted for Wnt5a specifically in smooth muscle cells to show that Wnt5a protects against atherosclerosis. Those mice present an unexpected phenotype of perinatal death. The causes of this phenotype are still explored and will give new evidences about the role of Wnt5a in embryogenesis.

Liste des communications

Une partie des travaux a été présentée dans les congrès suivants :

Communications orales :

2nd Tri Rhena Metabolism Club Meeting.

« *The LRP1/Wnt5a signaling pathway protects against cellular cholesterol accumulation* »

Janvier 2015, Illkirch-Graffenstaden, France.

Journées annuelles de l'École doctorale.

« *The LRP1/Wnt5a signaling pathway protects against cellular cholesterol accumulation* »

Février 2015, Illkirch-Graffenstaden, France.

Communications affichées :

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire – Spemann Graduate school of Biology and Medicine joint symposium on Animals models in Biomedical Research.

« *The LRP1/Wnt5a signaling pathway protects against cellular cholesterol accumulation* »

Octobre 2014. Illkirch-Graffenstaden, France.

M. Jenty, Z. El Asmar, V. Bruban-Schann, J. Terrand, R. Matz-Westphal, L. Host, H. Justiniano, C. Boudier, P. Boucher.

Congrès de Physiologie et Biologie Intégrative.

« *The LRP1/Wnt5a signaling pathway protects against cellular cholesterol accumulation and atherosclerosis* »

Mai 2015. Strasbourg, France.

M. Jenty, Z. El Asmar, V. Bruban-Schann, J. Terrand, R. Matz-Westphal, L. Host, H. Justiniano, C. Boudier, P. Boucher.

Une partie des travaux est présentée dans l'article suivant :

« *Convergent signaling pathways controlled by LRP1 cytoplasmic and extracellular domains limit cellular cholesterol accumulation* » (Asmar et al., 2016).

Z. El Asmar, J. Terrand, M. Jenty, L. Host, M. Mlih, A. Zerr, H. Justiniano, R. Matz-Westphal, C. Boudier, E. Scholler, J-M Garnier, D. Bertaccini, D. Thierse, C. Schaeffer, A. Van Dorsselaer, J. Herz, V. Bruban-Schann, P. Boucher.

Journal of Biological Chemistry, 2016

Avant-propos

L'athérosclérose est une maladie cardiovasculaire dont les conséquences cliniques causent plusieurs millions de morts dans le monde chaque année. Un taux élevé de cholestérol circulant en est le facteur de risque principal de développement. Actuellement, les statines, molécules qui inhibent l'enzyme clé de la synthèse de cholestérol, composent le traitement médical le plus utilisé pour lutter contre cette maladie. Cependant, certains patients semblent présenter une résistance au traitement par ces molécules, qui par ailleurs, peuvent être parfois à l'origine d'effets secondaires indésirables. L'athérosclérose est causée par de multiples facteurs de risque et les mécanismes de développement et de progression sont extrêmement complexes. Il apparaît donc nécessaire de décrypter ces mécanismes au niveau moléculaire afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter les patients atteints d'athérosclérose. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce projet de thèse qui vise à comprendre comment le récepteur LRP1 et la voie signalisation Wnt5a qu'il active agissent pour protéger les cellules d'une accumulation de cholestérol.

Liste des abréviations

ABC : *ATP-Binding Cassette*

ACAT : *Acyl-CoA cholesterol acyltransferase*

ADD1 : *Adipocyte Determination and Differentiation-dependent factor 1*

AP2 : *Activating protein 2*

Apo : apolipoprotéine

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATM : *Adipose Tissue Macrophages*

BAT : *brown adipose tissue*

CD36 : *Cluster of Differentiation 36*

CEH : *Cholesterol Ester Hydrolase*

CETP : *Cholesteryl Ester Transfer Protein*

CHX : cycloheximide

CHO : *chinese hamster ovary*

CMLv : cellules musculaires lisses vasculaires

CMS : cellules souches mésenchymateuses

COP : *Coated protein*

CTGF : *Connective Tissue Growth Factor*

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

EGF : *Epidermal Growth Factor*

eNOS : *endothelial NO synthase*

ERAD : *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*

FABP4 : *Fatty Acid-Binding Protein 4*

H&E : coloration Hématoxyline et Eosine

HAEC : *Human Aortic Endothelial Cells*

HDL : *High Density Lipoprotein* HEK : *Human Embryonic Kidney*

HMGCoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A

HSL : *Hormone Sensitive Lipase*

HSP : *Heat Shock Protein*

HSV : *Herpes Simplex Virus*

ICAM : *Intercellular Adhesion Molecule*

IDL : *Intermediate-density lipoprotein*

IDOL : *Inductible Degradation Of LDL*

INF γ : Interferon Gamma

Insig : *INSulin-Induced Gene*

kDa : kiloDalton

LCAT : *Lecithin-Cholesterol Acyltransferase*

LDL : *Low Density Lipoprotein*

LDLag : LDL agrégées

LDLox : LDL oxydées

LDLR : *Low Density Lipoprotein Receptor*

LEF : *lymphoid enhancing factor*

LH : Lipase Hépatique

LiCl : *Lithium Chloride*

LMTK : lignée de fibroblastes de souris

LOX : *Lectin-like OXidized LDL receptor-1*

LPL : *Lipoprotein Lipase*

LRP1 : *Low Density Lipoprotein Receptor Associated Protein 1*

LXR : *Liver X Receptor*

LXRE : *LXR Response Element*

MCP-1 : *Monocyte Chemoattractant Protein 1*

M-CSF : *Macrophage-Colony Stimulating Factor*

MEF : *Mouse Embryonic Fibroblasts*

MEF LRP1^{-/-} : MEF invalidées pour LRP1

miRNA : microRNA

MMP : *Matrix MetalloProteinase*

MTP : *Microsomal Triglyceride Transfer Protein*

nCEH : *neutral Cholesterol Ester Hydrolase*

NFκB : *Nuclear Factor-kappa B*

NO : *Nitric Oxyde*

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORO : Oil Red O

OSBP1 : (*Oxysterols Binding Protein 1*)

ORP : (*OSBP related protein*)

PAI-1 : *type-1 plasminogen activator inhibitor*

PDGF : *Platelet Derived Growth Factor*

PIC : *protease inhibitor cocktail*

PKA : protéine kinase A

PLTP : *PhosphoLipid Transfer Protein*

PPARγ : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*

PTB : *PhosphoTyrosine Binding*

qPCR : *quantitative Polymerase Chain Reaction*

RAP : *Receptor Associated Protein*

RAR : *Retinoic Acid Receptor*

RE : Réticulum Endoplasmique

RXR : *Retinoic X Receptor*

S1P/S2P : *Site-1 Protease/Site-2 Protease*

Scap : *Sterol regulatory element-binding protein Cleavage-Activating Protein*

SF-1 : *Steroidogenic Factor 1*

Sm22LRP1 - : souris LDLR^{-/-} invalidées pour LRP1 spécifiquement dans les CMLv

Sm22Wnt5a- : souris LDLR^{-/-} invalidées pour Wnt5a spécifiquement dans les CMLv

Sp1 : *Specificity protein 1*

SR : *Scavenger Receptor*

SRE : *Sterol Regulatory Element*

SREBP : *Sterol Regulatory Element-Binding Protein*

TCF : *T-cell factor*

Tg : *transgénique*

TGF : *Transforming Growth Factor*

TK : *Tymidine Kinase*

TLR : *Toll-like Receptor*

TNF : *Tumor Necrosis Factor*

t-PA : *tissue-type Plasminogen Activator*

u-PA : *urokinase-type Plasminogen Activator*

VCAM : *Vascular Cell Adhesion Protein*

VLDL : *Very Low Density Lipoprotein*

WAT : *White Adipose Tissue*

Wnt : *Wingless integration site*

WT : *Wild Type*

Table des illustrations

Figure 1 : Structure d'une artère saine	27
Figure 2 : Chronologie des stades évolutifs de l'athérosclérose	28
Figure 3 : Initiation de la plaque	30
Figure 4 : La chape fibreuse entoure le cœur lipidique	32
Figure 5 : Structure du cholestérol	36
Figure 6 : Structure de la membrane plasmique	36
Figure 7 : La voie du mévalonate	37
Figure 8 : Structure d'une lipoprotéine	38
Figure 9 : Le métabolisme des lipoprotéines	41
Figure 10 : La régulation transcriptionnelle de l'HMGCoA-Reductase	42
Figure 11 : La régulation post-traductionnelle de l'HMGCoA-Reductase	43
Figure 12 : La double régulation de l'HMGCoA-Reductase par Insig1	44
Figure 13 : La famille des récepteurs aux LDL	46
Figure 14 : Le promoteur du gène codant ABCA1	49
Figure 15 : Les promoteurs du gène codant ABCG1	50
Figure 16 : La régulation de l'efflux par le miR33a	52
Figure 17 : L'estérification et l'hydrolyse du cholestérol	55
Figure 18 : Résumé de la régulation de l'homéostasie du cholestérol par SREBP2 et LXR	57
Figure 19 : Structure du récepteur LRP1	58
Figure 20 : L'inactivation de LRP1 spécifiquement dans les CMLv des souris LDLR-/- entraîne une augmentation de l'athérosclérose	64
Figure 21 : L'inactivation de LRP1 spécifiquement dans les CMLv des souris LDLR-/- entraîne une augmentation de la quantité de cholestérol	65
Figure 22 : Les MEF déficientes en LRP1 accumulent plus de cholestérol que les sauvages	65

Figure 23 : L'augmentation de cholestérol dans les MEF LRP1-/- est due à une augmentation de l'import	66
Figure 24 : L'expression de Wnt5a est indétectable dans les MEF déficientes en LRP1.....	66
Figure 25 : La retransfection de Wnt5a prévient l'accumulation de cholestérol.....	66
Figure 26 : La voie canonique Wnt/ β caténine	69
Figure 27 : Les voies de signalisation Wnt non canoniques.....	70
Projet de thèse : PARTIE I. Caractériser la voie de signalisation LRP1/Wnt5a mise en jeu dans la régulation du métabolisme du cholestérol.	75
Projet de thèse : PARTIE II. Confirmer le rôle athéroprotecteur de Wnt5a <i>in vivo</i>	76
Figure 28 : Purification par chromatographie de la protéine Wnt5a recombinante.....	85
Figure 29 : Stratégie de clonage du plasmide pTK-SREBP2-HSV	88
Figure 30 : Stratégie de clonage du plasmide pCMV-Insig1-cMy	89
Figure 31 : Activation de la voie Smad2 par le TGF β	96
Figure 32 : TGF β induit l'expression de Wnt5a via le domaine extracellulaire de LRP1.....	96
Figure 33 : Wnt5a stimule l'efflux de cholestérol in vitro.....	96
Figure 34 : Wnt5a stimule l'expression de ABCG1	99
Figure 35 : L'augmentation de l'expression de ABCG1 est indépendante des LXR	100
Figure 36 : Wnt5a ne stabilise pas l'ARNm de ABCG1	100
Figure 37 : Le clonage des promoteurs de ABCG1	101
Figure 38 : Wnt5a induit la transcription de ABCG1 via le promoteur B du gène.....	101
Figure 39 : La voie du mévalonate.....	102
Figure 40 : Wnt5a diminue l'expression de l'HMGCoA-Reductase.....	102
Figure 41 : Stratégie de clonage du gène SREBP2 par PCR	103
Figure 42 : Stratégies de clonage du gène SREBP2 par PCR en deux parties.....	104
Figure 43 : Wnt5a inhibe la translocation nucléaire de SREBP2	106
Figure 44 : Wnt5a inhibe la translocation nucléaire de SREBP2	106
Figure 45 : Wnt5a potentialise l'effet inhibiteur du 25-hydroxycholestérol sur la translocation de SREBP2	107

Figure 46 : Wnt5a stabilise la protéine Insig1	108
Figure 47 : Surexpression de Wnt5a dans le tissu adipeux	109
Figure 48 : Wnt5a ne perturbe pas la prise de poids des souris transgéniques	109
Figure 49 : Wnt5a ne modifie pas la masse du tissu adipeux blanc	109
Figure 50 : Wnt5a n'altère pas la morphologie des tissus adipeux des souris.....	109
Figure 51 : Wnt5a augmente l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1	110
Figure 52 : Wnt5a augmente l'expression d'ABCG1 dans les adipocytes	110
Figure 53 : L'augmentation de ABCG1 est indépendante de l'activation des LXR	110
Figure 54 : Wnt5a est surexprimée dans les macrophages péritonéaux des souris transgéniques ..	111
Figure 55 : L'expression de ABCG1 n'est pas modifiée dans les macrophages péritonéaux	111
Figure 56 : La surexpression de Wnt5a n'entraîne pas d'infiltration macrophagique dans le tissu adipeux blanc	111
Figure 57 : Wnt5a diminue l'expression de l'HMGC _o A-Reductase et l'HMGC _o A-Synthase	112
Figure 58 : L'expression de Insig1 est augmentée dans le WAT des souris transgéniques.....	112
Figure 59 : L'expression de PAQR3 n'est pas perturbée par Wnt5a.....	113
Figure 60 : L'expression de SREBP2 n'est pas modifiée par la surexpression de Wnt5a	113
Figure 61 : L'expression du LDLR n'est pas modifiée par la surexpression de Wnt5a	113
Figure 62 : La quantité de cholestérol dans le WAT des souris transgéniques est diminuée	113
Figure 63 : Le métabolisme des triglycérides n'est pas affecté par Wnt5a	113
La signalisation LRP1 indépendante de Wnt5a dans le métabolisme du cholestérol : effets opposées des motifs NPXY de LRP1	118
Figure 64 : Hypothèse mécanistique de l'effet de la signalisation LRP1/Wnt5a sur le métabolisme du cholestérol	121
Figure 65 : Le traitement des souris sm22LRP1- par le LiCl n'atténue pas l'étendue des lésions athéromateuses	124
Figure 66 : Évaluation de la concentration de la protéine Wnt5a recombinante purifiée.....	125
Figure 67 : La protéine Wnt5a recombinante purifiée active la signalisation Erk <i>in vitro</i>	125
Figure 68 : L'injection de protéine Wnt5a purifiée n'atténue pas l'étendue des lésions athéromateuses chez les souris sm22LRP1-	126

Figure 69 : L'invalidation de Wnt5a dans les CMLv entraine une augmentation de la létalité chez les souris	128
Figure 70 : L'expression de la Cre n'impacte pas la viabilité des souris	128
Figure 71 : Le fond génétique LDLR ^{-/-} n'a pas d'impact sur la viabilité des souris	128
Figure 72 : L'invalidation de Wnt5a dans les CML n'entraine pas de mort <i>in utero</i>	129
Figure 73 : L'invalidation de Wnt5a provoque la mort peu de temps après la naissance	129
Figure 74 : Histologie des aortes des souris sm22Wnt5a-	130
Figure 75 : L'invalidation de Wnt5a dans les CMLv augmente l'athérosclérose	131
Figure 76 : Représentation schématique de la voie de signalisation TGFβ/LRP1/Wnt5a	137
Figure 77 : Hypothèse de mécanisme d'activation de l'expression de ABCG1 par Wnt5a	138
Figure 78 : La morphologie des CMLv est altérée chez les souris sm22Wnt5a-	147
 Tableau 1 : Les anticorps	 80
 Article : « Convergent signaling pathways controlled by LRP1 cytoplasmic and extracellular domains limit cellular cholesterol accumulation ». 2016, <i>Journal of Biological Chemistry</i>	 115

Sommaire

Remerciements	3
Résumé	5
Abstract.....	6
Liste des communications.....	7
Avant-propos	9
Liste des abréviations	10
Table des illustrations.....	14
Sommaire	18
<i>Introduction bibliographique.....</i>	<i>24</i>
I. L'athérosclérose.....	25
I.1 Généralités	25
I.1.1 Définition	25
I.1.2 Épidémiologie	25
I.1.3 Facteurs de risque.....	25
I.2 Physiopathologie de l'athérosclérose	26
I.2.1 Structure et physiologie d'une artère saine	26
I.2.1.1 L'intima	27
I.2.1.2 La média	28
I.2.1.3 L'adventice.....	28
I.2.2 Les grandes étapes de l'athérogénèse.....	28
I.2.2.1 Initiation de la plaque	29
I.2.2.2 Progression de la plaque.....	30
I.2.2.3 Complication de la plaque	33
I.2.3 Le traitement de l'athérosclérose	34
II. Le cholestérol.....	36
II.1 Généralités.....	36
II.2 Rôle physiologique	36
II.2.1 Composition de la membrane plasmique	36
II.2.2 Précurseur de molécules	36
II.3 Origines du cholestérol.....	37
II.3.1 Synthèse endogène : Voie du mévalonate.....	37

II.3.2 Apport exogène.....	37
II.4 Le transport du cholestérol : les lipoprotéines et leur métabolisme.....	38
II.4.1 Les chylomicrons.....	38
II.4.2 Les VLDL.....	39
II.4.3 Les IDL.....	40
II.4.4 Les LDL.....	40
II.4.5 Les HDL.....	40
II.4.6 Les apolipoprotéines.....	41
II.5 La régulation de l'homéostasie du cholestérol.....	42
II.5.1 Régulation de la synthèse du cholestérol.....	42
II.5.1.1 Le contrôle transcriptionnel de l'HMGCoA-Reductase.....	42
II.5.1.2 Le contrôle post-transcriptionnel de l'HMGCoA-Reductase.....	43
II.5.1.3 Le contrôle de l'expression et de la stabilisation de Insig1.....	44
II.5.1.4 Le contrôle de l'expression et la stabilisation de Scap.....	44
II.5.1.5 Régulation de l'expression de SREBP2.....	45
II.5.2 Régulation de la captation du cholestérol : le récepteur aux LDL.....	46
II.5.2.1 Régulation de l'expression du LDLR.....	46
II.5.2.2 Régulation post-traductionnelle du LDLR.....	47
II.5.2.3 Rôle du LDLR dans l'athérosclérose.....	47
II.5.3 Régulation de l'efflux du cholestérol : ABCA1 et ABCG1.....	48
II.5.3.1 Fonction des transporteurs ABCA1 et ABCG1.....	48
II.5.3.2 Régulation transcriptionnelle.....	49
II.5.3.3 Régulation post-transcriptionnelle.....	50
II.5.3.4 Rôle dans l'athérosclérose.....	53
II.5.4 L'estérification et l'hydrolyse du cholestérol.....	55
II.5.4.1 L'estérification du cholestérol intracellulaire.....	55
II.5.4.2 L'hydrolyse des esters de cholestérol.....	56
II.5.5 L'élimination du cholestérol.....	57
III. Rôles de LRP1 dans l'athérosclérose.....	58
III.1 Généralités sur LRP1.....	58
III.1.1 Structure.....	58
III.1.2 Régulation transcriptionnelle.....	59
III.1.3 Régulation post-transcriptionnelle.....	59
III.2 Rôles physiologiques de LRP1.....	60
III.2.1 LRP1, récepteur à endocytose.....	60
III.2.2 LRP1, modulateur de voies de signalisation cellulaire.....	61
III.3 LRP1 dans l'athérosclérose.....	62
III.3.1 Le LRP1 hépatique : un rôle athéroprotecteur indirect.....	62
III.3.2 LRP1 dans les macrophages.....	63
III.3.3 LRP1 dans les CMLv.....	63

III.3.3.1 LRP1 contrôle la prolifération et la migration des CMLv	63
III.3.3.2 LRP1 limite l'accumulation de cholestérol dans les CMLv.....	65
IV. La protéine Wnt5a.....	68
IV.1 Généralités sur les Wnt	68
IV.1.1 La voie canonique	69
IV.1.2 Les voies non canoniques.....	69
IV.2 La signalisation Wnt dans le métabolisme des lipides	70
IV.3 Wnt5a.....	71
IV.3.1 Généralités.....	71
IV.3.2 La signalisation Wnt5a et l'athérosclérose	72
IV.3.2.1 Les cellules endothéliales	72
IV.3.2.2 Les macrophages	72
IV.3.2.3 Les cellules musculaires lisses.....	73
Projet de thèse.....	75
Matériels et Méthodes	78
I. Procédures standards.....	79
I.1 Analyse des niveaux de protéines par western blot.....	79
I.1.1 Extraction et dosage des protéines	79
I.1.1.1 Extraction des protéines totales	79
I.1.1.2 Fractionnement cellulaire	79
I.1.1.3 Extraction des protéines du tissu adipeux.....	80
I.1.1.4 Préparation des échantillons	80
I.1.2 Séparation des protéines par électrophorèse et western blot	80
I.2. Analyses des niveaux d'ARNm	81
I.2.1 Extraction d'ARN totaux	81
I.2.2 Reverse transcription.....	81
I.2.3 PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR).....	81
I.3 Transfection de plasmide	82
II. Expérimentations <i>in vitro</i> : les modèles cellulaires	82
II.1 Fibroblastes embryonnaires de souris.....	83
II.1.1 Conditions de culture	83
II.1.2 Différenciation adipocytaire	83
II.1.3 Coloration à l'huile rouge	83
II.1.4 Traitement au TGFβ1.....	84
II.1.5 Mesure d'efflux du cholestérol	84
II.1.6 Mesure de la stabilité des ARNm	84
II.1.7 Mesure de l'activité de la luciférase.....	84

II.1.8 Mesure de la stabilité de Insig1	85
II.2 LMTK.....	85
II.2.1 Conditions de culture	85
II.2.2 Préparation du milieu conditionné	85
II.2.3 Purification de Wnt5a	86
II.3 Human Embryonic Kidney cells.....	87
II.3.1 Conditions de culture	87
II.3.2 Analyse de l'effet de Wnt5a sur la translocation de SREBP2.....	87
II.3.2.1 Traitement des HEK-SREBP2 par le milieu conditionné LMTK	87
II.3.2.2 Transfection transitoire de Wnt5a	87
II.3.2.3 Transfection transitoire de Wnt5a et traitement aux stérols	88
III. Clonages et plasmides	88
III.1 pTK-SREBP2-HSV	88
III.2 pCMV-Insig1-cMyc	89
IV. Expérimentations <i>in vivo</i> : les modèles murins	89
IV.1 Les souris transgéniques aTgWnt5a.....	90
IV.1.1 Génération de la lignée.....	90
IV.1.2 Purification des adipocytes des souris aTgWnt5a	90
IV.1.3 Dosage des lipides du tissu adipeux blanc.....	91
IV.1.4 Colorations histologiques	91
IV.1.5 Induction des macrophages péritonéaux.....	91
IV.2 Les souris sm22Wnt5a-.....	92
IV.2.1 Génération de la lignée.....	92
IV.2.2 Régime athérogène	92
IV.2.3 Dissection et coloration des aortes	92
IV.2.4 Dissection des embryons	93
IV.3 Souris sm22LRP1-	93
IV.3.1 Génération de la lignée.....	93
IV.3.2 Traitement au chlorure de lithium	93
IV.3.3 Injection de Wnt5a purifiée	93
Résultats // Partie I.....	94
Caractérisation de la voie de signalisation LRP1/Wnt5a mise en jeu dans la régulation du métabolisme du cholestérol.	95
I. La régulation de l'expression de Wnt5a par LRP1	95
II. La régulation du métabolisme du cholestérol par Wnt5a <i>in vitro</i>	97
II.1 La régulation de l'efflux de cholestérol par Wnt5a.....	97
II.1.1 Wnt5a stimule l'efflux de cholestérol	97
II.1.2 Wnt5a stimule l'expression de ABCG1	98

II.1.3 L'augmentation de ABCG1 est indépendante des LXR.....	99
II.1.4 Wnt5a ne stabilise pas l'ARNm de ABCG1	100
II.1.5 Wnt5a stimule la transcription de ABCG1.....	100
II.2 La régulation de la synthèse de cholestérol par Wnt5a	102
II.2.1 Wnt5a inhibe l'expression de l'HMGCoA-Reductase	102
II.2.2 Wnt5a inhibe la translocation de SREBP2.....	102
II.2.2.1 Les étapes du clonage de SREBP2.....	103
II.2.2.2 Analyse de la translocation de SREBP2 dans les HEK293	106
II.2.3 Wnt5a stabilise la protéine Insig1	107
III. La régulation du métabolisme du cholestérol par Wnt5a <i>in vivo</i>	108
III.1 Validation du modèle.....	109
III.2 Caractérisation du phénotype structurel	109
III.3 Caractérisation du phénotype moléculaire.....	110
III.3.1 Wnt5a augmente l'expression de ABCG1	110
III.3.2 Wnt5a inhibe l'expression de l'HMGCoA Reductase	112
III.3.3 Wnt5a diminue la quantité totale de cholestérol dans le WAT.....	113
Article.....	115
Conclusion // Partie I.....	120
Résultats // Partie II.....	122
Confirmation du rôle de Wnt5a dans la protection contre l'athérosclérose	123
I. Traitement des sm22LRP1- avec du LiCl.....	123
II. Injection de Wnt5a purifiée chez les souris sm22LRP1-.....	124
II.1 Contrôle de l'activité de la Wnt5a purifiée.....	125
II.2 Injection de Wnt5a purifiée chez les souris sm22LRP1-	125
III. Invalidation de Wnt5a dans les CMLv des souris LDLR-/-	127
III.1 L'invalidation de Wnt5a affecte la viabilité des souris.....	128
III.1.1 Répartition non mendélienne des souris sm22Wnt5a-.....	128
III.1.2 Wnt5a n'affecte pas le développement embryonnaire	129
III.1.3 La mort des souris est périnatale.....	129
III.2 Analyses des aortes des souris sous régime standard	130
III.3 Analyse des aortes des souris sous régime Paigen.....	131
Conclusion // Partie II.....	132
Discussion et Perspectives.....	134
Contexte bibliographique	135
Résumé des résultats obtenus	136
Discussion des résultats, perspectives à court terme	137

I. La signalisation TGF β 1/LRP1/Wnt5a et l'efflux de cholestérol.....	137
II. Wnt5a et l'inhibition de la synthèse de cholestérol	141
III. Wnt5a dans la protection contre l'athérosclérose	145
Perspectives à long terme	149
Pour conclure	151

<i>Références bibliographiques.....</i>	<i>152</i>

Introduction bibliographique

I. L'athérosclérose

I.1 Généralités

I.1.1 Définition

Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé, l'athérosclérose est une « association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la media » (www.who.int/fr). Ces remaniements conduisent à la formation de plaques composées de dépôts lipidiques et protéiques, stabilisées par une chape fibreuse, au niveau de la paroi artérielle. C'est une pathologie vasculaire chronique à évolution lente à l'origine d'événements ischémiques aigus, tels que l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral, et de l'insuffisance cardiaque (Molisse et al., 2007; Spence, 1989).

I.1.2 Épidémiologie

En 2012, les maladies cardio-vasculaires ont fait près de 17,5 millions de morts dans le monde, soit 30% des décès totaux (Rapport de l'OMS sur les maladies non transmissibles 2014). Parmi ces décès, 7,4 millions sont dus à une cardiopathie ischémique et 6,7 millions à un accident vasculaire cérébral. L'OMS estime que d'ici 2030, plus de 23 millions de personnes dans le monde mourront chaque année de pathologies cardiovasculaires. L'athérosclérose et ses complications cliniques sont la 1^{ère} cause de mortalité au niveau mondial et en France, c'est la 2^{ème} cause de mortalité après le cancer, avec 150000 morts par an, soit 28% des décès. En termes de santé publique, la maladie et ses complications représentent un coût important et de nombreuses équipes de recherche scientifique travaillent à en comprendre les mécanismes afin de développer de nouveaux traitements.

Contrairement aux idées reçues, les maladies cardiovasculaires ne touchent pas uniquement les pays développés. En effet plus de 75% des décès qui leur sont imputés ont lieu dans les pays à revenus faibles ou intermédiaires, faute notamment d'un accès aux soins et aux programmes de prévention et de détection précoce.

I.1.3 Facteurs de risque

Une mauvaise hygiène de vie, notamment le tabagisme (Siasos et al., 2014), une alimentation trop riche en graisses et la sédentarité (Nahrendorf and Swirski, 2015), sont des

facteurs associés à l'apparition de l'athérosclérose. Ce mode de vie favorise le développement de pathologies telles que l'hypertension artérielle, le diabète de type II, l'hypercholestérolémie ou encore l'obésité (Lusis, 2000) qui offrent un terrain favorable à la formation des plaques et donc au développement de l'athérosclérose. Si notre mode de vie moderne est souvent accusé d'être responsable de l'athérosclérose, une étude récente réalisée sur des momies millénaires qui montre qu'une majorité d'entre elles présentait des signes d'athérosclérose (Thompson et al., 2014), fait relativiser cette théorie et ajoute le vieillissement du corps humain comme un facteur de risque important. D'autres facteurs de risque non modifiables tels que le sexe (prédominance masculine) et les prédispositions génétiques (antécédents familiaux) sont responsables de l'apparition de la maladie (Calling et al., 2013; Kovacic and Bakran, 2012). Plus un individu cumule de facteurs de risque, plus il est exposé au développement de la maladie (Yuan et al., 2014). Il est à retenir que depuis plusieurs décennies, l'hypercholestérolémie, d'origine héréditaire ou liée au mode de vie, et plus particulièrement un taux élevé de lipoprotéines de faible densité (LDL, *Low Density Lipoprotein*) circulant, est reconnue comme le facteur de risque principal de développement de l'athérosclérose (Castelli WP et al., 1986; Klag et al., 1993; Steinberg, 1987).

I.2 Physiopathologie de l'athérosclérose

L'initiation de la formation des lésions athéromateuses se fait au niveau d'un endothélium artériel anatomiquement présent mais dont les fonctions sont altérées puisqu'il autorise l'infiltration localisée de lipides et de cellules monocytaires (Davignon and Ganz, 2004). Ces infiltrations dans l'espace sous-endothélial entraînent ensuite une désorganisation au niveau des cellules de la média artérielle. Les lésions touchent les artères de gros et moyen calibre ayant un diamètre compris entre 3 et 0.5 cm. Les descriptions de la structure d'une artère saine et des rôles physiologiques endossés par les différents types cellulaires qui la composent permettront de mieux appréhender les événements de la phase initiale du développement de la pathologie.

1.2.1 Structure et physiologie d'une artère saine

La paroi artérielle est composée de 3 tuniques agencées en couches concentriques dont la structure et la composition cellulaire varient selon le type de vaisseaux, à prédominance élastique (aorte et ses ramifications, carotides...) ou à prédominance musculaire (artères coronaires, artères cérébrales...) (Glagov et al., 1992). De la lumière vers l'extérieur on

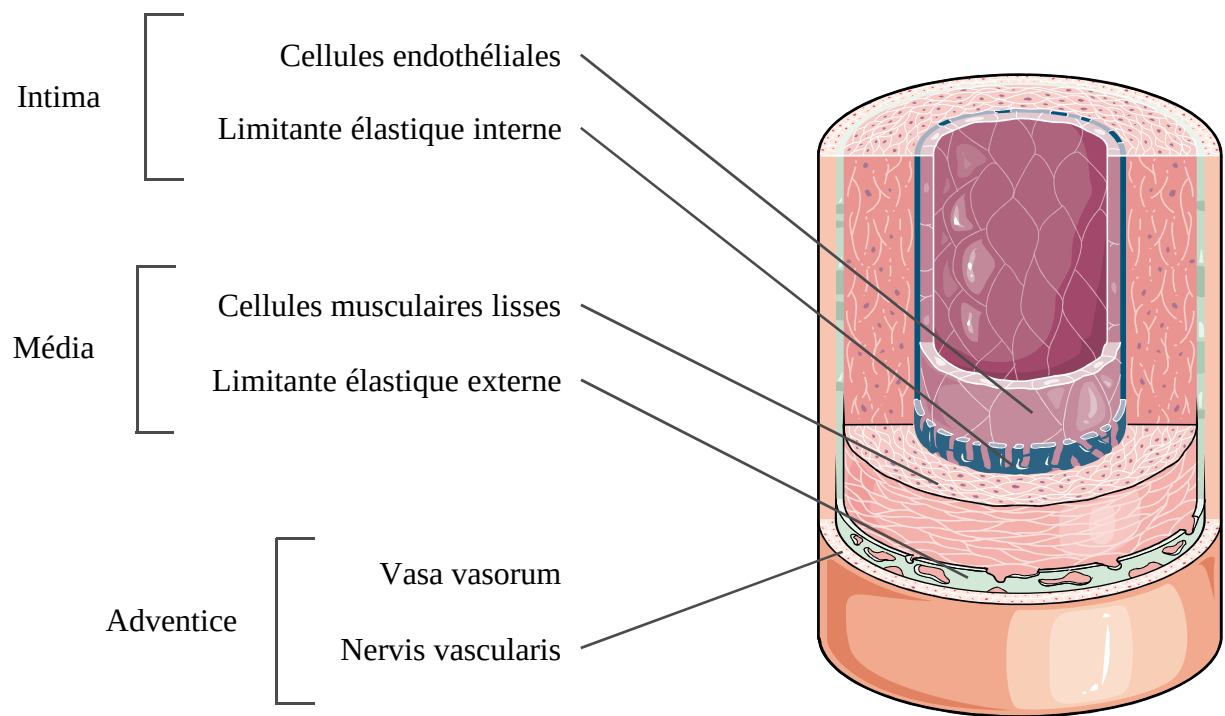


Figure 1 : Structure d'une artère. Les artères sont organisées en 3 tuniques séparées par des limitantes élastiques:

- l'intima, composée d'une monocouche de cellules endothéliales
- la média, composée de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv)
- l'adventice, tissu conjonctif de soutien

retrouve l'intima, la média et l'adventice, chacune séparée de l'autre par une limitante élastique (figure 1).

1.2.1.1 L'intima

L'intima est constituée d'une unique couche continue de cellules endothéliales en contact avec le sang circulant. Ces cellules sont orientées dans le sens des forces de cisaillement exercées par le sang et sont reliées entre elles par des jonctions communicantes et des jonctions serrées (Bazzoni, 2006). Elles reposent sur une membrane basale composée de fibres de collagène, activatrices des plaquettes et de la coagulation, de quelques fibres élastiques et de fibroblastes qui produisent les protéines de la matrice extracellulaire (Paulsson, 1992). C'est dans cette zone que se développent les plaques d'athérosclérose (Tabas et al., 2007). La limitante élastique interne qui sépare l'intima de la média n'est bien individualisée que dans les artères musculaires et disparaît dans les capillaires.

Les cellules endothéliales de l'intima ne forment pas qu'une barrière mécanique dans la physiologie artérielle, elles assurent aussi un rôle primordial dans la régulation du tonus vasculaire (Lüscher and Barton, 1997). En effet, selon les stimuli (forces de cisaillement, hormones, neurotransmetteurs...) qu'elles reçoivent, les cellules endothéliales synthétisent et transmettent aux cellules musculaires lisses vasculaires (CMLv) de la média des médiateurs vasodilatateurs ou vasoconstricteurs (Deanfield et al., 2007; Lüscher and Barton, 1997). Par ailleurs, l'endothélium produit des facteurs qui maintiennent ces cellules musculaires lisses dans un état non prolifératif (Scott-Burden and Vanhoutte, 1994). Par exemple, l'oxyde nitrique (NO), produit par l'enzyme eNOS (*endothelial NO synthase*), en plus d'être un des principaux facteurs vasodilatateurs, inhibe de la prolifération des CMLv (Tousoulis et al., 2012).

L'endothélium vasculaire est également capital dans l'hémostase. Il participe à maintenir le sang à l'état fluide en le séparant des facteurs coagulants sous-jacents. Le NO contribue à cela en inhibant l'activation plaquettaire (Russo et al., 2002). Le glycocalyx qui recouvre les cellules endothéliales assure aussi ce rôle antithrombotique (Alphonsus and Rodseth, 2014; Reitsma et al., 2007). Les cellules endothéliales participent à l'hémostase primaire en synthétisant des facteurs de coagulation libérés en cas de dommages sur les vaisseaux, comme par exemple le facteur von Willebrand et la P-selectin, qu'elles stockent dans des corps de Weibel-Palade (Merten and Thiagarajan, 2004; Turitto et al., 1985). Les facteurs fibrinolytiques t-PA (*tissue-type plasminogen activator*) et u-PA (*urokinase-type*

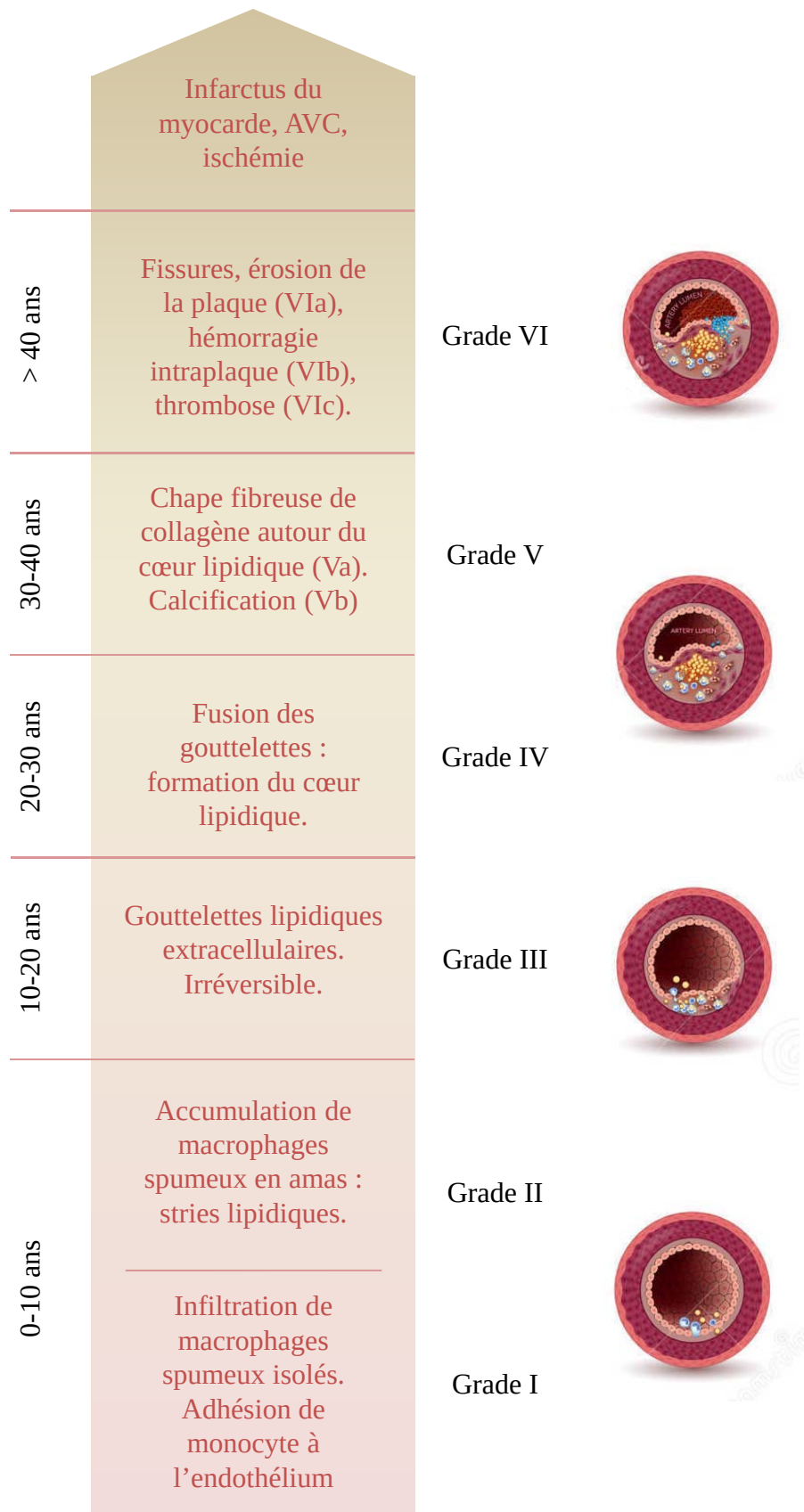


Figure 2 : Chronologie des stades évolutifs des lésions athéromateuses. L'initiation de l'athérosclérose débute dès la naissance et la maladie progresse jusqu'à atteindre un stade compliqué autour de 40 ans (d'après Sary, 1994, 1995).

plasminogen activator) et leur inhibiteur le PAI-1 (*type-1 plasminogen activator inhibitor*) sont également sécrétés par les cellules endothéliales (Fukao and Matsuo, 2000).

1.2.1.2 La média

La média est la couche la plus épaisse de la paroi artérielle. Elle est essentiellement composée de cellules musculaires lisses vasculaires disposées en couches concentriques et délimitées par des lames élastiques, le tout formant des unités lamellaires. Le nombre d'unités lamellaires varie selon le type et l'épaisseur de l'artère (Wolinsky and Glagov, 1969). Ces unités lamellaires sont prises dans une matrice extracellulaire riche en collagène et en élastine. Les CMLv de la média, par leur phénotype contractile, confèrent à l'artère son tonus vasculaire et assurent la vasoconstriction ou la vasodilatation en fonction des médiateurs envoyés par les cellules endothéliales et l'adventice. Les apports en oxygène et en nutriments de l'intima et des deux tiers internes de la média sont assurés par la diffusion directe des éléments circulants du sang, le reste de la média étant approvisionné par l'adventice.

1.2.1.3 L'adventice

L'adventice est la partie qui ancre le vaisseau dans le tissu environnant. C'est un tissu conjonctif lâche composé de fibres de collagène, de fibres élastiques et de fibroblastes qui sert de support à l'innervation et aux vasa vasorum qui irriguent les parties les plus externes de la média (Heistad et al., 1981). Cette tunique est également impliquée dans la modulation du tonus vasculaire, les fibroblastes qui la composent produisant du NO et des anions superoxydes (Wang et al., 2010).

1.2.2 Les grandes étapes de l'athérogénèse

Les études anatomopathologiques des lésions athéromateuses ont mis en évidence le caractère évolutif de leur organisation et de leur composition, ce qui a permis d'établir une classification en 6 grades : les lésions initiales (grade I), les stries lipidiques (grade II), les lésions pré-athéromateuses (grade III), les lésions athéromateuses (grade IV), les lésions fibro-athéromateuses (grade V) et enfin les lésions dites compliquées (grade VI) (Stary et al., 1994, 1995). Aux 3 premiers grades, les lésions restent silencieuses, seules les lésions de grades IV, V et VI entraînent des signes cliniques. La figure 2 présente la chronologie du développement des lésions et décrit brièvement les caractéristiques de chaque grade.

Les mécanismes de formation de la plaque sont complexes et peuvent être divisés en 3 phases : une phase d'initiation, une phase de progression et enfin une phase de complication.

1.2.2.1 Initiation de la plaque

La première condition au développement de l'athérosclérose est l'altération localisée de la fonction de l'endothélium vasculaire, ou dysfonction endothéliale. Les plaques d'athérosclérose se développent préférentiellement au niveau des bifurcations artérielles (Caro et al., 1969; Zarins et al., 1983) car ce sont les zones les plus susceptibles de présenter des dysfonctions de l'endothélium (Davignon and Ganz, 2004). Dans les tronçons rectilignes, l'écoulement du sang est laminaire et l'endothélium est soumis en permanence aux forces de cisaillement exercées par le sang circulant, ce qui maintient l'endothélium dans un état anti-inflammatoire, antithrombique et antioxydant (Fukao and Matsuo, 2000; Sagripanti and Carpi, 2000). En revanche, dans les zones de bifurcations ou de courbures, l'écoulement sanguin est turbulent, la vitesse du flux est ralentie ce qui perturbe le profil d'expression de certains gènes de l'endothélium (Gimbrone et al., 2000; Topper and Gimbrone, 1999; Wentzel et al., 2012) entraînant une dysfonction endothéliale qui se caractérise par :

- l'augmentation de la perméabilité endothéliale, favorisant notamment l'infiltration des lipoprotéines LDL (Gimbrone et al., 2000) qui créent des liaisons entre leurs apolipoprotéines et les protéoglycanes de la matrice extracellulaire et se retrouvent piégées dans l'espace sous-endothélial (Hurt-Camejo et al., 1997; Skålen et al., 2002; Tabas et al., 2007).
- la diminution de la sécrétion des substances vasodilatatrices telles que le NO et de la sensibilité des CMLv à ces substances. Ceci entraîne une vasoconstriction, une augmentation de la prolifération des CMLv et l'induction d'un stress oxydatif qui altère les fonctions de l'endothélium et favorise l'oxydation des LDL par les radicaux libres de l'oxygène (Cai and Harrison, 2000; Russo et al., 2002; Steinberg and Witztum, 2010; Steinbrecher, 1988).
- l'activation d'une réaction inflammatoire. Les LDL oxydés favorisent l'augmentation de l'expression de protéines d'adhésion telles que ICAM-1 (*Inter Cellular Adhesion Molecule*), VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule*), p-selectin et de composés chimio-attracteurs tels que MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) qui permettent l'adhésion et l'infiltration de monocytes sous l'endothélium (Gerhardt and Ley, 2015; Huo and Ley, 2001; Mestas and Ley, 2008; Shyy et al., 1994; Takei et al., 2001).

Une fois dans l'espace sous-endothélial, les monocytes se différencient en macrophages sous l'effet du M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factor*) sécrété par les cellules endothéliales et les CMLv. La délétion de M-CSF dans des souris ApoE^{-/-} (modèle

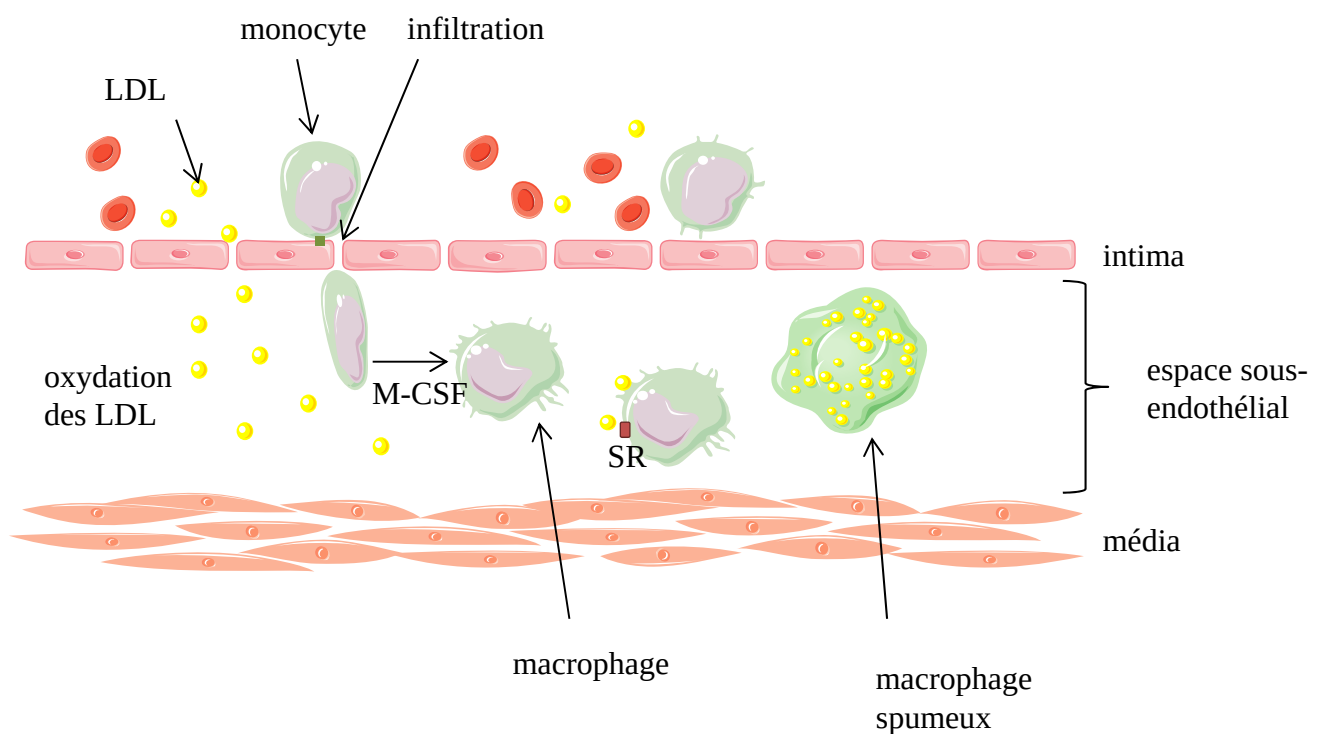


Figure 3 : Initiation de la plaque. L'endothélium dysfonctionnel autorise l'infiltration de LDL dans l'espace sous-endothélial où elles sont oxydées. L'inflammation qui en découle entraîne l'adhésion et l'infiltration de monocytes qui se différencient en macrophages sous l'effet du M-CSF. Les macrophages captent les LDL oxydées par l'intermédiaires des récepteurs scavengers (SR) et se transforment en cellules spumeuses (d'après Gerhardt et Ley, 2015).

d'étude de l'athérosclérose, décrit en II.4.6) protège les animaux contre l'athérosclérose, révélant le rôle capital de la transition monocyte/macrophage dans le développement de lésions (Smith et al., 1995).

Les macrophages expriment à leur surface des récepteurs « scavenger », notamment SR-A, CD36 et LOX1 qui vont leur permettre de prendre en charge les LDL oxydés et de les absorber (Collot-Teixeira et al., 2007; Kunjathoor et al., 2002; Park, 2014). Le cholestérol s'accumule alors au niveau de gouttelettes cytoplasmiques, transformant les macrophages en cellules spumeuses (figure 3). Ces macrophages spumeux forment les stries lipidiques caractéristiques des lésions de type I et II qui s'installent au cours des 10 premières années de vie chez l'Homme.

I.2.2.2 Progression de la plaque

O Formation du cœur lipidique

L'infiltration lipidique qui se déroule durant la phase initiale du développement de l'athérosclérose installe un cercle vicieux entretenu par les macrophages spumeux. Ceux-ci produisent des cytokines pro-inflammatoires, perturbent l'activité des cellules endothéliales et augmentent ainsi la perméabilité aux LDL. En conséquence, l'afflux sous-endothélial de LDL favorise l'infiltration de monocytes et leur transformation en macrophages spumeux (Hulsmans and Holvoet, 2010). Lorsque la capacité épuratrice des cellules est dépassée, elles entrent en apoptose ou en nécrose et les gouttelettes lipidiques qu'elles contiennent sont libérées dans l'espace extracellulaire. Ce processus est irréversible et conduit aux lésions de type III. Avec le temps, le phénomène s'accroît et donne naissance au cœur lipidique, appelé aussi cœur nécrotique. Il est acellulaire et caractéristique des lésions de type IV. De nombreuses études confirment le rôle de l'apoptose des macrophages spumeux dans la formation du cœur lipidique (Ball et al., 1995; Hegyi et al., 1996; Tabas, 2005). Il est composé d'esters de cholestérol et de débris apoptotiques issus des cellules spumeuses, mais des analyses ont révélé également une forte présence de cholestérol libre (Bentzon et al., 2014; Guyton and Klemp, 1989). Il proviendrait d'une infiltration directe de LDL agrégés dans l'espace sous endothélial (Guyton and Klemp, 1996). Cette accumulation de cholestérol libre favorise l'apoptose des macrophages (Hardwick et al., 1996; Salvayre et al., 2002), stimulant la progression de la taille du cœur nécrotique. Les lésions contiennent également des cristaux de cholestérol, facteur favorisant la rupture des plaques (Abela, 2010; Abela et al., 2009).

o Migration et prolifération des cellules musculaires lisses

Plus la lésion progresse, plus l'on retrouve de cellules musculaires lisses en son sein. Si l'origine exacte de ces cellules a parfois été débattue, la communauté scientifique s'est accordée sur l'hypothèse de la migration et de la prolifération de CMLv provenant de la média (Ross and Glomset, 1973). Cette théorie est appuyée par la présence de plusieurs éléments favorisant la migration et la prolifération cellulaire :

- le dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire qui n'assure plus son rôle d'inhibiteur de la prolifération des CMLv (Davignon and Ganz, 2004).
- la production de facteurs de croissance, dont le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*) et le TGF β (*Transforming Growth Factor*) par les plaquettes, les macrophages activés et les CMLv elles-mêmes (Malden et al., 1991; Stiko-Rahm et al., 1992). Le CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) est un facteur de croissance retrouvé dans les CMLv des lésions mais pas dans celles des vaisseaux sains et il active leur migration et prolifération (Fan et al., 2000).
- la surexpression des MMP (*Matrix MetalloProteinases*), notamment MMP-2 et MMP-9 (Galis et al., 1994; Li et al., 1996). En dégradant les composants de la matrice extracellulaire, les MMP permettent l'invasion des CMLv. Elles sont produites par les cellules spumeuses, les cellules endothéliales et les CMLv elles-mêmes (Newby, 2006). Preuve de leur implication dans ces phénomènes, leur invalidation chez la souris diminue l'hyperplasie de l'intima (Johnson and Galis, 2004).

Il y a un phénomène de coopération entre ces facteurs qui favorise le développement des lésions. Par exemple, l'activité de MMP-2 est stimulée par l'expression de CTGF dans les CMLv (Fan and Karnovsky, 2002) et par l'HSP90 (*Heat Shock Protein 90*) qui est surexprimée dans les lésions humaines (Kim et al., 2014) et qui stimule également la voie du PDGF.

o Formation de la chape fibreuse

Les doutes quant à la provenance des CMLv des lésions venaient en partie du fait que ces cellules ne présentent pas le même phénotype que les CMLv de la média (Mulvihill et al., 2004). Alors que ces dernières présentent un phénotype « contractile », les CMLv de l'intima ont perdu cette capacité au profit d'un phénotype « sécrétoire » (Gomez and Owens, 2012). L'hypothèse d'une dédifférenciation, migration puis redifférenciation des CML de la média au niveau de l'intima est souvent avancée par les chercheurs.

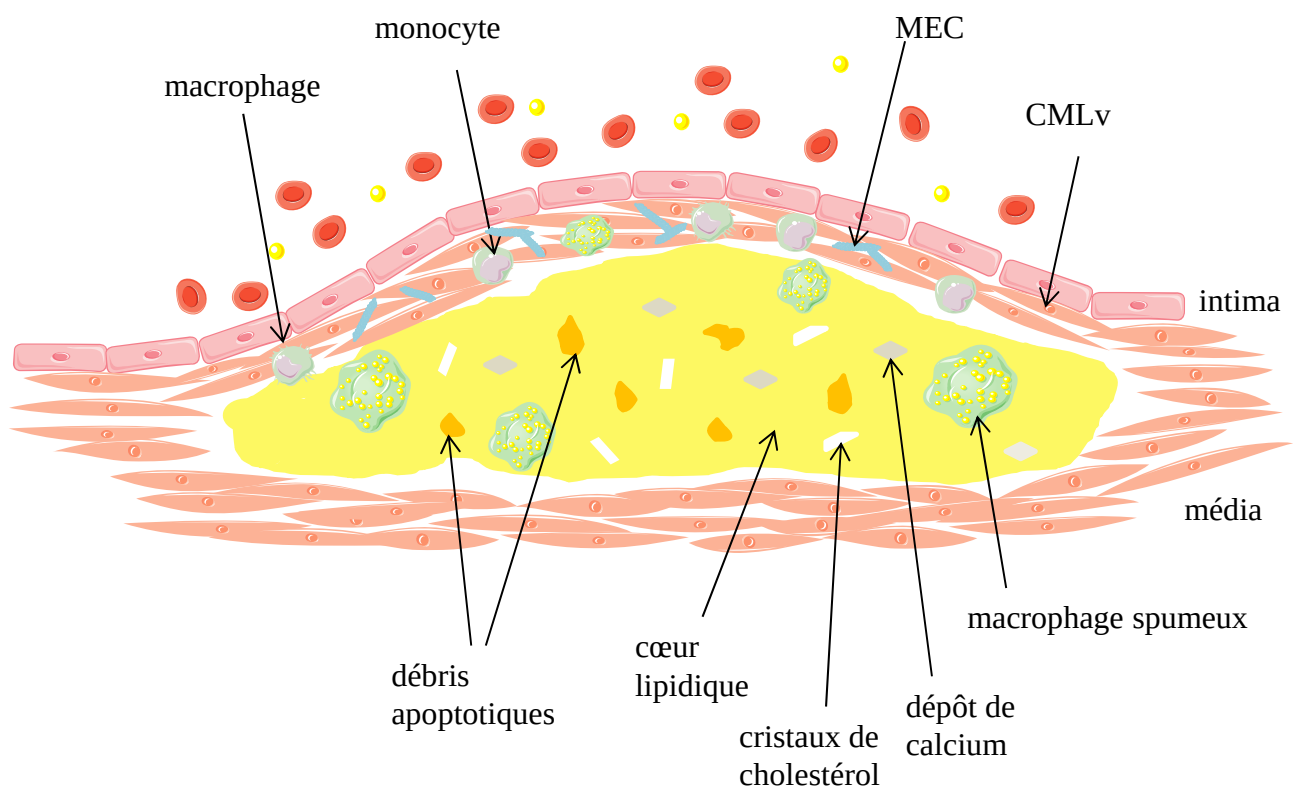


Figure 4 : La chape fibreuse entoure le cœur lipidique. Les cellules musculaires lisses (CMLv) entourent le cœur lipidique et sécrètent une matrice extracellulaire (MEC) qui consolide la chape (Raines et Ross, 1993). Le cœur est composé de cholestérol extracellulaire, de cristaux de cholestérol, de débris apoptotiques et de dépôts de calcium (Bentzon, 2014 ; Abela, 2010, Gyuton et Klemp 1990, 1996).

Les cellules musculaires lisses entourent le cœur lipidique et sécrètent une matrice extracellulaire qui le consolide, c'est la chape fibreuse (Raines and Ross, 1993) (figure 4). Cette chape, composée de collagène de type I et III, de protéoglycanes et d'élastine, est essentielle à la stabilité de la plaque et limite le risque de complications (Bentzon et al., 2014; Finn et al., 2010; Newby and Zaltsman, 1999; Wight, 1989). Elle isole de la circulation sanguine les composants thrombogènes de la lésion. Si cet effet des CMLv sur la plaque est bénéfique, ces cellules ont également un effet délétère. Elles peuvent en effet se surcharger en lipides par l'intermédiaire des récepteurs scavenger qui captent les LDL modifiés et, comme les macrophages, devenir des cellules spumeuses (Allahverdian et al., 2012). Elles participent alors à la progression des lésions en augmentant le volume du cœur lipidique lorsqu'elles entrent en apoptose (Clarke et al., 2006, 2008). Comme les macrophages, elles synthétisent des cytokines (PDGF, TGF β , Interferon γ , MCP-1) qui stimulent leur propre prolifération et l'oxydation des LDL, et des molécules d'adhésion (ICAM et VCAM) qui accélèrent la réponse inflammatoire (Doran et al., 2008). Une étude récente vient contredire ce qui est admis depuis longtemps sur le rôle des macrophages dans l'athérosclérose et suggère que dans les coronaires humaines, les CMLv représenteraient environ 50% des cellules spumeuses au sein des lésions. L'étude propose qu'une grande partie des cellules considérées comme des macrophages dérivés des monocytes seraient en fait dérivées des CMLv (Allahverdian et al., 2014).

o Calcification vasculaire

La calcification vasculaire n'est pas un phénomène propre à l'athérosclérose. Elle est associée au vieillissement et retrouvée dans d'autres pathologies, notamment les insuffisances rénales (Eddington et al., 2009; Oliveira et al., 2013). Dans l'athérosclérose, elle apparaît dans les lésions de type V et elle est considérée comme un facteur aggravant de la mortalité et de la morbidité (Wilson et al., 2001). Elle est caractérisée par des dépôts de carbonate de calcium au niveau de l'intima (Sage et al., 2010). Les dépôts calciques proviennent des CMLv qui perdent leur phénotype, se transdifférencient en cellules de type chondrocyte/ostéocyte et expriment des marqueurs ostéogéniques (OTSUKA et al., 2014; Speer et al., 2009). Des études *in vitro* suggèrent que les débris apoptotiques et la présence de LDL modifiés favorisent la calcification vasculaire (Proudfoot et al., 2000, 2002).

1.2.2.3 Complication de la plaque

Pendant un certain temps, un remodelage vasculaire permet de compenser l'espace pris par la plaque en croissance et de maintenir une lumière artérielle quasi intacte en termes de diamètre (Glagov et al., 1987). Lorsqu'elle dépasse 40% de la surface totale de la paroi, l'élargissement compensatoire ne suffit plus, le développement de la plaque se fait alors au détriment de la lumière et provoque une sténose (Fishbein and Siegel, 1996).

La complication la plus importante est la formation d'un caillot ou thrombus, lorsque les composants du cœur de la plaque se retrouvent en contact avec le sang. Cela se produit lorsque la chape fibreuse est altérée, par rupture ou par érosion et que les plaquettes sont attirées par les éléments coagulants. Il se forme alors un caillot qui empêche la libération du contenu de la plaque dans la circulation (Davies, 2000; Davies et al., 1993; Falk et al., 1995). Le caillot peut rester de petite taille et être progressivement recouvert par l'endothélium jusqu'à être incorporé à la plaque, qui en conséquence s'accroît. Il peut grossir et réduire considérablement la lumière de l'artère jusqu'à la boucher complètement. Le caillot peut également se détacher dans la circulation, ce qui va provoquer une embolie dans un vaisseau de plus petite taille. La gravité des complications cliniques de l'athérosclérose dépend donc plus de la vulnérabilité des plaques que de leur étendue. En effet, plus une plaque est instable, plus les risques de rupture et de thrombose sont élevés (Davies et al., 1993). La stabilité de la plaque d'athérome est fonction de plusieurs paramètres :

- la taille du cœur lipidique : plus elle est importante et moins la plaque est résistante (Gertz and Roberts, 1990; Virmani et al., 2006).
- la composition de la chape fibreuse : composée principalement de cellules musculaires lisses, elle sera plus stable qu'une chape composée majoritairement de cellules immunitaires, dont les cytokines vont stimuler l'activité des MMP et dégrader la matrice extracellulaire (Gough et al., 2006; Shah et al., 1995).
- l'épaisseur de la chape fibreuse : la rupture se produit dans des zones où la chape est très fine (Burke et al., 1997; Falk et al., 1995).

Il semble que l'affinement de la chape fibreuse soit un processus lent, ce qui explique la rareté des accidents cardiaques chez les personnes jeunes. Les causes de la rupture d'une plaque restent mal comprises, même si l'on sait que l'activité physique, un stress brutal ou encore la consommation de cocaïne peuvent déclencher la rupture spontanée d'une plaque vulnérable, à l'origine d'accidents ischémiques aigus (Muller, 1999, 2000; Willich et al., 1993).

1.2.3 Le traitement de l'athérosclérose

Le panel de traitements de l'athérosclérose repose sur une modification du mode de vie visant à diminuer les facteurs de risque et sur des traitements médicamenteux et chirurgicaux. L'arrêt du tabac, la reprise d'une activité physique et une alimentation plus saine constituent la base de la prévention primaire. Ceci est fréquemment complété par l'administration de statines qui favorisent la diminution du taux de cholestérol sanguin. En effet, ces molécules inhibent l'HMGCoA-Reductase, ce qui stimule la translocation de SREBP2. Dans les hépatocytes, on observe alors une augmentation de l'expression du récepteur aux LDL (LDLR), qui augmente la clairance hépatique des LDL circulants dans le sang et fait baisser leur taux. La prise quotidienne de statines permet une baisse du taux de LDL-cholestérol de 10 à 60 % en moyenne selon leur type (Law et al., 2003). Après un premier accident cardiaque, la prévention secondaire implique systématiquement la prescription de statines.

L'efficacité à diminuer le taux de cholestérol et le risque cardiovasculaire est avérée (Brown et al., 1990; Law et al., 2003), cependant, chez certains patients on observe une résistance aux statines même à forte dose (Martin et al., 2013). Par ailleurs, il a été rapporté certains effets secondaires tels que des douleurs musculaires (Sathasivam and Lecky, 2008; Sinzinger et al., 2002), du diabète (Mansi et al., 2015; Sattar et al., 2010), et plus rarement des atteintes hépatiques (Björnsson, 2015; Jose, 2016).

Il a été montré que les statines stimulent l'expression de l'enzyme PCSK9 (*Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*) (Dubuc et al., 2004). Une des fonctions de cette enzyme, dont l'expression est activée par le facteur SREBP2 (Jeong et al., 2008), est de se lier au LDLR des cellules et d'activer la dégradation du récepteur (Lagace, 2014). Ainsi, SREBP2 active d'une part la transcription du gène du LDLR, et d'autre part la transcription l'enzyme qui dégrade ce même récepteur. Si cet effet chez les sujets sains permet un contrôle du taux de LDLR exprimé par les cellules en fonction de la quantité de cholestérol (Browning and Horton, 2010), il apparaît que cette stimulation de PCSK9 par les statines peut contrer l'effet recherché par le traitement, à savoir une l'activation de l'expression du LDLR hépatique. L'activation simultanée de l'expression de PCSK9 vient s'opposer à cet effet en favorisant la dégradation du LDLR hépatique. PCSK9 est alors apparu comme une cible thérapeutique privilégiée pour faire baisser le taux de LDL circulant et des anticorps monoclonaux inhibant cette enzyme ont été développés. Les études cliniques montrent qu'ils sont efficaces pour diminuer le taux de LDL de 40 à 70% (McKenney et al., 2012; Raal et al., 2012; Stein et al.,

2012). Ces molécules, qui peuvent être administrées en complément des statines ou en monothérapie chez les patients intolérants aux statines, ont obtenu récemment une autorisation de mise sur le marché. Leurs effets bénéfiques à long terme sur l'athérosclérose et sur le risque de mortalité vont pouvoir être observés dans les prochaines années.

L'athérosclérose débute lorsque la fonction endothéliale est altérée et permet le passage de LDL dans l'espace sous endothélial. L'état inflammatoire favorise l'oxydation de ces LDL, entraînant l'infiltration de monocytes qui se différencient en macrophages et absorbent les LDL jusqu'à devenir spumeux. Se met alors en place un cercle vicieux où les macrophages spumeux accentuent l'oxydation des LDL qui attirent encore plus de macrophages... À terme, une plaque de lipides, de produits sanguins, de cellules artérielles spumeuses, de débris cellulaires et de matrice extracellulaire se forme dans la paroi. Le phénomène s'amplifie sans conséquences cliniques pendant plusieurs décennies avant de devenir problématique pour la santé des individus lorsque la sténose est trop importante ou que la plaque se rompt.

Si dernièrement la recherche scientifique s'est beaucoup focalisée sur l'aspect inflammatoire de l'athérosclérose (Hartman and Frishman, 2014; Tuttolomondo et al., 2012), de nombreuses interrogations demeurent quant au rôle du cholestérol dans le développement de la maladie. Le chapitre suivant décrit les fonctions physiologiques du cholestérol, la régulation de son métabolisme et l'implication de cette régulation dans l'athérosclérose.

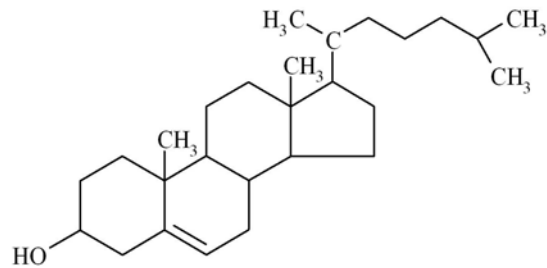


Figure 5 : Structure du cholestérol. Le cholestérol est une molécule rigide et plane qui possède un groupement hydrophile en C₃ et une chaîne hydrophobe en C₁₇.

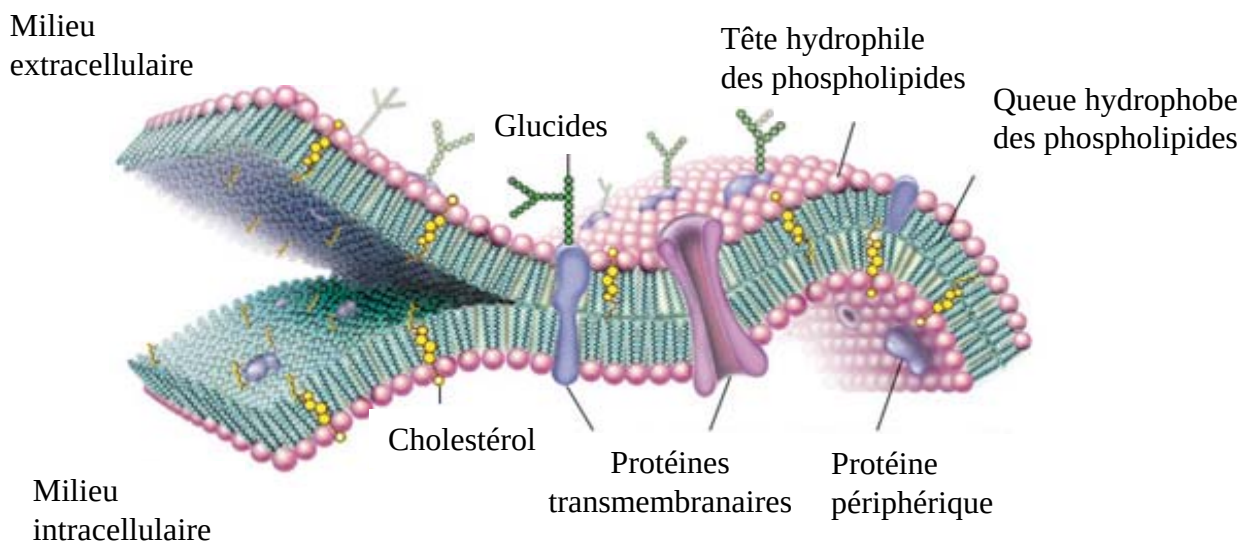


Figure 6 : Représentation de la membrane plasmique. Le cholestérol libre est enchâssé dans la bicouche de phospholipides. Sa structure plane permet de rigidifier localement la membrane et de mettre en place les radeaux lipidiques (source image : Encyclopaedia Britannica).

II. Le cholestérol

II.1 Généralités

Le cholestérol est le lipide de la famille des stérols le plus répandu dans l'organisme. Il est essentiel à l'organisme et entre en jeu dans de nombreux processus physiologiques. Composé d'un noyau tétracyclique stérol, c'est une molécule rigide et plane. Son caractère amphiphile est apporté par la présence d'un groupement hydroxyle substitué sur le carbone 3 et d'une chaîne hydrocarbonée hydrophobe flexible substitué sur le carbone 17 du noyau (figure 5).

II.2 Rôle physiologique

II.2.1 Composition de la membrane plasmique

La membrane plasmique est composée d'une bicouche de phospholipides dans laquelle sont enchâssées des protéines et des lipides, le principal étant le cholestérol (figure 6) (Cooper, 2000). Au sein de la membrane, le cholestérol a un rôle structurel capital. En s'intercalant entre les phospholipides de la bicouche, il rigidifie et stabilise cette structure. La membrane plasmique étant dynamique, l'enrichissement ou l'appauvrissement en cholestérol permet de moduler la fluidité membranaire (Simons and Vaz, 2004). Cela influe sur l'activité de la cellule en autorisant localement la mise en place des cavéoles et des rafts (ou radeaux lipidiques), qui sont des zones d'ancrages plus rigides favorables à l'activité de certaines protéines impliquées notamment dans l'endocytose et dans la signalisation cellulaire (Anderson and Jacobson, 2002; Simons and Ikonen, 1997; Simons and Toomre, 2000; Simons and Vaz, 2004). Par ailleurs, la présence de cholestérol dans la membrane permet de diminuer la perméabilité aux molécules hydrophiles et aux gaz (Róg et al., 2008).

II.2.2 Précurseur de molécules

Outre ce rôle structurel au niveau membranaire, le cholestérol est le précurseur d'un certain nombre de molécule (Berg et al., 2002) :

- les hormones stéroïdes sexuelles (œstrogène, progestérone et testostérone) au niveau des gonades et non sexuelles (cortisol et aldostérone) dans le cortex surrénalien
- des acides biliaires dans le foie
- de la vitamine D3 au niveau de la peau

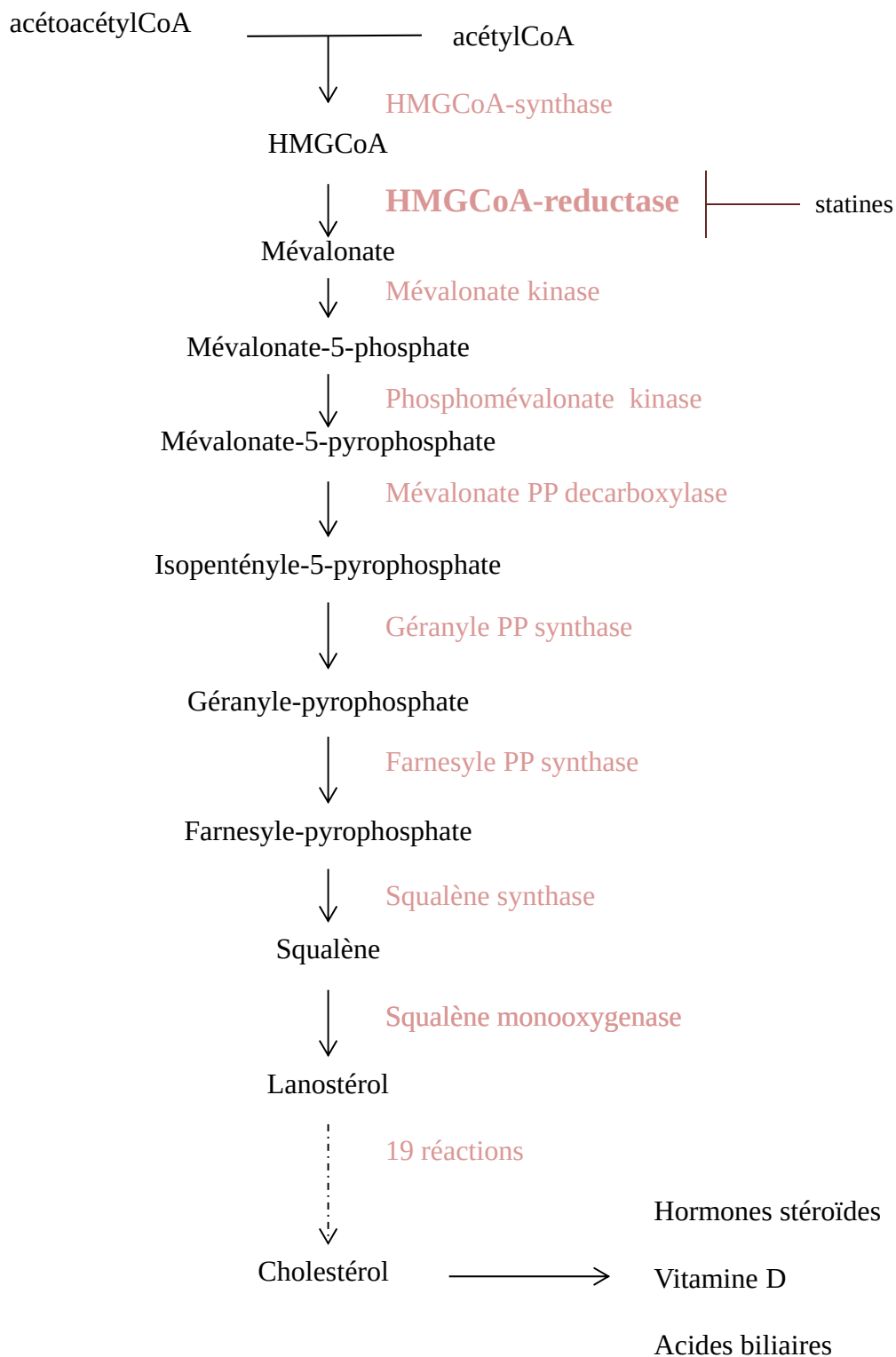


Figure 7 : La voie du mévalonate. Une succession de réactions enzymatiques aboutit à la formation du cholestérol, puis de ces dérivés. L'enzyme limitante de cette voie est l'HMGCoA-Reductase, qui est une cible des statines, molécules utilisées pour diminuer le taux de LDL chez l'Homme. (d'après Brown et Goldstein, 1990).

II.3 Origines du cholestérol

Le cholestérol de l'organisme est apporté soit par l'alimentation, ce qui constitue l'apport exogène, soit par la biosynthèse endogène. Chez l'Homme, le cholestérol alimentaire doit représenter un apport de 300 mg à 500 mg journalier, alors que la biosynthèse fournit entre 600 mg et 900 mg. Dans des conditions physiologiques normales, la balance entre apport alimentaire et la biosynthèse est équilibrée, une augmentation de l'apport entraînant une diminution de la synthèse (Repa and Mangelsdorf, 2000).

II.3.1 Synthèse endogène : Voie du mévalonate

La biosynthèse est réalisée majoritairement par les entérocytes et les hépatocytes, ces derniers produisant à eux seuls la moitié du cholestérol endogène. Elle se fait à partir de l'acétate et implique une succession de réactions enzymatiques. Elle débute par la condensation de 3 AcétylCoA en hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA). L'enzyme limitante de la voie, l'HMG-CoA-Reductase (3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA-Reductase) convertit l'HMG-CoA en mévalonate (Goldstein and Brown, 1990). Le mévalonate subit ensuite une série de condensations qui aboutit à la formation du farnésyl-pyrophosphate. La condensation de deux farnésyl-pyrophosphates par la squalène synthase donne le squalène, qui est ensuite époxydé par la squalène oxydase puis cyclisé par la 2,3-oxydosqualène cyclase en lanostérol. À partir de ce premier intermédiaire cyclique, 19 réactions sont encore nécessaires pour conduire à la formation des dérivés (desmostérol et le 7-dehydrocholestérol), puis finalement du cholestérol (figure 7). Des réactions additionnelles aboutissent à la synthèse des hormones stéroïdes, des acides biliaires et de la vitamine D3.

II.3.2 Apport exogène

Les lipides ingérés au cours d'un repas sont digérés au niveau de l'intestin. Ils sont émulsifiés par les acides biliaires libérés par le foie, ce qui les rend accessibles aux enzymes pancréatiques. La lipase pancréatique hydrolyse les triglycérides en acides gras libres et en monoglycérides, tandis que la cholestérol-estérase digère les esters de cholestérol en cholestérol et en acides gras. Ces produits de digestion enzymatique sont associés aux sels biliaires sous forme de micelles pour pouvoir traverser la paroi des entérocytes de l'intestin grêle (Westergaard and Dietschy, 1976; Woollett et al., 2006). Là, les triglycérides sont reformés à partir des acides gras libres et des monoglycérides et une partie du cholestérol est

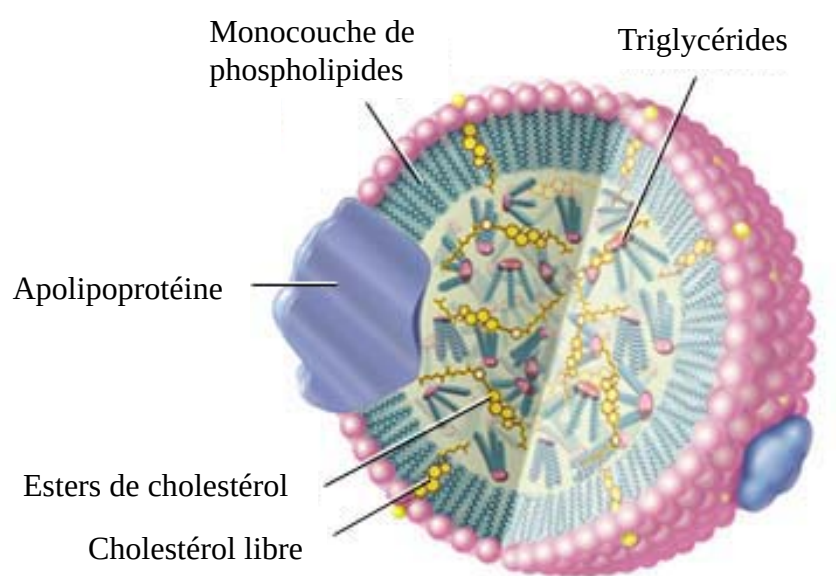


Figure 8 : Structure générale d'une lipoprotéine. La couche externe est formée de phospholipides et de cholestérol libre et maintenue par les apolipoprotéines. Le cœur renferme les triglycérides et le cholestérol estérifié (source image : Encyclopaedia Britannica).

estérifié. Ces lipides sont associés avec l'apolipoprotéine ApoB-48, décrite ci-après) au sein de chylomicrons.

Les références suivantes donnent une revue détaillée de ces mécanismes de digestion des lipides : (Hennessy et al., 2014; Kindel et al., 2010; Phan and Tso, 2001).

II.4 Le transport du cholestérol : les lipoprotéines et leur métabolisme

Le cholestérol, qu'il soit issu de l'alimentation ou de la synthèse par le foie, doit être distribué à tous les tissus de l'organisme. Il est donc transporté dans la circulation depuis les sites de production ou d'absorption jusqu'aux sites d'utilisation ou de stockage. Les lipides (cholestérol estérifié ou non, triglycérides et phospholipides) étant des molécules insolubles dans les milieux aqueux, ils ne peuvent pas circuler dans les liquides biologiques sous forme libre. Leur distribution à l'organisme nécessite la formation de structures macromoléculaires complexes : les lipoprotéines (Havel, 1987).

Les lipoprotéines sont des particules globulaires composées des lipides qu'elles transportent et de protéines spécifiques nommées apolipoprotéines (Apo). Elles présentent une structure générale commune : le cœur de la particule est formé de triglycérides et de cholestérol estérifié, tandis que les phospholipides et le cholestérol libre forment l'enveloppe amphiphile dans laquelle s'insèrent les apolipoprotéines (figure 8). Ces protéines jouent un rôle dans l'assemblage et la stabilisation des lipoprotéines, et permettent leur reconnaissance par les récepteurs spécifiques des cellules et leur interaction avec des enzymes plasmatiques (Mahley et al., 1984).

Selon leurs propriétés physiques (taille et densité) et leur composition lipidique et protéique, elles sont classées en 5 catégories avec, par ordre croissant de densité : les chylomicrons, les VLDL (Very Low Density Lipoprotein), les IDL (Intermediate Density Lipoprotein), les LDL (Low Density Lipoprotein), et les HDL (High Density Lipoprotein) (Gofman et al., 1949; Lewis, 1973).

II.4.1 Les chylomicrons

Le cœur des chylomicrons est composé majoritairement de triglycérides, et de peu d'esters de cholestérol (Wood et al., 1964; Zilversmit, 1965). Ils sont les intermédiaires de la voie entérohépatique qui permet le transport des lipides exogènes de l'intestin vers les tissus (tissu adipeux, muscles striés, muscle cardiaque...) pour qu'ils soient utilisés ou stockés. Les chylomicrons natifs sont formés au niveau du réticulum endoplasmique des entérocytes par

l'assemblage des lipides alimentaires digérés avec l'apolipoprotéine ApoB-48. Cette apolipoprotéine spécifique des chylomicrons est composée de 48% de la séquence de l'ApoB-100 (Nakajima et al., 2014). Les chylomicrons natifs sont d'abord sécrétés dans la circulation lymphatique puis rejoignent la circulation sanguine où ils s'enrichissent au dépend des HDL en ApoE et en ApoC-II et C-III. Les ApoA-I, A-II et A-IV entrent également dans leur composition.

Au niveau de l'endothélium des capillaires des tissus cibles, la LPL (*Lipoprotéine Lipase*) est activée par les ApoC-II et C-III et hydrolyse rapidement les triglycérides (Nestel et al., 1962; Ory, 2007). La perte des triglycérides réduit fortement la taille des chylomicrons, qui se restructurent et se scindent en deux parties : d'une part les chylomicrons remnants contenant des triglycérides, du cholestérol estérifié et des ApoB-48 et E ; d'autre part les HDL naissants (ou discoïdes) contenant des phospholipides et du cholestérol libre et les ApoC et A-I. Les remnants sont rapidement retirés de la circulation au niveau du foie grâce à leurs Apo qui sont reconnues par des récepteurs spécifiques : l'ApoE est reconnue par le récepteur aux LDL et le récepteur LRP1 (*LDL-receptor Related Protein 1*) (Cooper, 1997; Havel, 1995). L'ApoB-48 ne comporte pas les sites de reconnaissance au LDLR, comme c'est le cas pour l'ApoB-100 (Brown et al., 2002b), elle est uniquement reconnue par le récepteur à l'ApoB-48. Chez les sujets sains, les chylomicrons et leurs remnants sont retrouvés dans le plasma uniquement en période postprandiale et ce pendant un temps relativement court.

II.4.2 Les VLDL

Les VLDL sont synthétisés en continu par le foie à partir des triglycérides et du cholestérol endogène, ce qui assure un apport permanent de lipides aux muscles et au tissu adipeux. C'est la voie de transport des lipides endogènes. La synthèse des VLDL est divisée en 2 étapes : d'abord le transfert de lipides à l'ApoB-100 par la protéine MTP (*Microsomal Triglyceride Transfer Protein*) (Hussain et al., 2003) ; puis la fusion des ApoB-100 chargées en lipides avec les gouttelettes de triglycérides, donnant ainsi les VLDL matures (Gibbons et al., 2004; Shelness and Sellers, 2001). Les VLDL contiennent également les ApoC-I et E. Une fois dans la circulation, la CETP (*Cholesteryl Ester Transfer Protein*) portée par les HDL assure un transfert d'esters de cholestérol aux VLDL en échange de triglycérides (Barter et al., 2003; Tall, 1993). Au cours du transport sanguin, elles acquièrent également l'ApoC-II et s'enrichissent en ApoE provenant aussi des HDL. De même que pour les chylomicrons, la LPL présente dans les capillaires des tissus cibles est activée par l'ApoC-II et hydrolyse les triglycérides des VLDL, qui perdent alors les ApoC-I et II. Les VLDL ainsi débarrassées de la

plus grande part de leurs triglycérides et enrichis en esters de cholestérol se restructurent en lipoprotéines plus petites : les IDL.

II.4.3 Les IDL

Elles ont une demi-vie courte et ne sont retrouvées dans le sérum qu'en période postprandiale. Les récepteurs hépatiques reconnaissant les ApoE et ApoB-100 (LDLR et LRP1) assurent l'élimination d'environ la moitié des IDL issues du catabolisme des VLDL. L'autre moitié des IDL poursuivent leur catabolisme dans la circulation. Là, une partie des triglycérides est remplacée par des esters de cholestérol sous l'action de la lipase hépatique (LH) et les Apo C-II et E sont perdues au profit des HDL (Oi et al., 1999; Zambon et al., 2003). Ceci aboutit à la formation des produits finaux du catabolisme des VLDL : les LDL.

II.4.4 Les LDL

Les LDL sont composées majoritairement de cholestérol estérifié et de peu de triglycérides, et contiennent uniquement l'ApoB100. Elles sont captées par les cellules de l'organisme grâce au récepteur aux LDL (LDLR) qui reconnaît l'ApoB100 et permet l'internalisation de la lipoprotéine dans des vésicules lysosomales. La particule est ensuite dégradée et le cholestérol est libéré dans la cellule.

Les LDL sont considérées comme des particules athérogènes. Un taux de LDL circulant élevé est un facteur de risque majeur de développement de la maladie (Steinberg, 1987), et plus les LDL sont de petite taille, plus le risque augmente (Carmena et al., 2004; Diffenderfer and Schaefer, 2014). Les modifications de type oxydation par des radicaux libres ou acétylation qu'elles subissent au sein de la paroi vasculaire (Arai, 2014; Maiolino et al., 2013) favorisent leur agrégation (Maor et al., 1997). Elles ne sont alors plus reconnues par les récepteurs à l'ApoB100 mais par les récepteurs scavenger des macrophages et des cellules musculaires lisses (Kunjathoor et al., 2002) qui se transforment en cellules spumeuses à l'origine du développement de l'athérosclérose (*cf* I.2.2.1).

II.4.5 Les HDL

Les cellules sont capables de capter le cholestérol mais elles ne peuvent pas la cataboliser. Le cholestérol en excès doit être ramené au foie, seul organe pouvant l'éliminer. Les HDL assurent ce transport reverse du cholestérol des tissus vers le foie. Elles ont 3 origines : la synthèse et la sécrétion par le foie et l'intestin, et le produit du métabolisme des

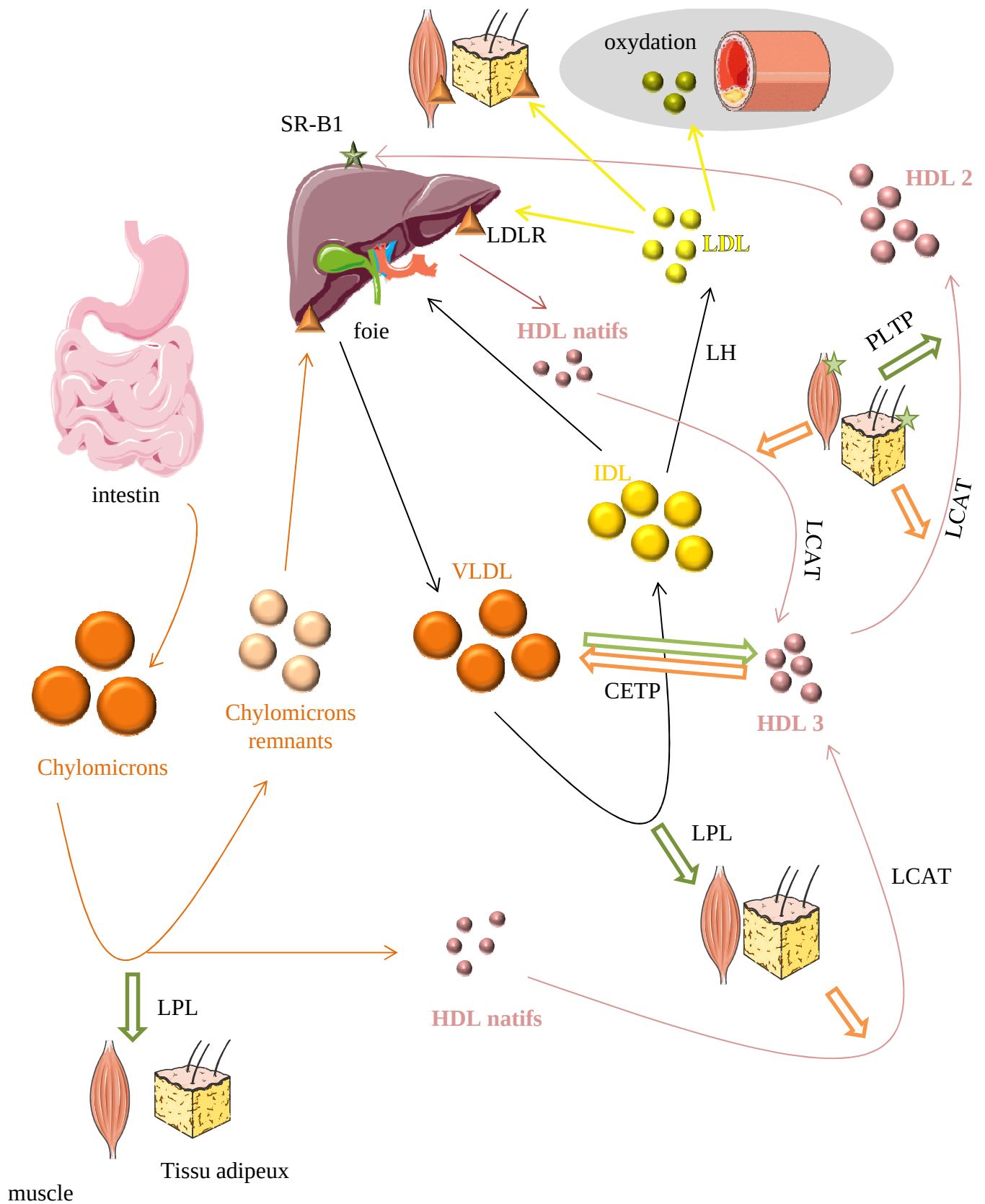


Figure 9 : Le métabolisme des lipoprotéines.

	Transfert de cholestérol		Récepteur aux LDL
	Transfert de phospholipides		Récepteur scavenger SR-B1

chylomicrons. Elles sont riches en ApoA-I, ApoA-II, ApoE ApoC-II et C-III. Les HDL natifs (ou préβ-HDL) s'enrichissent en cholestérol qu'elles captent auprès des cellules périphériques (Castro and Fielding, 1988). L'enzyme plasmatique LCAT (*Lecithin Cholesterol AcylTransferase*), activée par ApoA-1, estérifie ce cholestérol libre qui migre alors au centre de la structure (Steinmetz and Utermann, 1985), donnant naissance aux HDL3 sphériques. Ces HDL3 captent à leur tour du cholestérol des tissus périphériques, de nouveau estérifié par la LCAT, et grâce à l'enzyme plasmatique PLTP (*PhosphoLipid Transfer Protein*) s'enrichissent en phospholipides (Jauhiainen et al., 1993; Tu et al., 1993). Elles deviennent alors des HDL2, produit final du métabolisme des HDL. Les HDL sont considérées comme des particules antiathérogènes puisqu'elles initient le transport du cholestérol en excès en vue de son élimination par le foie (Assmann and Gotto, 2004; Zuliani et al., 2007). En effet, le récepteur scavenger SR-B1 hépatique reconnaît les ApoA-I et II portées par les HDL2 et captent les esters de cholestérol qui vont être éliminés dans la bile ou dégradé en acides biliaires (Acton et al., 1996).

II.4.6 Les apolipoprotéines

Il est à noter que les apolipoprotéines C et E sont les seules Apo transférables entre les lipoprotéines, les autres étant « fixes » sur leur lipoprotéine.

Les rongeurs ne développent pas spontanément de l'athérosclérose, et pour l'étude de la maladie chez la souris, il a été créé un modèle dans lequel l'ApoE est invalidée. Ces souris ApoE^{-/-} présentent des taux sanguins de cholestérol total et de triglycérides élevés et un taux de HDL faible. Elles développent spontanément des lésions qui atteignent un stade avancé autour de l'âge de 8 mois avec un régime normal, et qui peuvent être accélérées avec un régime riche en cholestérol (Paigen) (Zhang et al., 1992). Il a été montré plus tard que chez ces souris sous régime Paigen, la fonction endothéliale est plus altérée que chez les souris ayant un régime normal, expliquant l'accélération de l'apparition des lésions (Bonhuth et al., 1997; d'Uscio et al., 2001).

Les lipoprotéines sont les vecteurs des lipides pour leur transport, leur distribution aux cellules et l'élimination de cholestérol excédentaire par le foie (figure 9). Des perturbations de leur métabolisme par dysfonctionnement des enzymes impliquées ou des apolipoprotéines qui les composent entraînent des dyslipidémies et expose l'organisme à un risque d'athérosclérose.

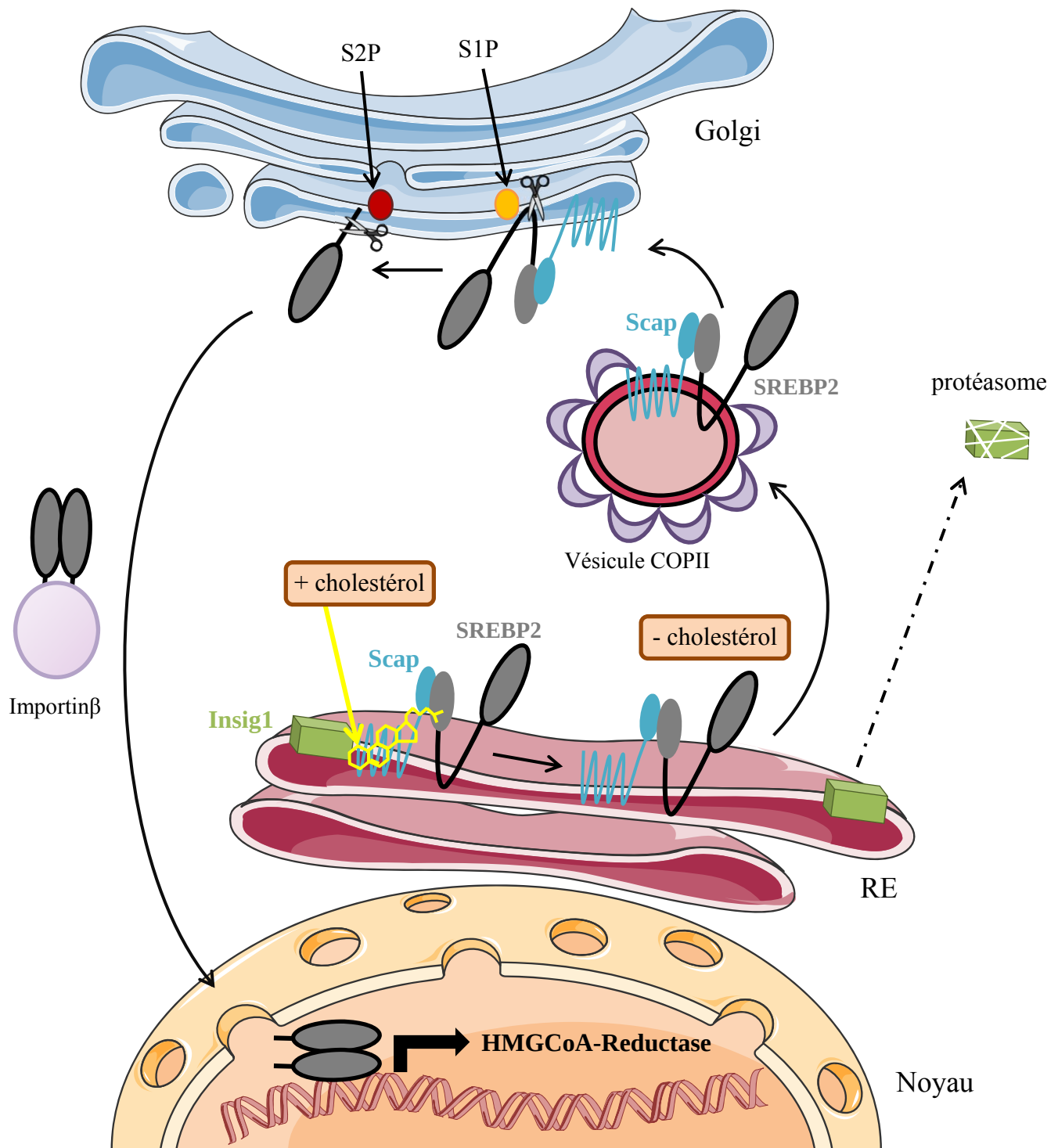


Figure 10 : La régulation transcriptionnelle de l'HMGCoA-Reductase. Le complexe Scap/SREBP2 est localisé à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Lorsque la quantité de cholestérol est élevée (+ cholestérol), il se fixe sur Scap qui adopte une conformation autorisant une interaction avec Insig1. Le complexe Insig1/Scap/SREBP2 est alors retenu à la membrane du RE. Lorsque le taux de cholestérol diminue (- cholestérol), Scap est libéré de son interaction avec Insig. Cette dernière est adressée au protéasome pour être dégradée. Le complexe Scap/SREBP2 est escorté au sein de vésicules COPII jusqu'à la membrane du Golgi, où la fraction N-terminale de SREBP2 est libérée par clivages enzymatiques par les protéases S1P et S2P. Ce fragment actif se dimérise, migre dans le noyau et se fixe aux séquences SRE des promoteurs de ses gènes cibles, parmi lesquels celui codant l'HMGCoA-Reductase (d'après Brown et Goldstein).

II.5 La régulation de l'homéostasie du cholestérol

L'excès de cholestérol est toxique pour la cellule, et au niveau de l'organisme entier, l'excès de cholestérol circulant (LDL) est responsable du développement de l'athérosclérose (Tabas, 1997, 2002). Le maintien de l'homéostasie intracellulaire du cholestérol repose sur la gestion de l'équilibre entre les régulations de la synthèse endogène, de l'import et de l'export par la cellule, du stockage sous forme d'esters et enfin de l'élimination sous forme d'acides biliaires. C'est le taux intracellulaire de cholestérol qui contrôle ces mécanismes par une régulation transcriptionnelle et post transcriptionnelle des nombreuses protéines impliquées. Dans ces processus, deux facteurs sont indispensables : SREBP2 (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein*) et les LXR (*Liver X Receptor*). Le premier active la synthèse endogène et l'import ce qui permet l'augmentation de la quantité de cholestérol, tandis que les derniers stimulent l'efflux et inhibent l'import ce qui agit en faveur d'une diminution.

II.5.1 Régulation de la synthèse du cholestérol

II.5.1.1 Le contrôle transcriptionnel de l'HMGC_oA-Reductase.

Le cholestérol exerce un rétrocontrôle sur sa propre synthèse en contrôlant la régulation transcriptionnelle par le facteur de transcription SREBP2 du gène codant pour l'enzyme clé de la voie du mévalonate, l'HMGC_oA Reductase. Les mécanismes de cette régulation ont été largement étudiés depuis les années 1990 *in vitro* comme *in vivo*, par les équipes de M.S Brown et J.L Goldstein. J. Horton a notamment montré que des souris exprimant au niveau du foie et du tissu adipeux un mutant tronqué de SREBP2 qui ne peut être régulé par le cholestérol présentent un niveau d'ARNm de l'HMGC_oA-Reductase 75 fois plus élevé que les souris témoins et un taux de synthèse de cholestérol 28 fois supérieur (Horton et al., 1998).

La compilation des données de tous ces travaux donne une description du mécanisme que l'on peut détailler ainsi (figure 10) :

La protéine SREBP2 est présente à la membrane du réticulum endoplasmique (RE), avec la protéine Scap (*SREBP Cleavage Activating Protein*) qui possède un *sterol sensing domain* ou domaine sensible aux stérols. Lorsque le taux de cholestérol est faible, Scap escorte SREBP2 jusqu'à l'appareil de Golgi grâce au recrutement des protéines du transport antérograde COPII. Là, SREBP2 est activé par clivage protéolytique d'abord par l'enzyme S1P (Site-1 protease) puis par S2P (Brown and Goldstein, 1999). La fraction N-Terminale libérée se dimérise, migre dans le noyau grâce à l'importin β (Lee et al., 2003), et se fixe aux

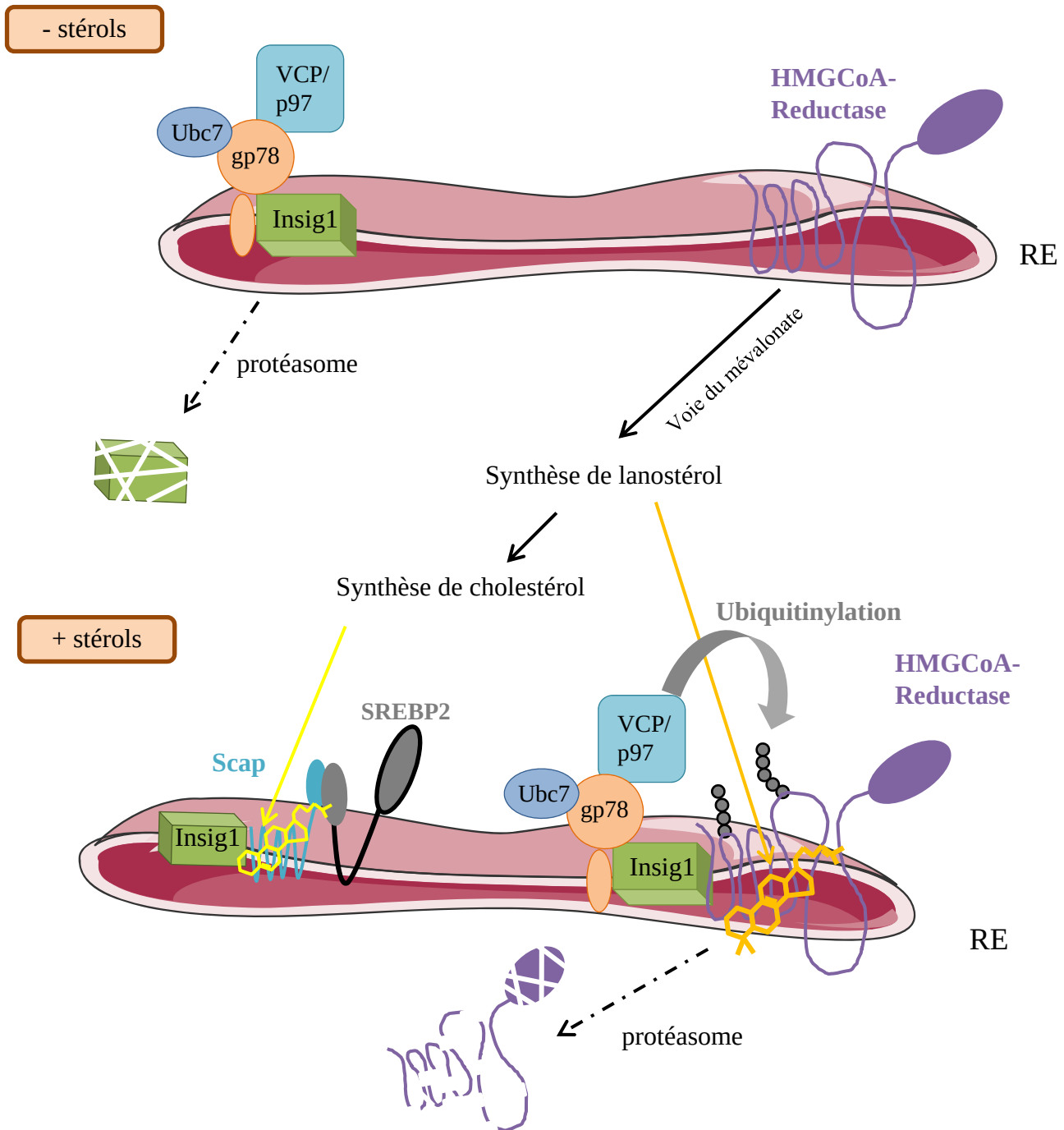


Figure 11 : La régulation post-traductionnelle de l'HMGCoA-Reductase. Lorsque le taux de cholestérol est faible, la protéine Insig1 est dégradée par le protéasome et l'enzyme HMGCoA-Reductase présente à la membrane du RE active la voie du mévalonate. Les taux de de lanostérol et de cholestérol augmentent alors. Lorsque ces taux sont élevés, le cholestérol inhibe la translocation de SREBP2 (voir figure 10) et le lanostérol se lie au domaine sensible aux stérols de l'HMGCoA-Reductase. Ceci entraîne son interaction avec Insig1 et les ubiquitine-ligases qui y sont complexées, l'ubiquitinylation de l'enzyme et sa dégradation par le protéasome (d'après Sever et al., 2003 et Jo et al., 2011).

éléments de réponse aux stérols (SRE, *Sterol Regulatory Element*) des promoteurs de ses gènes cibles, dont les gènes codant pour l'HMGCoA Reductase, l'HMGCoA-Synthase, la squalène synthase, le récepteur aux LDL... (Guan et al., 1997; Hua et al., 1993). La synthèse du cholestérol est alors activée et le taux intracellulaire augmente.

Lorsque ce taux est suffisamment élevé, le cholestérol s'accumule dans la membrane du RE et se lie au domaine sensible aux stérols de Scap ce qui modifie sa conformation et favorise sa liaison à la protéine Insig1 (*INSulin Induced Gene*) (Brown et al., 2002a; Feramisco et al., 2005; Radhakrishnan et al., 2004). Insig1 retient le complexe Scap/SREBP2 à la membrane du RE et bloque sa migration dans le Golgi (Sun et al., 2005, 2007; Yang et al., 2002a). L'HMGCoA-Reductase n'est plus transcrite, le cholestérol intracellulaire est utilisé et puisqu'il n'y a plus de synthèse *de novo*, son taux diminue jusqu'à ce qu'il soit trop faible pour permettre son interaction avec Scap. SREBP2 est alors de nouveau libre pour migrer dans le noyau et activer la synthèse du cholestérol. Ce cycle se répète pour maintenir un taux physiologique de cholestérol dans les cellules.

II.5.1.2 Le contrôle post-transcriptionnel de l'HMGCoA-Reductase

Au niveau post-transcriptionnel, l'HMGCoA-Reductase est régulée par la modulation de sa demi-vie par le cholestérol et ses précurseurs, notamment le mévalonate et le lanostérol (Correll and Edwards, 1994; Song et al., 2005a) qui activent la « dégradation associée au réticulum endoplasmique » (ERAD) de la protéine. Lorsque les cellules sont pauvres en cholestérol, la demi-vie de l'HMGCoA-Reductase est d'environ 12h, alors que quand le taux de cholestérol est élevé, elle chute jusqu'à atteindre à peine 1h (Goldstein et al., 2006). L'accélération de la dégradation de la protéine par les stérols est possible grâce à la présence d'un domaine de détection des stérols, semblable à celui de Scap, au niveau de la partie N-terminale membranaire de l'enzyme (Sever et al., 2003). Lorsque le taux de stérols est élevé, ce domaine se lie à la protéine Insig1, associée dans un complexe aux ubiquitine-ligases E3 du réticulum gp78 et Trc8, qui se chargent de l'ubiquitinylation de la Reductase préalable à sa dégradation par le protéasome (figure 11) (Jo et al., 2011; Song et al., 2005b). Ainsi, lorsque le taux de cholestérol est élevé, il agit simultanément pour diminuer la quantité de l'enzyme au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.

En pharmacologie, les statines sont utilisées pour inhiber l'activité de l'HMGCoA-Reductase au niveau hépatique et ainsi faire baisser la quantité de cholestérol (Istvan and Deisenhofer, 2001). En conséquence, la translocation de SREBP2 est activée ce qui permet

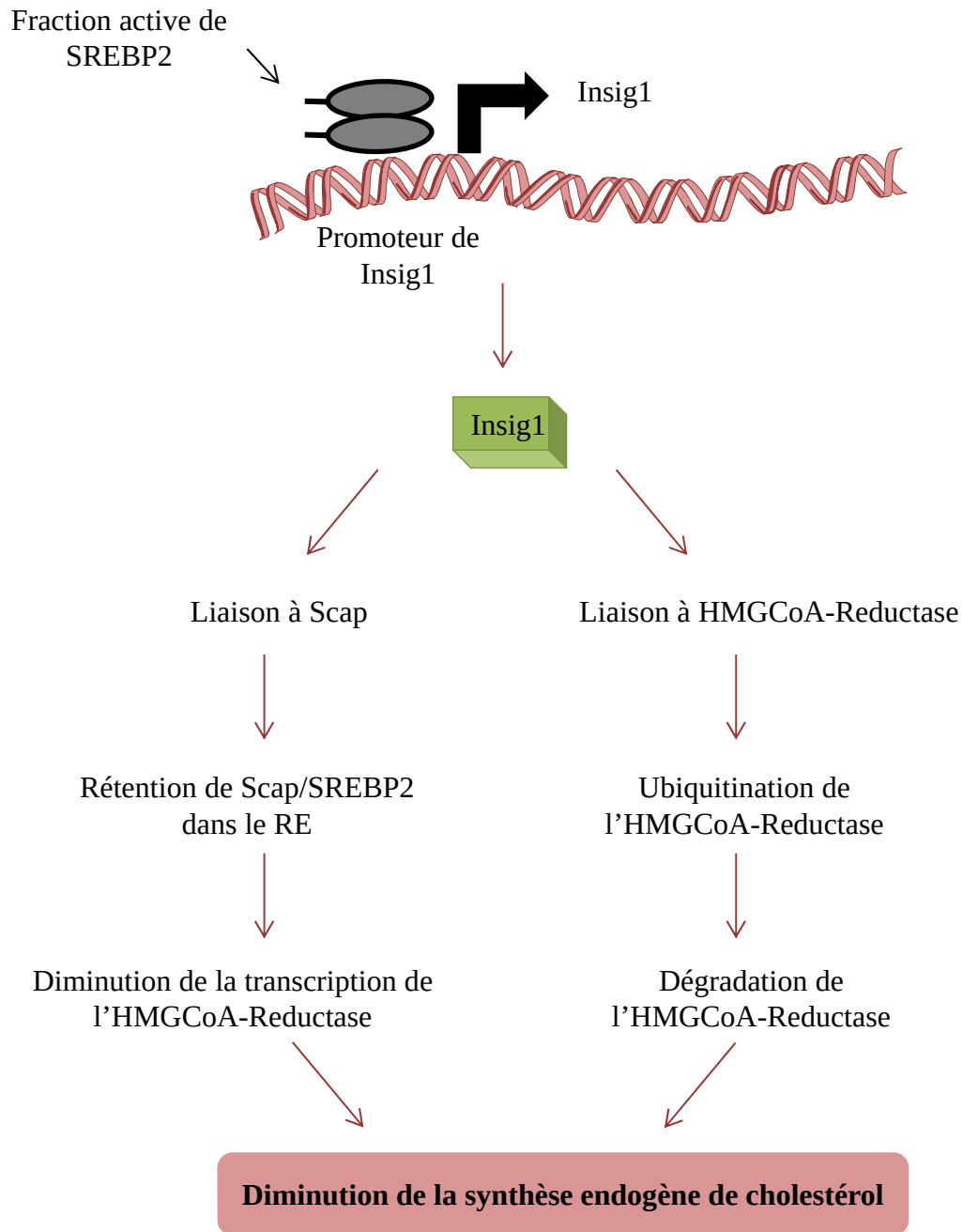


Figure 12 : La double régulation de l'HMGCoA-Reductase par Insig1. Insig1 est impliquée dans les deux niveaux de régulation de l'HMGCoA-Reductase : sa transcription par le facteur SREBP2 et sa dégradation par le protéasome (d'après Golstein et al., 2006).

d'augmenter l'expression du LDLR hépatique et d'éliminer plus de LDL circulant (voir II.5.2.1) (Goldstein and Brown, 2009).

II.5.1.3 Le contrôle de l'expression et de la stabilisation de Insig1.

Insig1 est une protéine clé de la régulation de la synthèse du cholestérol, elle participe aux 2 niveaux de régulation de l'HMGCoA Reductase. Elle est elle-même régulée au niveau transcriptionnel et post transcriptionnel (Lee et al., 2006). Le promoteur du gène codant pour Insig1 contient une séquence SRE et est donc une cible de SREBP2 (Kast-Woelbern et al., 2004). Cela signifie que lorsque le taux de cholestérol est faible, SREBP2 transloque au noyau et stimule la transcription du messenger d'Insig1 (figure 12).

Paradoxalement, le taux de protéine Insig1 chute lorsque celui de son messenger augmente. En effet, la dissociation du complexe Scap/SREBP2/Insig1 a libéré la protéine Insig1 qui subit une ubiquitinylation par l'E3 gp78 (Lee et al., 2006), qui l'adresse au protéasome pour y être dégradée (Tsai et al., 2012). La protéine Insig1 nouvellement synthétisée par l'activation de SREBP2 est également rapidement dégradée tant que le taux de cholestérol néo synthétisé n'a pas atteint un niveau permettant son interaction avec Scap. Lorsque ce taux est suffisamment élevé, le cholestérol se lie à Scap, qui se lie à Insig1 et inhibe sa dégradation. Cela conduit à une accumulation du complexe Scap/SREBP2/Insig1 à la membrane du RE, même si le taux d'ARNm de Insig1 diminue. L'inhibition de la synthèse du cholestérol est donc effective uniquement lorsqu'il y a suffisamment de cholestérol et d'Insig1 néosynthétisés (Gong et al., 2006). Les auteurs ayant décrit ce double rétrocontrôle sur la synthèse du cholestérol émettent l'hypothèse qu'il servirait à empêcher une inhibition de la voie du mévalonate trop précoce par le cholestérol seul, avant que les autres isoprénoïdes de la voie ne soient synthétisés (Goldstein et al., 2006).

II.5.1.4 Le contrôle de l'expression et la stabilisation de Scap

Scap est une protéine indispensable à la régulation de la synthèse du cholestérol. Sa suppression dans des cellules empêche le clivage de SREBP2 par S1P et la synthèse de cholestérol (Rawson et al., 1999). En dépit de sa place importante dans ce système de régulation, peu de données sont connues concernant la régulation de l'expression de la protéine Scap. Un article de 1999 analyse la séquence du gène codant Scap et montre que sa région promotrice présente une structure caractéristique des promoteurs des gènes de ménage, avec des sites de fixation aux facteurs de transcription Sp1 et AP2. L'étude indique également l'existence d'un site de fixation au facteur ADD1 (*Adipocyte Determination and*

Differentiation-dependent factor 1)/SREBP1, qui suggère une régulation de l'expression de Scap par ce membre de la famille des SREBP, bien qu'on ne sache pas si cette séquence est fonctionnelle (Nakajima et al., 1999).

Concernant la régulation post-traductionnelle de la protéine, on dispose de plus d'éléments. Il a été montré qu'après avoir assuré le transport de SREBP2 jusqu'au Golgi, Scap est recyclée pour retourner à la membrane du RE où elle va lier et transporter d'autres SREBP2 (Nohturfft et al., 1999). Récemment, on a découvert que le clivage de SREBP2 par l'enzyme S1P est indispensable à ce recyclage et que Scap reste dans le Golgi avant d'être dégradé si le clivage est inhibé (Shao and Espenshade, 2014). Les modifications post-traductionnelles de type glycosylations semblent avoir un effet sur la stabilité de la protéine et son efficacité de recyclage (Yuan et al., 2011). Une étude implique la glycosylation de Scap dans la formation des cellules spumeuses. L'induction d'un stress inflammatoire dans une lignée de macrophages humains en culture induit une accumulation de cholestérol, due à activation des gènes régulés par SREBP2, notamment la Reductase. Cette activation semble être causée par une augmentation de l'expression et de la glycosylation de Scap (Zhou et al., 2013).

II.5.1.5 Régulation de l'expression de SREBP2

Le gène codant SREBP2 est un gène cible de lui-même. Il contient en effet une séquence SRE dans sa région 5' ainsi qu'une séquence NF-Y, qui semblent toutes les deux indispensables à la régulation de l'expression du gène par les stérols. Ainsi, les quantités d'ARNm et de protéine SREBP2 augmentent lorsque le fragment actif de SREBP2 transloque dans le noyau (Sato et al., 1996).

La synthèse du cholestérol est un mécanisme finement régulé qui mobilise le complexe protéique Scap/SREBP2/Insig1 permettant l'activation ou l'inhibition de la transcription de l'enzyme HMGCoA-Reductase. C'est le taux intracellulaire de cholestérol, détecté par la protéine Scap, qui dicte l'activation ou la séquestration membranaire de SREBP2. La stabilisation ou la dégradation des protéines de ce complexe sont également fonction du taux de cholestérol intracellulaire.

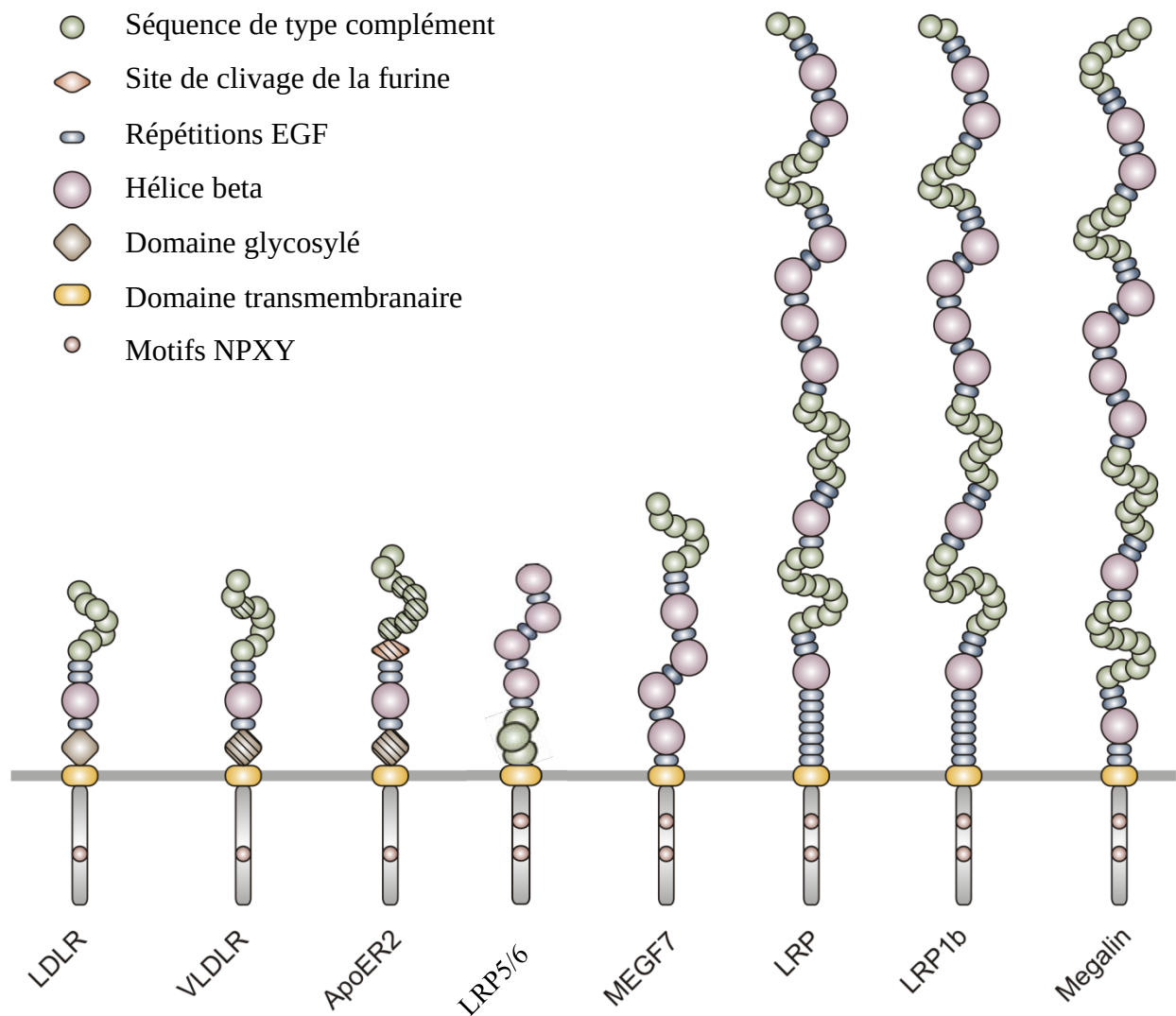


Figure 13 : La famille des récepteurs aux LDL (*Low Density Lipoprotein*). Elle comprend 8 récepteurs présentant des homologies de structure. Le domaine extracellulaire comporte des éléments de fixation aux ligands et le domaine cytoplasmique contient des sites NPxY phosphorylables (d'après Boucher et Gotthardt, 2004).

II.5.2 Régulation de la captation du cholestérol : le récepteur aux LDL

Le récepteur aux LDL (LDLR) appartient à la famille des récepteurs aux LDL qui comprend 7 autres membres présentant des homologies de structure : le LRP1 (*LDL-receptor Related Protein 1*), le récepteur aux VLDL, le récepteur 2 à l'ApoE, le LRP5/6, MEGF7, le LRP1B et le LRP2 (figure 13). Compte tenu de son importance dans ce projet de thèse, le récepteur LRP1 fait l'objet du chapitre III de ce manuscrit.

M. Brown et J. Goldstein ont reçu le prix Nobel de Physiologie en 1985 pour leur identification du récepteur aux LDL, nommé aussi récepteur B/E, et de son rôle dans le métabolisme du cholestérol (Brown and Goldstein, 1976). Il est composé d'un domaine extracellulaire qui comporte 7 séquences répétées d'une quarantaine d'acides aminés riches en cystéines, qui forment les domaines de liaison au ligand. Le LDLR se lie à l'ApoB100 des LDL par les domaines 3 à 7, et à l'ApoE des chylomicrons remnants et des IDL par les domaines 3 à 5 (Fisher et al., 2004; Nimpf and Schneider, 2000). On trouve ensuite un domaine d'homologie au précurseur du facteur de croissance épidermique EGF (*Epidermal Growth Factor*). Proche de la membrane plasmique se trouve un domaine glycosylé puis le domaine transmembranaire. La courte chaîne cytoplasmique comporte une séquence NPXY.

Le LDLR est retrouvé dans des zones membranaires nommées puits recouverts de clathrines (Anderson et al., 1976) et la fixation d'une LDL sur son récepteur entraîne l'internalisation par endocytose du couple LDLR/LDL au sein d'une vésicule recouverte de clathrines (Anderson et al., 1977). La fusion de cette vésicule avec une vésicule endosomale diminue le pH permettant la libération du récepteur qui peut alors être recyclé à la membrane, tandis que les composants lipidiques et apolipoprotéiques de la LDL sont dégradés (Arias-Moreno et al., 2008; Brown et al., 1997).

II.5.2.1 Régulation de l'expression du LDLR

Le LDLR est exprimé de façon ubiquitaire mais c'est au niveau des cellules hépatiques qu'il est majoritairement retrouvé. Son expression est sous contrôle du facteur SREBP2. En effet, le promoteur du gène codant pour le LDLR possède une séquence de type TATA-box et 3 séquences répétées nommées répétition 1 à 3. La répétition 2 contient une séquence SRE, cible de la fraction nucléaire de SREBP2 (Briggs et al., 1993) et les répétitions 1 et 3 sont ciblées par le facteur de transcription Sp1 (Südhof et al., 1987). Ces 3 répétitions sont nécessaires à la régulation de l'expression du LDLR par le cholestérol (Sanchez et al., 1995). Ainsi, lorsque le taux de cholestérol intracellulaire est faible, la translocation de SREBP2

permet l'activation simultanée de la synthèse endogène et de la capacité à capter le cholestérol présent dans les LDL circulants, ce qui contribue à le ramener à son taux physiologique (Sanchez et al., 1995).

II.5.2.2 Régulation post-traductionnelle du LDLR

Si l'expression du LDLR est contrôlée par SREBP2, ce sont les LXR qui contrôlent la stabilité de la protéine. Les LXR α et β sont des récepteurs nucléaires qui ont pour ligands les oxystérols (Janowski et al., 1996, 1999), des dérivés métaboliques du cholestérol dont la quantité augmente parallèlement à celle du cholestérol (Wong et al., 2007). Les LXR fonctionnent en hétérodimère avec le récepteur RXR (*Retinoid X Receptor*). Ils sont constitutivement fixés à leurs séquences promotrices cibles et interagissent avec des co-répresseurs en absence de ligands. La fixation d'un ligand entraîne le recrutement de co-activateurs et induit la transcription de ces gènes cibles (Repa and Mangelsdorf, 2000). Parmi eux se trouve celui qui code la protéine IDOL (*Inducible Degradar of the LDLR*). Cette ubiquitine ligase E3 permet l'ajout d'ubiquitine sur la partie cytoplasmique du récepteur au LDL, signal déclenchant sa dégradation au sien des lysosomes (Zelcer et al., 2009; Zhang et al., 2012). Il semble que IDOL cible les LDLR présents dans les rafts membranaires et que le mécanisme d'internalisation du récepteur soit différent du mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant (Sorrentino et al., 2013).

II.5.2.3 Rôle du LDLR dans l'athérosclérose

Certaines hypercholestérolémies familiales sont dues à des mutations du gène codant pour le LDLR qui provoquent une augmentation du taux de LDL circulant (Dedoussis et al., 2004; Jensen, 2002; Yang et al., 2007). Ceci est un facteur de risque majeur dans le développement de l'athérosclérose. Les souris invalidées pour le LDLR (LDLR^{-/-}) sont un modèle d'étude de l'athérosclérose classiquement utilisé. Sous régime normal, elles ont un taux de cholestérol total et de LDL plasmatique légèrement plus élevé que les souris sauvages. Il augmente fortement lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en cholestérol (Paigen) et provoque l'apparition rapide de lésions athéromateuses (Ishibashi et al., 1994a; Kolovou et al., 2008). Les souris double-KO LDLR et ApoE sont également très utilisées pour étudier la pathologie (Ishibashi et al., 1994b).

II.5.3 Régulation de l'efflux du cholestérol : ABCA1 et ABCG1

Si toutes les cellules sont potentiellement capables de capter et de synthétiser du cholestérol, aucune à l'exception des hépatocytes n'est capable de le cataboliser. Le transport reverse du cholestérol permet de le faire sortir des cellules des tissus périphériques via des protéines spécialisées dans l'efflux, pour le transférer aux accepteurs que sont les HDL. Des transporteurs de type ABC (*ATP Binding Cassette*) ont été identifiés comme indispensable à ce processus. Ces protéines assurent le transport actif, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, et unidirectionnel d'une grande variété de substrats tels que des acides aminés, des ions, des peptides, des protéines et des lipides, dont le cholestérol, au travers de la membrane plasmique. Chez l'Homme on compte 48 gènes codant pour des transporteurs de type ABC, classés en 7 catégories (ABCA à ABCG). Les transporteurs ABCA1 et ABCG1 sont les principaux transporteurs du cholestérol, ce sont les plus étudiés avec plusieurs modèles de souris invalidées ou surexprimant ces protéines. Ils sont régulés au niveau de leur expression mais également de leur localisation cellulaire et de leur activité par différents mécanismes, dont certains ne sont pas clairement élucidés.

II.5.3.1 Fonction des transporteurs ABCA1 et ABCG1

ABCA1 et ABCG1 sont exprimés par tous les tissus mais on les retrouve plus fortement exprimés dans les tissus ayant un métabolisme lipidique important comme le foie, l'intestin, les surrénales, les poumons, le cerveau et dans les macrophages (Lawn et al., 2001; Oram and Heinecke, 2005; Wellington et al., 2002).

Les deux récepteurs travaillent en synergie pour charger les ApoA-1 en lipides (Gelissen et al., 2006). Le ABCA1 hépatique initie la formation des HDL natifs en transférant le cholestérol libre et les phospholipides des cellules aux ApoA-I non chargées en lipides (Vedhachalam et al., 2007a, 2007b; Wang et al., 2001). ABCG1 ne possède pas cette capacité mais utilise ces HDL natifs comme substrat pour les charger en cholestérol, donnant naissance aux HDL matures. Il peut aussi enrichir directement les HDL matures (Kennedy et al., 2005; Vaughan and Oram, 2006; Wang et al., 2004).

En plus de l'efflux direct de cholestérol, des études suggèrent que les transporteurs sont impliqués dans le trafic intracellulaire de cholestérol. Ils sont retrouvés au niveau membranaire mais également au niveau intracellulaire, dans l'appareil de Golgi et les vésicules endosomales tardives et précoces (Neufeld et al., 2001, 2014). La surexpression de ABCG1 entraîne une activation de la translocation nucléaire de SREBP2, probablement en

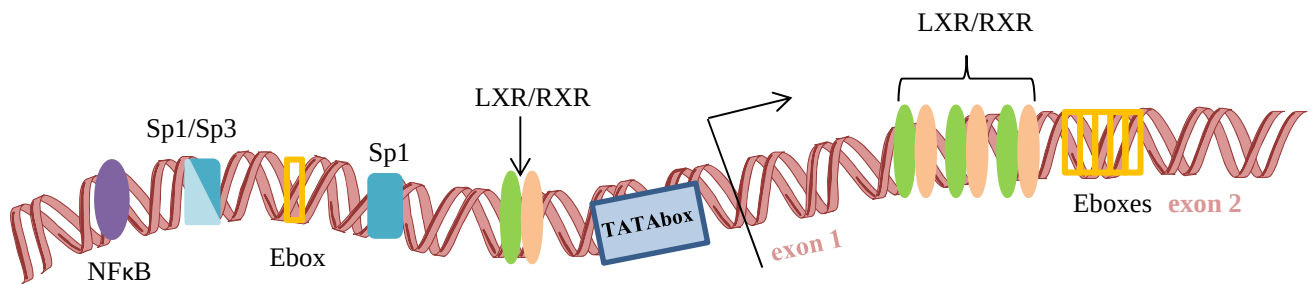


Figure 14 : Le promoteur du gène codant ABCA1. Le gène codant ABCA1 contient un unique promoteur en amont de l'exon 1 comportant des séquences de fixation ciblées par différents facteurs de transcription : Sp1, Sp3, NFκB et LXR/RXR (d'après Langmann et al., 2002 ; Singaraja et al., 2001 ; Costet et al., 2003) .

facilitant le départ du cholestérol de la membrane du RE, ce qui libère le complexe Scap/SREBP2 de Insig1 (Tarling and Edwards, 2011). La surexpression de ABCG1 conduit aussi à une augmentation de l'estérification du cholestérol ce qui suggère que le transporteur pourrait conduire le cholestérol non efflué à l'enzyme ACAT (*AcylCoA-Cholesterol-Acyl-Transferase*) qui assure cette estérification (Vaughan and Oram, 2006). ABCA1 est quant à lui impliqué dans la régulation de la quantité de cholestérol dans les microdomaines (rafts), ce qui module le protéome présent dans ces domaines (Chowdhury et al., 2015; Landry et al., 2006). Par ailleurs, son invalidation chez la souris perturbe le transport vésiculaire des lipides entre le Golgi et la membrane plasmique (Orsó et al., 2000)

II.5.3.2 Régulation transcriptionnelle

Les LXR sont les principaux facteurs qui contrôlent l'expression des gènes codants pour ABCA1 et ABCG1 (Costet et al., 2000; Edwards et al., 2002). L'activation des LXR par les oxystérols favorise l'efflux de cholestérol en augmentant l'expression des transporteurs (Larrede et al., 2009; Ma et al., 2014; Venkateswaran et al., 2000; Wang et al., 2006). Une étude récente a montré que dans les macrophages, LXR β n'est pas impliqué dans la stimulation de l'expression des transporteurs et de l'efflux et que seul LXR α en est responsable (Ishibashi et al., 2013).

o ABCA1

Le promoteur du gène de ABCA1 contient une TATA-box qui apparait indispensable à l'activation de ce promoteur, ainsi que des séquences cibles à Sp1 et Sp3 (Langmann et al., 2002). Les éléments de réponse aux LXR (LXRE) et au RXR (RXRE) sont retrouvés au niveau du promoteur ainsi qu'au sein de l'intron 1 du gène (Costet et al., 2000; Singaraja et al., 2001). Le promoteur contient également une Ebox et un site NF κ B (Langmann et al., 2002; Santamarina-Fojo et al., 2000; Yang et al., 2002b). L'expression de ABCA1 est régulée par les LXR mais également par d'autres facteurs nucléaires tels que RAR (*Retinoic Acid Receptor*) ou PPAR α et γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*), parfois directement, parfois par l'intermédiaire de l'activation des LXR (Costet et al., 2003; Kämmerer et al., 2011; Ozasa et al., 2011; Santamarina-Fojo et al., 2001) (figure 14).

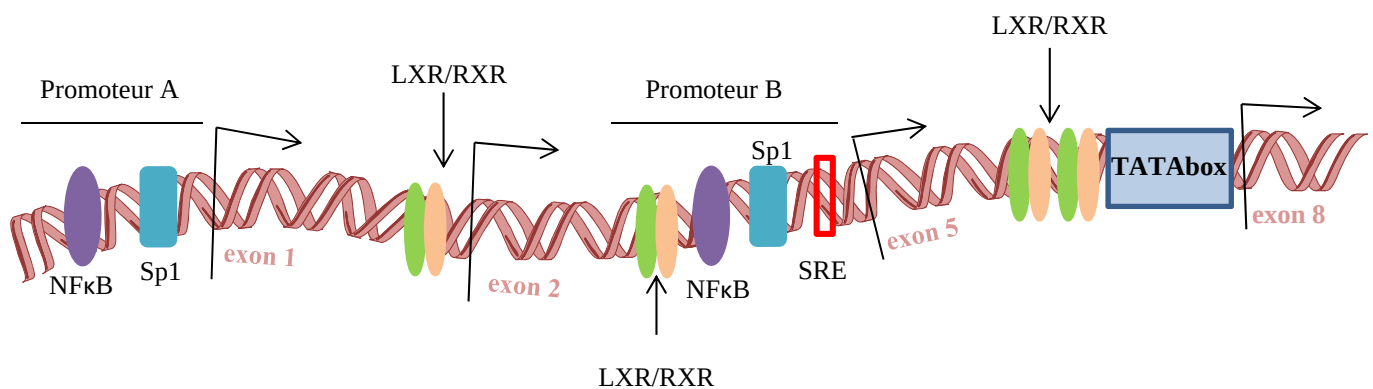


Figure 15 : Les promoteurs du gène codant ABCG1. Le gène codant ABCG1 comporte plusieurs promoteurs pouvant être activés par des facteurs de transcription différents : Sp1 et NFκB ciblent le promoteur A (en amont de l'exon 1) et le promoteur B (en amont de l'exon 5), SREBP cible également le promoteur B, LXR et RXR ciblent les promoteurs en amont de l'exon 2, de l'exon 8 et le promoteur B (d'après Lorkowski et al., 2001).

o ABCG1

Les études des gènes humain et murin de ABCG1 révèlent l'existence de nombreuses isoformes issues de différents promoteurs et/ou d'épissage alternatif, chacune pouvant être régulée différemment selon le type cellulaire et/ou l'état métabolique de la cellule (Engel et al., 2006; Nakamura et al., 2004a). Le gène humain de ABCG1 possède des promoteurs distincts, en amont de l'exon 1 (promoteur A), en amont de l'exon 2, en amont de l'exon 5 (promoteur B) et en amont de l'exon 8 (figure 15). Le promoteur B contient des sites de fixation aux facteurs de transcription Sp1 et NFκB ainsi qu'un élément de réponse à SREBP2, un à LXR (LXRE) et deux à RXR. Le promoteur A ne contient que des sites de fixation aux facteurs Sp1 et NFκB. Le promoteur en amont de l'exon 2 comporte une séquence LXRE (Lorkowski et al., 2001; Sabol et al., 2005). Le promoteur en amont de l'exon 8 contient une TATA-box et deux éléments de réponse à LXRα (LXRE) (Kennedy et al., 2001).

Des études réalisées dans différentes lignées cellulaires humaines et dans des macrophages péritonéaux murins en culture montrent que l'activation de LXR par un ligand synthétique induit la relocalisation de ABCG1 depuis les vésicules intracellulaires vers la membrane plasmique, ce qui augmente l'efflux de cholestérol vers les accepteurs (Neufeld et al., 2014; Vaughan and Oram, 2005; Wang et al., 2006). Des auteurs retrouvent ABCG1 à la membrane plasmique sans activation de LXR et propose que dans l'étude de Wang, l'utilisation d'un tag en C-ter de la protéine puisse perturber le trafficking normal du transporteur et fausser les observations (Xie et al., 2006). Une autre étude réalisée dans les mêmes types cellulaires contredit ces données, les auteurs ne retrouvant jamais ABCG1 à la membrane plasmique mais uniquement au niveau des endosomes (Tarling and Edwards, 2011). Globalement, il semblerait que la localisation de ABCG1 soit fonction de l'environnement et du métabolisme cellulaire.

II.5.3.3 Régulation post-transcriptionnelle

Au niveau post-transcriptionnel, le cholestérol intracellulaire exerce un contrôle direct sur les transporteurs ABCA1 et ABCG1. Lorsque les lipoprotéines sont endocytées par les cellules, le cholestérol libéré va inhiber sa synthèse et son import par les mécanismes décrits plus haut, et il va également activer son export en inhibant l'ubiquitination des transporteurs ABCA1 et G1, bloquant par conséquent leur dégradation par le protéasome (Hsieh et al., 2014).

o ABCA1

ABCA1 contient une séquence PEST qui permet sa dégradation par une calpaïne, régulant la quantité de transporteur dans la cellule et l'efflux de cholestérol. La fixation d'ApoA-1 à ABCA1 déclenche une boucle de rétrocontrôle positive en stimulant l'efflux de cholestérol et en inhibant la dégradation par la calpaïne ce qui augmente l'expression de ABCA1 (Arakawa and Yokoyama, 2002; Wang et al., 2003). ABCA1 est également stabilisé par l'enzyme plasmatique PLTP qui interagit directement avec le transporteur et ApoA-1 et favorise l'efflux de cholestérol (Oram et al., 2003).

Au fur et à mesure de progression des lésions athéromateuses, on trouve une quantité croissante de cholestérol libre (Lundberg, 1985; Rapp et al., 1983). Dans ces conditions pathologiques, des auteurs ont montré que le cholestérol libre inhibe l'efflux de cholestérol des macrophages en activant la dégradation de ABCA1. Ce phénomène pourrait accélérer la progression des lésions. L'étude montre également que le cholestérol libre semble n'avoir qu'un effet limité sur la dégradation ABCG1 (Feng and Tabas, 2002).

o ABCG1

La protéine ABCG1 est régulée au niveau de sa stabilité et de son activité par de nombreux mécanismes (Tarling and Edwards, 2012). Sa séquence protéique comprend des acides aminés qui portent des palmitoylations sur des résidus cystéine. La mutation de certains résidus diminue la stabilité du transporteur et l'efflux de cholestérol. Ces mutations altèrent également le trafic de la protéine depuis le réticulum endoplasmique (Gu et al., 2013).

L'Homme exprime 2 isoformes de ABCG1 (ABCG1+12 et ABCG1-12) alors que la souris n'exprime que la forme -12. La présence des 12 acides aminés supplémentaires ajoute un niveau de régulation à la stabilité de ABCG1, par la présence de sites cibles de la PKA (*Protéine Kinase A*). La phosphorylation de ces sites est associée à une augmentation de la dégradation de la protéine (Gelissen et al., 2012). Par ailleurs, ABCG1 interagit avec la cavéoline 1 ce qui stimule l'activité du transporteur (Gu et al., 2014).

Dans les cellules endothéliales, l'activation de l'AMPK (*Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase*) augmente l'expression de ABCG1 en stabilisant son ARNm. En conséquence, l'efflux de cholestérol augmente et la production de ROS est inhibée. Ceci contribue à préserver l'activité de la eNOS et la fonction endothéliale (Li et al., 2010).

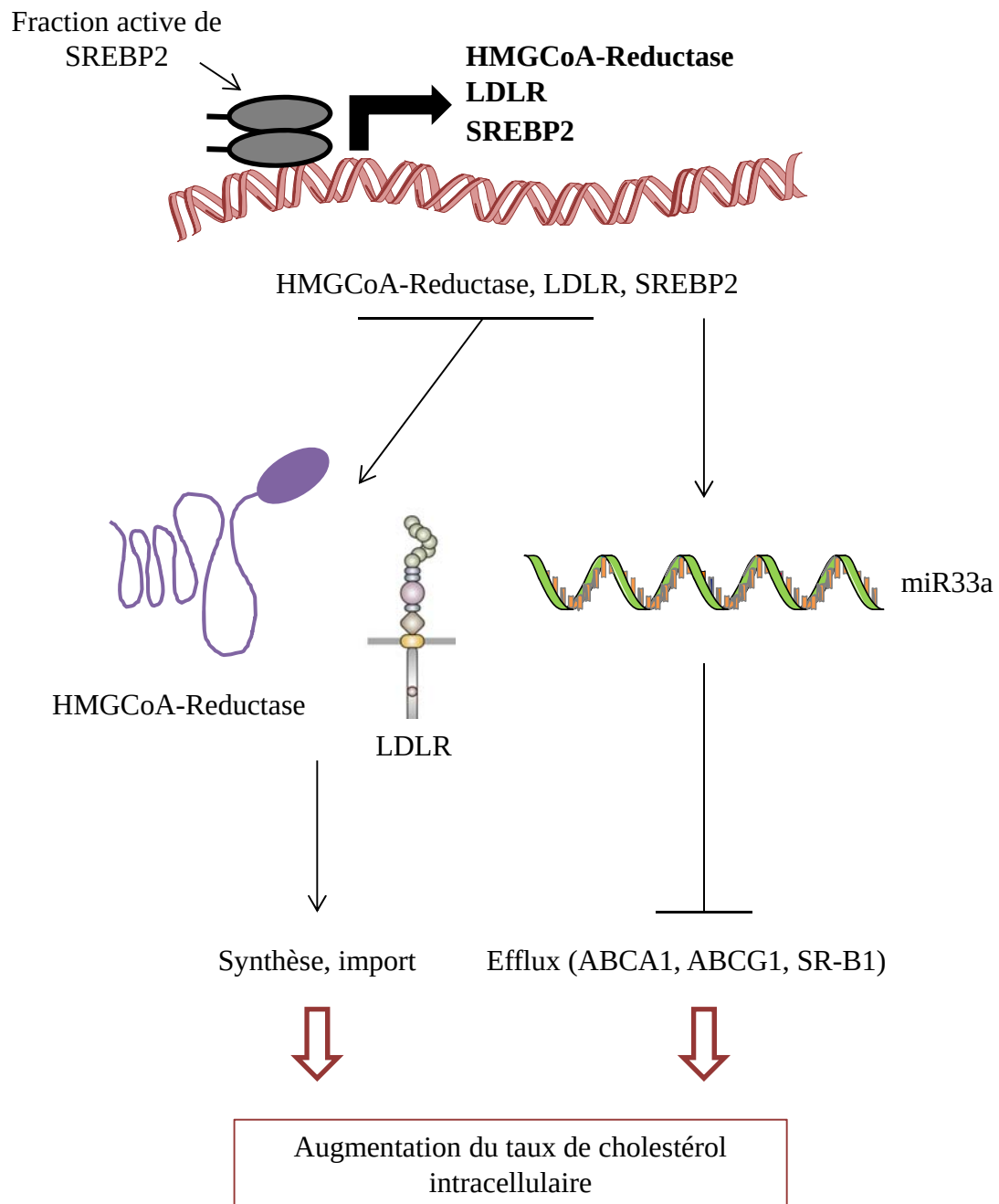


Figure 16 : La régulation de l'efflux de cholestérol par le miR33a. Le miR33a est transcrit en même temps que le gène codant SREBP2 et cible les ARNm des transporteurs ABCA1, ABCG1 et SR-B1, ce qui contribue à inhiber l'efflux de cholestérol (Najafi-Shoushtari et al., 2010 ; Ono et al., 2015).

o Régulation par les microARN

Récemment, les microARN en tant que régulateurs du métabolisme du cholestérol ont connu un intérêt grandissant (Fernández-Hernando and Moore, 2011; Fernández-Hernando et al., 2011; Rayner et al., 2010, 2012). Les microARN (miRNA) sont des petites séquences d'ARN non codant, simple brin, d'environ 22 nucléotides. Ils se fixent à une séquence complémentaire située dans la région 3' non traduite de l'ARN messenger ciblé et réprime sa traduction et/ou perturbe sa stabilité (Ambros, 2004; Bartel, 2004).

Un des principaux miRNA impliqués dans le métabolisme du cholestérol est le miR33. Le miR33-a est retrouvé chez l'Homme et la souris, abrité dans l'intron 16 du gène codant SREBP2 ; le miR33-b, absent chez la souris, est situé dans l'intron 17 de SREBP1 (Bommer and MacDougald, 2011; Gerin et al., 2010). La première étude sur ce miRNA a révélé qu'il ciblait l'ARNm de ABCA1 et réprimait sa traduction dans des fibroblastes, des hépatocytes humains et des macrophages murins en culture (Najafi-Shoushtari et al., 2010). Les miR33 ciblent et répriment également l'ARNm de ABCG1 et SR-B1, tous impliqués dans l'efflux de cholestérol (Ono et al., 2015). Ainsi, lorsque la cellule a besoin de cholestérol, elle active sa synthèse et son import par la translocation de SREBP2. Le gène de SREBP2 étant également transcrit, le miR33a produit simultanément contribue à faire baisser l'export de cholestérol (figure 16).

Les souris déficientes en miR33 présentent des taux élevés de ABCA1 dans les macrophages et le foie, une augmentation de l'efflux du cholestérol et du taux de HDL circulant plus élevés que chez les souris contrôles (Horie et al., 2010). La double délétion miR33 et ApoE^{-/-} (Horie et al., 2012), tout comme le traitement de souris LDLR^{-/-} avec un anti-miR33 (Rayner et al., 2011) entraîne une diminution des lésions athéromateuses et révèle le rôle proathérogène de la régulation de l'efflux de cholestérol par miR33 (Horie et al., 2012).

Les statines ont pour effet d'induire l'activation de SREBP2 et donc sa transcription. Il n'est donc pas surprenant qu'un traitement *in vitro* avec des statines augmente l'expression de miR33 (Niesor et al., 2015). En conséquence, on observe une diminution de l'expression de ABCA1 et l'efflux de cholestérol ce qui peut contrecarrer l'effet bénéfique des statines sur la diminution de la quantité de cholestérol.

II.5.3.4 Rôle dans l'athérosclérose

o ABCA1

La mutation d'ABCA1 chez l'Homme est responsable de la maladie de Tangier. Caractérisée par une déficience en HDL plasmatique, cette maladie provoque une accumulation de cholestérol dans la plupart des tissus et une plus grande susceptibilité à l'athérosclérose (Brooks-Wilson et al., 1999; Rust et al., 1999). L'inactivation totale d'ABCA1 chez la souris mime la maladie de Tangier (Orsó et al., 2000), ces animaux présentent aussi une déficience en HDL plasmatique et une accumulation de cellules spumeuses dans les tissus, notamment au niveau pulmonaire (McNeish et al., 2000). Par ailleurs, dans les CMLv de l'intima et de la média des lésions humaines ainsi que dans des modèles *in vitro* de CMLv intimaux, l'expression de ABCA1 est fortement diminuée par rapport aux CMLv des zones non lésées, entraînant une augmentation des esters de cholestérol intracellulaire et une diminution de l'efflux vers les ApoA-I. Ces données suggèrent que la transformation de ces cellules en cellules spumeuses est en partie due à une baisse de l'activité de ABCA1 et l'efflux de cholestérol (Choi et al., 2009).

L'inactivation totale de ABCA1, que ce soit dans un fond génétique LDLR^{-/-} ou ApoE^{-/-} et sous régime normal ou riche en cholestérol, entraîne une forte diminution des taux de HDL et de ApoA-1 circulantes et une forte augmentation de l'accumulation de lipides intracellulaires dans la plupart des tissus mais sans conséquence sur l'étendue ou la progression des lésions (Aiello et al., 2002). On observe en effet chez ces souris une diminution des taux de cholestérol et de VLDL qui permettrait de compenser la baisse des lipoprotéines antiathérogènes. A l'inverse, l'inactivation spécifique de ABCA1 dans les macrophages des souris ApoE^{-/-} ne perturbe pas le profil plasmatique des souris mais l'augmentation des lésions sur les aortes de ces animaux confirme le rôle athéroprotecteur de ABCA1 dans ce type cellulaire (Aiello et al., 2002).

La surexpression de ABCA1 chez la souris augmente le taux de HDL plasmatique et l'efflux de cholestérol des macrophages (Singaraja et al., 2001) et entraîne chez les souris ApoE^{-/-} (Singaraja et al., 2002) ou LDLR^{-/-} (Brunham et al., 2009) une diminution des lésions confirmant le rôle protecteur de ABCA1 contre l'athérosclérose. Cet effet protecteur a été observé également lorsque les souris ApoE^{-/-} sont traitées avec un composant naturel qui augmente l'expression endogène de ABCA1 (Xu et al., 2014).

Internalisation des lipoprotéines
par le LDLR et les SR.
Hydrolyse des esters au sein des
lysosomes.

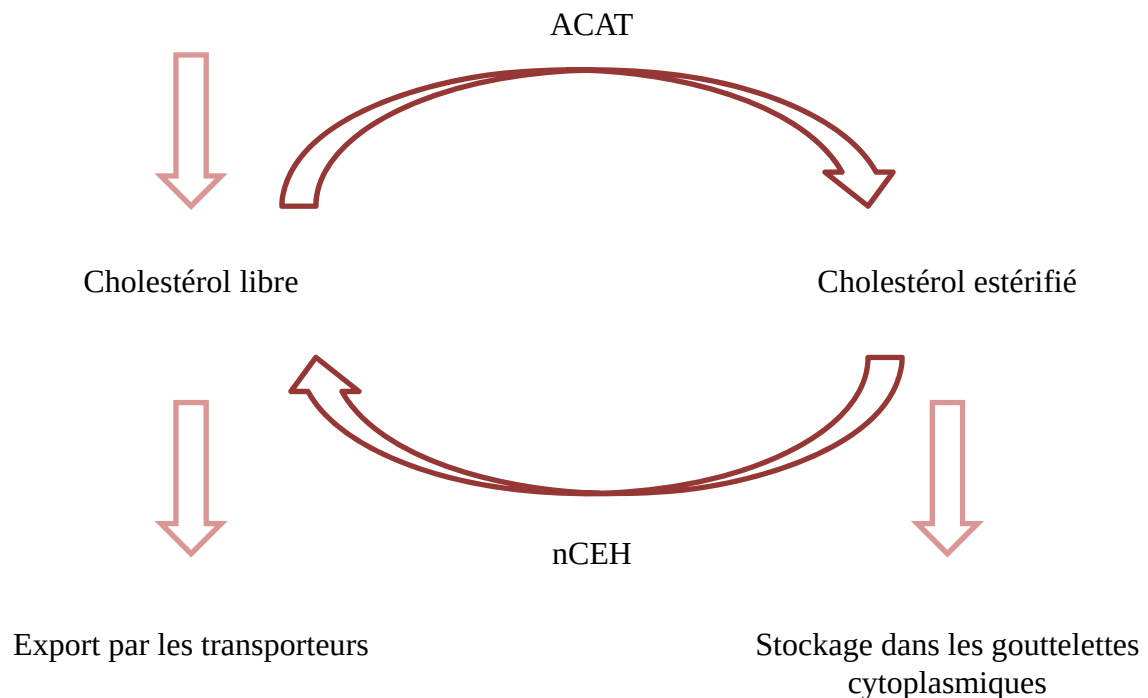


Figure 17 : L'estérification et l'hydrolyse du cholestérol. Le cholestérol passe de la forme estérifié à la forme libre grâce aux esters hydroxylase, et inversement grâce aux ACAT. Les lipoprotéines sont internalisées par les récepteurs aux LDL et les récepteurs scavengers puis les esters sont hydrolysés au sein des lysosomes. Le cholestérol libre en excès est réestérifié par les ACAT puis stocké. Pour être utilisé ou exporté, le cholestérol estérifié est d'abord hydrolysé par les nCEH. (D'après Chang, 2009 et Igarashi, 2010),

L'invalidation de ABCA1 spécifiquement dans le foie des souris ApoE^{-/-} entraîne une diminution du taux de HDL circulants, ce qui provoque une augmentation des lésions (Brunham et al., 2009).

o ABCG1

Contrairement aux souris ABCA1^{-/-}, l'invalidation de ABCG1 seule ou associée à l'invalidation de ABCG4, ABCA1, LDLR et ApoE, n'entraîne pas de modifications des taux de lipoprotéines circulantes (Westerterp et al., 2013).

L'invalidation totale de ABCG1 chez la souris conduit à une accumulation de cholestérol dans la plupart des tissus, et accroît la taille des lésions athéromateuses. (Kennedy et al., 2005; Out et al., 2007).

Les effets de l'invalidation de ABCG1 spécifiquement dans les macrophages de souris LDLR^{-/-} ou ApoE^{-/-} sont sujets à débat. Selon les études, ils entraînent une diminution de l'étendue des lésions (Baldán et al., 2006; Ranalletta et al., 2006), ou au contraire les augmentent (Lammers et al., 2009; Out et al., 2006). Il semblerait que l'absence de ABCG1 favorise l'apoptose des cellules ce qui limite la progression des plaques (Baldán et al., 2006). Cette hypothèse est corroborée par une étude qui montre que l'absence de ABCG1 est délétère dans les lésions précoces mais devient bénéfique dans les lésions tardives qui sont retardées par une augmentation de l'apoptose (Meurs et al., 2012). On observe également une surexpression de ABCA1 qui pourrait compenser l'absence de ABCG1 (Ranalletta et al., 2006).

Par ailleurs, ABCG1 protège indirectement de l'athérosclérose en préservant la fonction endothéliale. Il favorise l'export de cholestérol aux HDL au niveau de cellules endothéliales ce qui augmente l'activité de la eNOS. Le NO ainsi libéré va stimuler la relaxation de l'artère et son statut anti-thrombotique (Terasaka et al., 2010; Westerterp et al., 2010).

La double délétion ABCA1/ABCG1 dans les macrophages de souris LDLR^{-/-} conduit à une augmentation des lésions, plus importante que dans les simples KO, confirmant le rôle des deux transporteurs dans l'efflux de cholestérol et la protection contre l'athérosclérose (Out et al., 2008; Westerterp et al., 2013; Yvan-Charvet et al., 2007).

L'équilibre entre l'import et l'export de cholestérol est assuré par une régulation fine de l'expression, de la stabilité et de l'activité des récepteurs qui captent les lipoprotéines et des transporteurs qui exportent le cholestérol. Ces deux types de protéines sont donc indispensables au maintien de la quantité physiologique de cholestérol intracellulaire. Les perturbations de leur régulation ont des conséquences pathologiques notamment au niveau des cellules artérielles. Comme pour la synthèse endogène, le cholestérol lui-même et ses métabolites les oxystérols contrôlent ces régulations via les facteurs SREBP2 et LXR.

II.5.4 L'estérification et l'hydrolyse du cholestérol

On trouve deux pools de cholestérol mobilisables par la cellule : le pool de cholestérol libre membranaire et le pool de cholestérol estérifié. Le cholestérol passe ainsi continuellement de sa forme libre à sa forme estérifiée en fonction des compartiments où il se trouve et des rôles qu'il doit jouer au sein de la cellule. Ce changement de statut est assuré par des enzymes aux effets opposés : celles qui hydrolysent le cholestérol estérifié et celles qui estérifient le cholestérol libre (figure 17).

II.5.4.1 L'estérification du cholestérol intracellulaire

Chez les mammifères, l'estérification du cholestérol est réalisée par les enzymes ACAT1 et ACAT2 (Chang et al., 2009). Les substrats de ces transférases sont le cholestérol et l'acyl-CoA et les produits de la catalyse sont les esters de cholestérol et le CoA.

Chez l'Homme, ACAT1 est exprimée dans le foie, les surrénales, les reins et par les macrophages mais absente dans l'intestin. Elle est responsable de l'estérification du cholestérol en vue de son stockage sous forme de gouttelettes cytoplasmique, ainsi que de la production des esters composants les VLDL. ACAT2 prédomine au niveau de l'intestin et est également exprimée dans le foie (Chang et al., 2000; Lee et al., 1998), à des niveaux d'expression variables selon les individus et les conditions physiologiques (Parini et al., 2009; Smith et al., 2004). Chez la souris c'est ACAT2 et non ACAT1 qui est majoritaire dans le foie (Willner et al., 2003). ACAT2 est responsable de l'estérification du cholestérol hépatique pour le stockage et pour la constitution des lipoprotéines riches en ApoE (Temel et al., 2007). L'expression et l'activité des ACAT sont stimulées par le cholestérol libre exogène, les LDL et les oxystérols (Uelmen et al., 1995).

Les ACAT sont associées au développement de l'athérosclérose, notamment lors de la différenciation des monocytes en macrophages. En conditions physiologiques, ACAT1 est retrouvée dans les monocytes non différenciés mais ACAT2 en est absente. En conditions pathologiques, dans les macrophages différenciés des lésions athéromateuses, l'expression de ACAT1 est fortement augmentée et ACAT2 est retrouvée en quantité significative (Miyazaki et al., 1998; Sakashita et al., 2003). Compte tenu de la forte accumulation de cholestérol dans ces cellules, associée à une baisse de l'efflux, l'activation du processus de stockage par les ACAT n'est pas surprenante.

II.5.4.2 L'hydrolyse des esters de cholestérol

Lorsque la cellule a un besoin rapide de cholestérol, les enzymes de la famille des nCEH (neutral Cholesteryl Esters Hydrolase) hydrolysent les esters de cholestérol. Dans les macrophages, l'HSL (*Hormone-Sensitive Lipase*), la CEH (*Cholesterol Ester Hydrolase*) et la NCEH1 (*Neutral Cholesterol Ester Hydrolase 1*) ont ce rôle (Igarashi et al., 2010).

De part son rôle initiateur dans l'efflux du cholestérol, l'effet des nCEH, particulièrement dans les macrophages, est antiathérogène. Cela a été montré par des expériences de délétions totales et tissu-spécifiques qui conduisent à une transformation des macrophages en cellules spumeuses. En effet, le traitement par des LDLac de macrophages péritonéaux issus de souris invalidées pour NCEH1 entraîne une diminution de l'efflux de cholestérol et en conséquence une augmentation de son stockage sous forme d'esters. Logiquement, les souris ApoE^{-/-} invalidées pour NCEH1 présentent une étendue de la surface des lésions plus importante que les contrôles, tout comme les souris LDLR^{-/-} lorsque NCEH1 ou HSL sont invalidées spécifiquement dans les macrophages (Sekiya et al., 2009, 2011). Les lésions sont enrichies en esters de cholestérol comme en cholestérol libre, et ce sans modification des paramètres métaboliques tels que les taux plasmatiques de cholestérol, de triglycérides et de glucose.

La double délétion de NCEH1 et HSL chez la souris montre que les deux enzymes sont responsables de 90% de l'activité nCEH des cellules et que la contribution de NCEH1 dans l'hydrolyse du cholestérol est majoritaire (Sekiya et al., 2009). Contrairement à la double délétion de ABCA1 et ABCG1 qui inhibe complètement l'efflux, celle de NCEH1 et HSL ne diminue l'efflux de cholestérol que de 30 à 40%. Ceci s'explique par le fait que l'hydrolyse des esters ne mobilise que le pool de cholestérol estérifié et n'affecte pas la mobilisation du pool de cholestérol libre membranaire qui peut toujours être exporté.

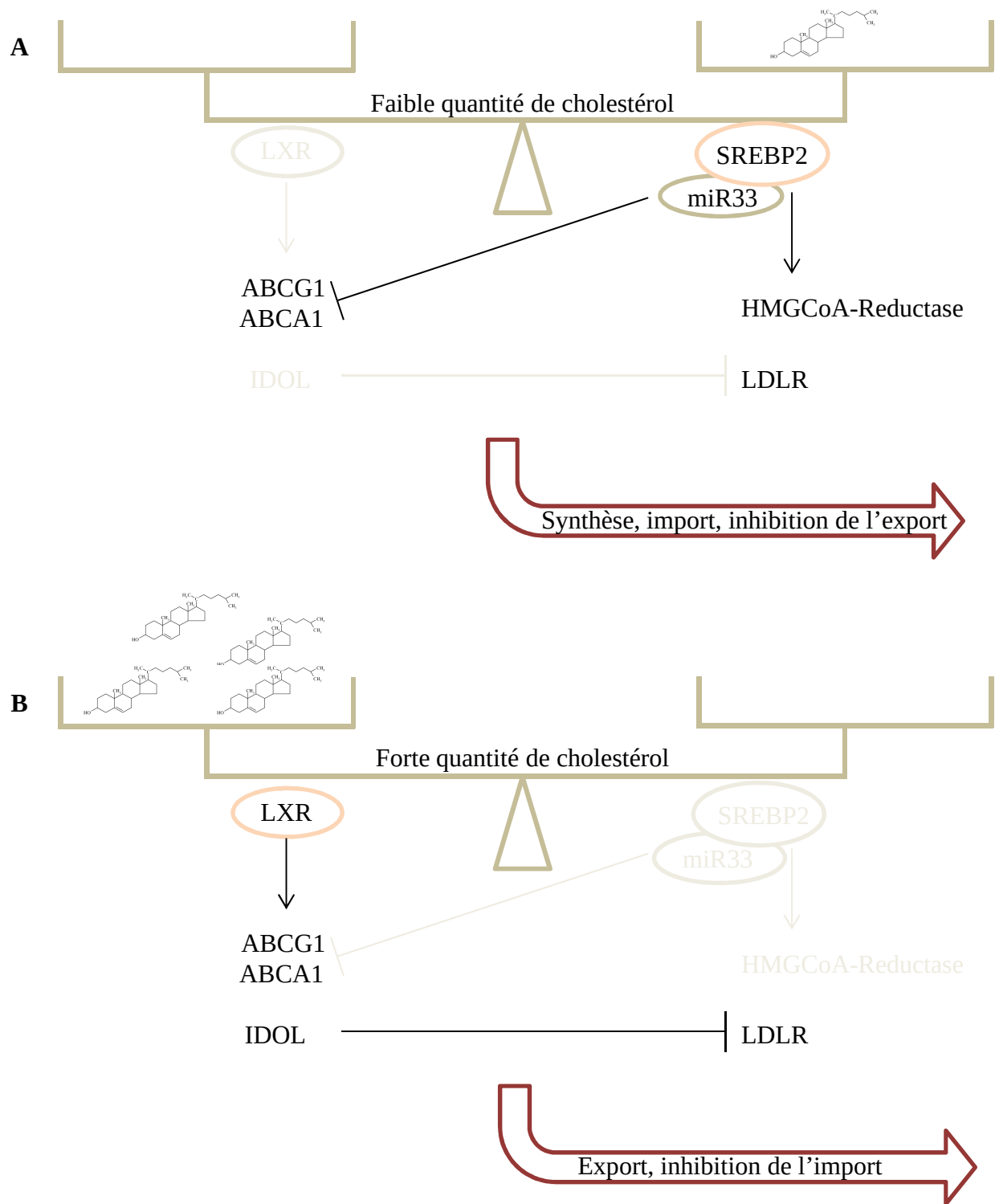


Figure 18 : Résumé de la régulation de l'homéostasie du cholestérol par SREBP2 et LXR. A. Lorsque le taux de cholestérol est faible, la translocation nucléaire de SREBP2 permet d'activer la synthèse endogène et l'import et de l'inhiber l'efflux grâce au miR33. **B.** Lorsque le taux de cholestérol est élevé, les métabolites oxydés du cholestérol activent les LXR qui permettent la stimulation de l'efflux et l'inhibition de l'import.

II.5.5 L'élimination du cholestérol

Le cholestérol est ramené par les HDL vers le foie, les hépatocytes étant les seules cellules capables de le transformer. Là, les LXR contrôlent la synthèse des acides biliaires par l'activation transcriptionnelle de l'enzyme Cyp7a1 (Chiang et al., 2001) qui assurent la conversion du cholestérol en acides biliaires primaires : l'acide cholique et l'acide chénodéoxycholique (Russell, 2003). Les acides biliaires sont à la fois le mode d'élimination du cholestérol et des molécules actives qui participent entre autre à la digestion des aliments. Excrétés par les hépatocytes et stockés dans la vésicule biliaire, ils sont déversés en partie sous forme de sels biliaires dans le duodénum au cours du repas, facilitent l'action des enzymes digestives et le passage des composés lipidiques à travers la barrière intestinale. La majorité des acides biliaires sont ensuite réabsorbés et recyclés et une petite partie est éliminée dans les selles (Hofmann, 1999).

Le cholestérol ne pouvant être stocké que sous forme estérifié et exporté sous forme libre, deux groupes d'enzymes sont chargés du passage continu d'un état à un autre, les ACAT et les nCEH. Dans l'athérosclérose, l'efflux étant moins efficace, l'estérification est plus sollicitée pour faire face à l'accumulation de cholestérol.

La production du cholestérol et la régulation de son métabolisme sont des processus physiologiques essentiels au maintien de l'intégrité des cellules, et plus généralement à la préservation de l'organisme en bonne santé. Nous avons vu que cette régulation très complexe intervient à tous les niveaux pour chacune des protéines impliquées, grâce notamment aux facteurs de transcription SREBP2 et LXR (figure 18). Les dyslipidémies causées par des défauts dans cette régulation sont à l'origine de phénomènes pathologiques tels que l'athérosclérose. La nécessité de disséquer les mécanismes moléculaires de l'homéostasie du cholestérol et de ses dysfonctionnements est évidente au vu des conséquences dramatiques de l'athérosclérose et de ses complications cliniques sur la santé au niveau mondial. Dans ce contexte, notre équipe de recherche étudie depuis de nombreuses années sur un des acteurs de ce métabolisme : le récepteur LRP1. Un modèle de souris invalidée pour LRP1 spécifiquement dans les cellules musculaires lisses a permis de mettre en évidence le rôle athéroprotecteur de LRP1, et nous nous attachons depuis à en caractériser les mécanismes.

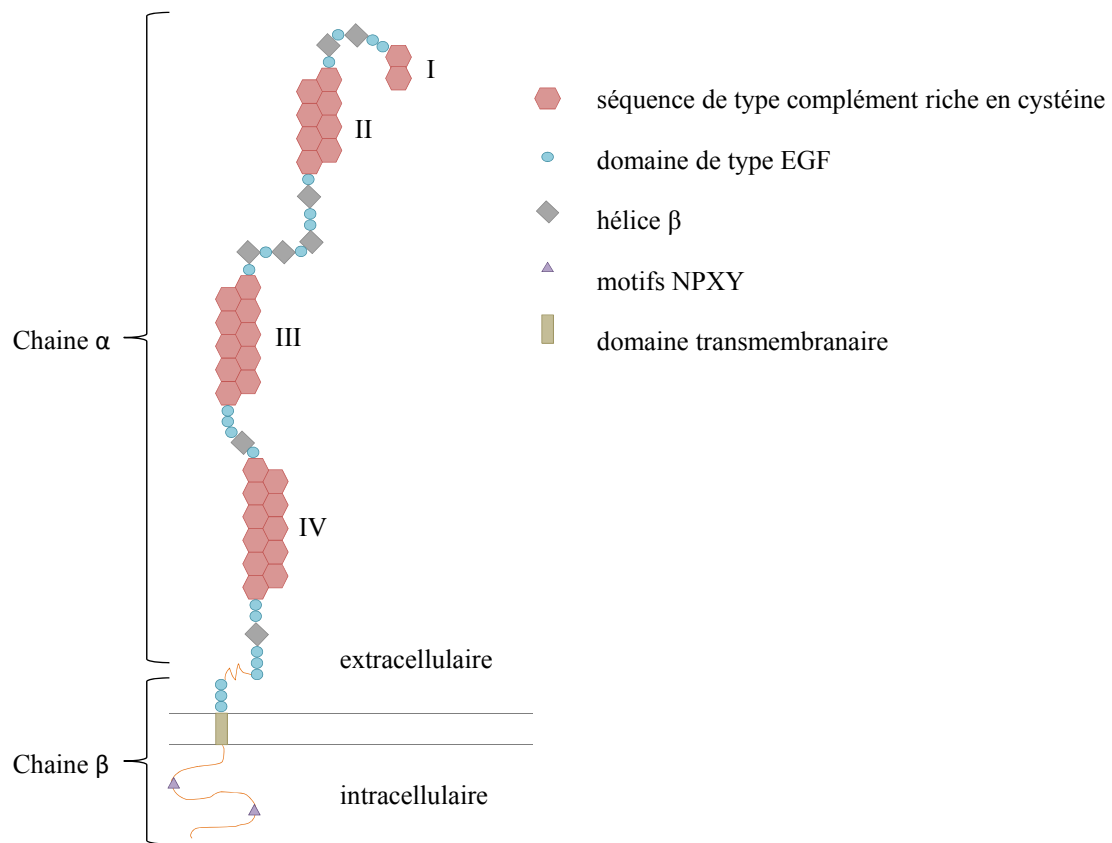


Figure 19 : Structure du récepteur LRP1. Le domaine extracellulaire de LRP1 est impliqué dans la liaison des ligands et le domaine cytoplasmique porte des sites NPXY impliqués dans l'initiation de voies de signalisation cellulaire (d'après Boucher et Herz, 2011).

III. Rôles de LRP1 dans l'athérosclérose

III.1 Généralités sur LRP1

III.1.1 Structure

Le récepteur LRP1, plus grand récepteur de la famille des récepteurs aux LDL, a été découvert par l'équipe de J. Herz en 1988 (Herz et al., 1988). C'est une protéine dont le précurseur de 600kDa est synthétisé dans le RE des cellules, puis clivé par une furine-convertase au niveau de l'appareil de Golgi, en une sous unité α de 515kDa et une sous unité β de 85kDa (Herz et al., 1990; Willnow et al., 1996), liées de manière non covalente. La sous unité α est entièrement extracellulaire tandis que la sous unité β contient un domaine extracellulaire, le domaine transmembranaire et le domaine intra-cytoplasmique (figure 19).

L'extrémité N-terminale de LRP1 est située dans le compartiment extracellulaire et est organisée en 4 grands domaines ou clusters, numérotés de I à IV, composés d'un nombre variable de séquences répétées de type complément riches en cystéines (CR). Ces domaines ont été identifiés comme étant les sites de liaisons aux ligands, les domaines II et IV étant les sites préférentiels (Herz and Strickland, 2001; Neels et al., 1999). Entre ces 4 domaines, on trouve des domaines d'homologie au précurseur de l'EGF consistant en des successions de domaines de type EGF, riches en cystéines et encadrant des motifs YWTD repliés en hélice β . La délétion de ces domaines dans les récepteurs aux LDL et aux VLDL, membre de la même famille que LRP1, indique qu'ils semblent nécessaires à l'endocytose des ligands (Davis et al., 1987; Mikhailenko et al., 1999).

LRP1, comme tous les membres de sa famille, possède un seul domaine transmembranaire. Son domaine C-terminal intracellulaire est composé de 100 acides aminés, et comporte deux motifs NPXY et deux motifs dileucine LL. Le motif NPXY proximal semble important pour la synthèse et la maturation de la protéine LRP1, tandis que la mutation du motif distal perturbe l'internalisation des ligands (Reekmans et al., 2010). Les deux motifs NPXY sont susceptibles d'être phosphorylés au niveau de la tyrosine et d'interagir avec des protéines cytoplasmiques contenant un domaine PTB (*phosphotyrosine binding*). La partie cytoplasmique du récepteur peut également lier des protéines adaptatrices impliquées dans le trafic vésiculaire et la signalisation cellulaire (Lillis et al., 2008).

III.1.2 Régulation transcriptionnelle

Chez l'Homme, LRP1 est plus fortement exprimé dans les hépatocytes (Herz et al., 1988), les neurones et les astrocytes, les cellules épithéliales de l'intestin, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les macrophages, les cellules de Leydig, les cellules de la granulosa et les cellules interstitielles du rein (Moestrup et al., 1992).

La complexité de la régulation de l'expression du gène codant LRP1 par des facteurs hormonaux et des facteurs de croissance a été bien résumée dans une récente revue (Emonard et al., 2014). Contrairement au LDLR, le promoteur du gène LRP1 ne possède pas de TATA box ni de séquence SRE (Kütt et al., 1989), mais un site SRE a été identifié dans la région 5' non traduite du gène (Gaëta et al., 1994). Les facteurs de transcription Sp1 et NRF-1 (*Nuclear Respiratory Factor*) se fixent sur ce site et induisent la transcription du gène.

Au niveau des cellules vasculaires, l'expression de LRP1 est modulée indirectement par le cholestérol. En effet, l'absorption de LDL agrégés (LDLag) par LRP1 conduit à une augmentation de la quantité de cholestérol dans ces cellules, qui exerce son effet inhibiteur sur la translocation de SREBP2. Cette inhibition est associée à une augmentation de l'expression de LRP1 dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Llorente-Cortés et al., 2006), les cardiomyocytes (Cal et al., 2012) et les macrophages (Llorente-Cortés et al., 2007). La présence du site SRE en 5' non traduit est nécessaire à cette régulation négative par SREBP2.

III.1.3 Régulation post-transcriptionnelle

Une protéine chaperonne joue un rôle indispensable dans la régulation post-traductionnelle de LRP1, c'est la protéine RAP (*Receptor Associated Protein*). La fixation d'un ligand à LRP1 au cours de sa synthèse ou de son transport à la membrane induirait la dégradation du récepteur. Pour empêcher cela, RAP se fixe au récepteur et inhibe la fixation d'autres ligands, permettant sa maturation et son adressage membranaire de LRP1 (Herz et al., 1991; Williams et al., 1992). Chez les souris déficientes en RAP, l'expression d'un LRP1 mature et fonctionnel est grandement altérée (Willnow et al., 1995). Dans un grand nombre d'études portant sur l'identification de fonctions de LRP1, la protéine RAP est utilisée comme antagoniste du récepteur afin de valider l'implication de LRP1 dans le phénomène observé.

Le récepteur LRP1 porte des glycosylations, qui sont sur des sites différents selon les tissus (May et al., 2003). La glycosylation jouant habituellement un rôle stabilisateur de la protéine, les auteurs supposent que ces modifications permettent d'adapter le taux de

dégradation du récepteur en fonction du tissu concerné et donc du rôle physiologique du récepteur.

Comme les autres récepteurs de la famille des récepteurs aux LDL, LRP1 est retrouvé localisé au niveau des cavéoles, zones favorables à l'initiation de voies de signalisation cellulaire (Boucher et al., 2002; Kanai et al., 2014; Wu and Gonias, 2005; Zhang et al., 2004).

III.2 Rôles physiologiques de LRP1

L'invalidation totale de LRP1 chez la souris étant létale au stade embryonnaire, les études visant à caractériser sa fonction ont été réalisées sur des modèles d'invalidation tissu-spécifique (Herz et al., 1992, 1993). C'est un récepteur multifonctionnel qui possède 2 grandes propriétés : l'endocytose de ses ligands et la modulation de voies de signalisations cellulaires (Lillis et al., 2008; Strickland et al., 1990).

III.2.1 LRP1, récepteur à endocytose

L'implication de LRP1 dans la captation hépatique des lipoprotéines était brièvement évoquée dans le chapitre II.4. En effet, le LRP1 hépatique reconnaît et lie les apolipoprotéines ApoE portées par les chylomicrons, les remnants, les VLDL et les IDL qui sont alors internalisées et éliminées de la circulation (Beisiegel et al., 1989; Kowal et al., 1989; Rohlmann et al., 1998; Willnow et al., 1995). Au niveau des CMLv (Llorente-Cortés et al., 2000) et des macrophages (Llorente-Cortés et al., 2007), LRP1 assure par ailleurs l'absorption des LDLag.

L'utilisation de souris invalidées pour le récepteur spécifiquement dans le foie a montré qu'il était également responsable de l'élimination du facteur VIII et de son cofacteur le facteur von Willebrand de la circulation (Bovenschen et al., 2003). Le LRP1 hépatique joue également un rôle important dans l'élimination de nombreuses protéases et de leurs inhibiteurs (Yamamoto et al., 2015). C'est par exemple le cas pour les complexes MMP9-TIMP1 (*Matrix MetalloProteinase – Tissue Inhibitor of Metalloproteinases*) (Hahn-Dantona et al., 2001), MMP2-thrombospondin (Yang et al., 2001) ou encore MMP-TIMP2 (Emonard et al., 2005).

Dans le cerveau, LRP1 est exprimé par plusieurs types cellulaires : les astrocytes, les neurones, les CMLv, et en plus faible quantité dans les cellules endothéliales. Il a été montré que, grâce à son activité d'endocytose, le récepteur participe à la régulation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). En effet, le tPA (*tissue-type plasminogen*

activator) augmente cette perméabilité après une ischémie cérébrale et cet effet est dépendant de LRP1 puisqu'il est inhibé lorsque le récepteur est bloqué par un antagoniste (Gosselet et al., 2009; Polavarapu et al., 2007; Yepes et al., 2003; Zhao et al., 2016). Par ailleurs, il assure le transport de l'amyloid- β au travers de la BHE (Kanekiyo and Bu, 2014; Sagare et al., 2007) et contribue ainsi à la clairance de ce peptide dont l'accumulation est observée dans la maladie d'Alzheimer. (Candela et al., 2015).

III.2.2 LRP1, modulateur de voies de signalisation cellulaire.

Les domaines extra et intracellulaire de LRP1 sont tous deux impliqués dans l'initiation et le contrôle de voies de signalisation cellulaire. Son domaine extracellulaire fixe en effet des ligands tels que des facteurs de croissance qui stimulent ou inhibent la croissance cellulaire, tandis que les motifs NPxY du domaine cytoplasmique fixent des protéines adaptatrices impliquées dans l'activation de voies des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinases*) régulant la migration, la prolifération et l'adhésion cellulaire (Boucher and Gotthardt, 2004; Gotthardt et al., 2000).

LRP1 a par exemple été identifié comme étant le récepteur V au TGF β (TGFR-V). Il colocalise avec les TGFR-I, R-II et R-III, qui présentent des affinités pour le TGF β 1, et son expression est requise pour l'inhibition de la croissance cellulaire par le TGF β 1 (Huang et al., 2003; Tseng et al., 2004). Il est également identique au récepteur initialement identifié comme récepteur au IGFBP3 (*Insulin-like growth factor-binding protein 3*) qui agit aussi pour inhiber la prolifération cellulaire (Leal et al., 1997).

Le PDGF-BB se lie au LRP1 et induit la phosphorylation de son motif NPxY C-ter par une tyrosine kinase Src. L'activation du récepteur au PDGF (PDGFR β) est nécessaire à cette phosphorylation qui entraîne l'interaction de LRP1 avec le domaine PTB (*phospho-tyrosine binding*) de la protéine adaptatrice Shc, importante pour l'activation des voies Ras/MAPK et c-Myc notamment (Loukinova et al., 2002). Cette phosphorylation a lieu au niveau des cavéoles membranaires et implique également la PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) (Boucher et al., 2002).

LRP1 forme également un complexe avec le récepteur à l'IGF-1 et il est nécessaire à la phosphorylation de ShcA en réponse à l'IGF-1. Ceci aboutit à l'activation de la voie Ras/MAPK sous-jacente et à la prolifération cellulaire (Woldt et al., 2011).

La répartition tissulaire de LRP1 et ses propriétés d'endocytose et de signalisation l'impliquent dans de nombreux processus physiologiques, allant du métabolisme des lipoprotéines à la régulation de la migration et de la prolifération cellulaire ou l'homéostasie des protéines matricielles.

III.3 LRP1 dans l'athérosclérose

L'athérosclérose est une pathologie complexe qui implique des phénomènes inflammatoires et de remodelage vasculaire, des perturbations de l'hémostase et de la régulation du métabolisme lipidique. Par son rôle multifonctionnel, LRP1 est impliqué dans ces phénomènes et les études de son invalidation dans les différents types cellulaires présents dans les lésions ont révélé que son expression a un effet protecteur contre la maladie.

III.3.1 Le LRP1 hépatique : un rôle athéroprotecteur indirect

Les propriétés d'endocytose du LRP1 confèrent au récepteur hépatique un rôle dans la protection contre l'athérosclérose, comme l'a notamment montré une étude sur des souris ayant un fond génétique LDLR^{-/-} et ApoE^{-/-} et invalidées pour LRP1 spécifiquement au niveau du foie (Espirito Santo et al., 2004). Par rapport aux souris LDLR^{-/-} ApoE^{-/-}, ces souris présentent une augmentation de l'athérosclérose malgré une diminution des taux de cholestérol et de triglycérides plasmatiques. On observe en revanche une augmentation des taux sanguins des facteurs de coagulation facteur VIII et facteur von Willebrand, impliqués dans la formation de thrombus au niveau des lésions, qui accroissent leur taille. Ceci indique que le LRP1 hépatique participe au maintien de faibles taux plasmatiques de ces facteurs de coagulation et que cette fonction protège de l'athérosclérose, indépendamment du taux de lipoprotéines.

Plus récemment, le rôle du LRP1 hépatique dans le métabolisme des HDL a été étudié et il semble qu'il soit impliqué dans la synthèse de ces particules antiathérogènes. En effet, dans des souris invalidées pour LRP1 dans le foie, on observe une diminution de la synthèse des HDL associée à une diminution de la localisation membranaire de ABCA1 (Basford et al., 2011). Plus en détail, les hépatocytes déficients en LRP1 ne fixent plus la cathepsine D, protéase qui assure normalement la maturation de la proasposine, étape nécessaire à la translocation membranaire de ABCA1 (Haidar et al., 2006), et donc à l'efflux de cholestérol vers les HDL.

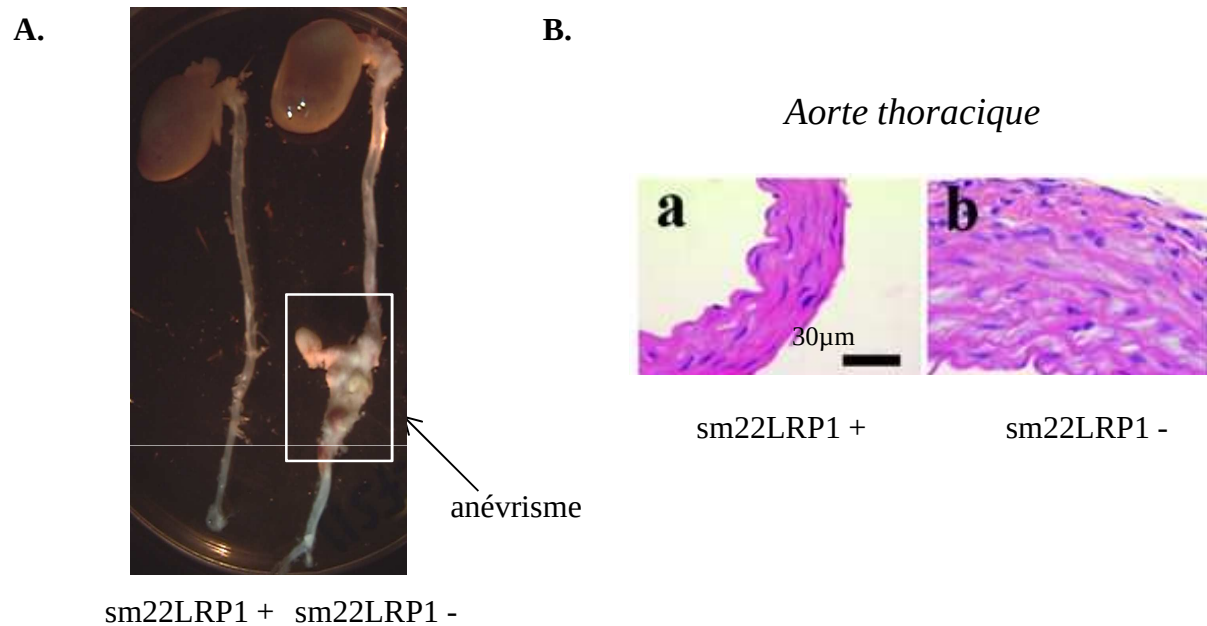


Figure 20 : L'invalidation de LRP1 spécifiquement dans les CMLv des souris LDLR-/- entraîne une augmentation de l'athérosclérose. A. Aortes entières des souris sm22LRP1+ et sm22LRP1- après deux mois de régime Paigen montrant une élévation et la présence d'anévrismes chez les souris sm22LRP1-. **B.** Coloration H&E montrant une hyperplasie de la paroi des aortes des souris sm22LRP1- âgées de 12 semaines (Boucher et al., 2003).

III.3.2 LRP1 dans les macrophages

Plusieurs études ont été réalisées sur des macrophages en culture et elles désignent LRP1 comme responsable de l'internalisation de LDL agrégées et donc impliqué dans la formation des cellules spumeuses (Lillis et al., 2015; Llorente-Cortés et al., 2007; Watanabe et al., 1994). D'ailleurs, sous l'effet d'un traitement avec des LDL modifiées, ainsi qu'au cours de la transition monocyte/macrophage stimulée par le M-CSF, l'expression de LRP1 est induite dans ces cellules (Watanabe et al., 1994).

Paradoxalement, l'expression de LRP1 dans les macrophages se révèle protectrice contre l'athérosclérose. En effet, l'invalidation de LRP1 dans les macrophages de souris ApoE^{-/-} et LDLR^{-/-} ne modifie pas les taux de cholestérol, triglycérides et lipoprotéines circulants mais conduit à une augmentation de l'athérosclérose due à un enrichissement des lésions en collagène (Hu et al., 2006). Les auteurs concluent que le LRP1 macrophagique protège de l'athérosclérose notamment par un contrôle de l'expression de protéines matricielles. Dans des souris invalidées pour le LRP1 macrophagique et ayant un fond LDLR^{-/-} uniquement, Overton et ses collaborateurs concluent à un rôle athéroprotecteur de LRP1 par modulation de l'inflammation (Overton et al., 2007). Ils montrent que la suppression de LRP1 dans les macrophages entraîne une augmentation de TNF α et de MCP-1. Le taux de MMP-9 est également augmenté, ce qui n'est pas le cas dans la première étude, et entraîne la rupture des lames élastiques.

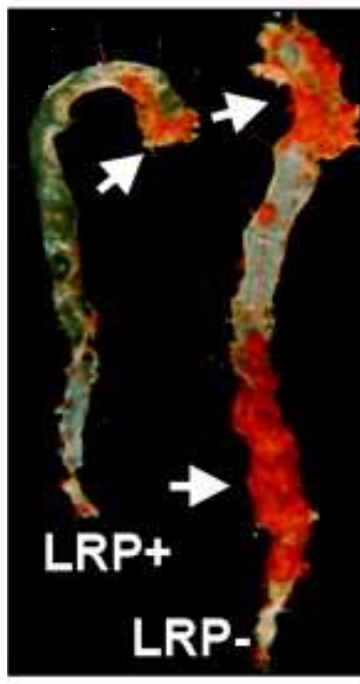
III.3.3 LRP1 dans les CMLv

III.3.3.1 LRP1 contrôle la prolifération et la migration des CMLv

Un des phénomènes caractéristiques de l'athérosclérose est la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de la média dans l'espace sous-endothélial et récemment, la contribution de ce type cellulaire dans la formation des cellules spumeuses a été réévaluée à la hausse (Allahverdian et al., 2014; Doran et al., 2008).

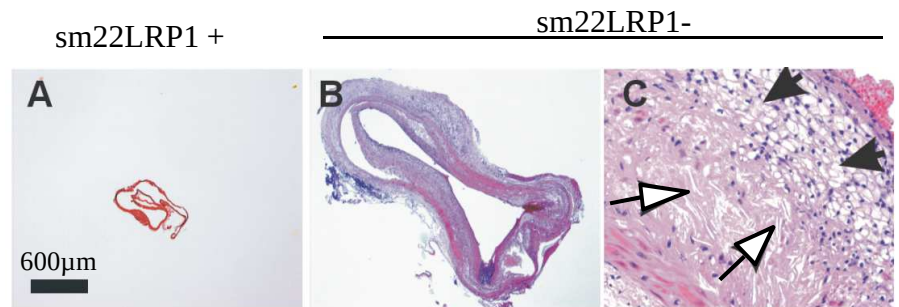
In vitro, il avait été montré que l'activation de la voie PDGF-BB stimule la prolifération des CML et que cet effet était inhibé par la fixation de ApoE sur LRP1 (Ishigami et al., 1998; Swertfeger et al., 2002). Ces études ont servi de support à l'hypothèse d'un rôle protecteur du LRP1 des CMLv dans l'athérosclérose, par son contrôle de la voie PDGF et probablement d'autres facteurs pro-prolifératifs. De là ont été générées les souris LDLR^{-/-} invalidées pour LRP1 spécifiquement dans les CML (sm22LRP1⁻) (Boucher et al., 2003).

A



B

Aorte abdominale



C

Cholestérol total

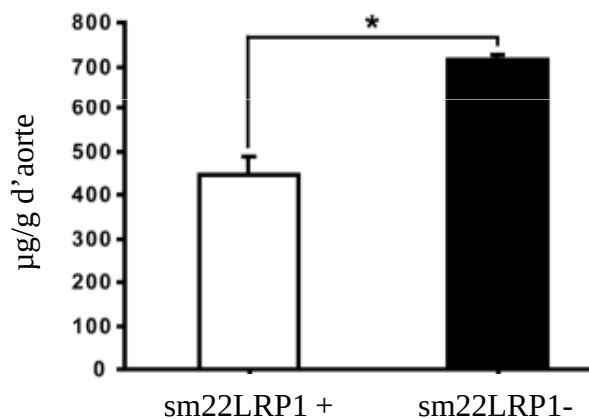


Figure 21 : L'invalidation de LRP1 spécifiquement dans les CMLv des souris LDLR-/- entraîne une augmentation de la quantité de cholestérol. A. Coloration au Sudan IV des coupes en face des aortes des souris sm22LRP1+ et sm22LRP1- après deux mois de régime Paigen montrant l'étendue des lésions athéromateuses. **B.** Coloration H&E montrant une hyperplasie de la paroi des aortes des souris sm22LRP1-, la présence de cellules spumeuses (flèches noires) et de cristaux de cholestérol (flèches blanches). (Boucher et al., 2003) **C.** Dosage de la quantité de cholestérol total dans les aortes des souris sm22LRP1+ et sm22LRP1-. (Zhou et al., 2009b).

Chez ces animaux, l'absence de LRP1 ne modifie pas les taux de cholestérol et de triglycérides circulants par rapport aux souris LDLR^{-/-}. Après un régime Paigen, les souris sm22LRP1⁻ présentent une hypertrophie des aortes, un épaississement de la paroi artérielle, une altération des lames élastiques de la média, des anévrismes et une augmentation du nombre de lésions athéromateuses (figure 20).

On observe une augmentation des taux de MMP-2 et MMP-9 au sein des aortes. Ces métalloprotéases étant des ligands de LRP1, en son absence, les CMLv ne peuvent plus les internaliser. Cette accumulation de MMP a été associée à la présence d'anévrismes de l'aorte abdominale chez l'Homme (Crowther et al., 2000; Saito et al., 2002).

L'hyperplasie de la paroi aortique est provoquée par une prolifération accrue des CMLv, qui a été attribuée à une forte suractivation de la voie PDGF dans les CMLv. Dans ces cellules, l'expression et la phosphorylation de récepteur au PDGF (PDGFR β) est fortement augmentée, ainsi que la phosphorylation de l'effecteur sous-jacent Erk1/2. L'ajout d'un inhibiteur de tyrosine-kinase (Gleevec) au régime Paigen prévient l'apparition des lésions et confirme que l'activation de la voie pro-proliférative du PDGFR β est en partie responsable du phénotype observé (Boucher et al., 2003). D'ailleurs, les souris sm22LRP1⁻ exprimant le LDLR et sous régime normal ne présentent pas de lésions mais une hyperplasie des aortes et la suractivation de la voie du PDGFR β (Zhou et al., 2009a). Cela signifie que LRP1 contrôle la prolifération des CMLv et la structure des vaisseaux en contrôlant l'activation du PDGFR β , et ceci indépendamment du profil plasmatique. La phosphorylation du PDGFR β est assurée notamment par la PI3K (DeMali et al., 1997) et dans cette étude, les auteurs ont montré que LRP1 limite la fixation de la PI3K sur le PDGFR β et donc l'activation de la voie PDGFR β /PI3K.

Le phénotype des souris sm22LRP1⁻ présente des similarités avec ce qui est observé dans le syndrome de Marfan, maladie génétique caractérisée par une activation anormale de la signalisation TGF β entraînant une fragmentation des lames élastiques, une elongation de l'aorte et des anévrismes (Boileau et al., 2005). En effet, il a été montré qu'une suractivation de la voie TGF β avec accumulation de Smad2/3 phosphorylée en absence de LRP1 était à l'origine de la rupture des lames élastiques et de la distension de l'aorte (Boucher et al., 2007). Ce phénotype peut être reversé par l'administration de rosiglitazone, un agoniste du récepteur nucléaire PPAR γ connu pour inhiber l'activation de TGF β , confirmant le rôle de la signalisation TGF β dans ce « Marfan-like syndrome » (Boucher et al., 2007). Par ailleurs, cette étude démontre que la perte de contrôle de la voie TGF β en absence de LRP1 résulte en

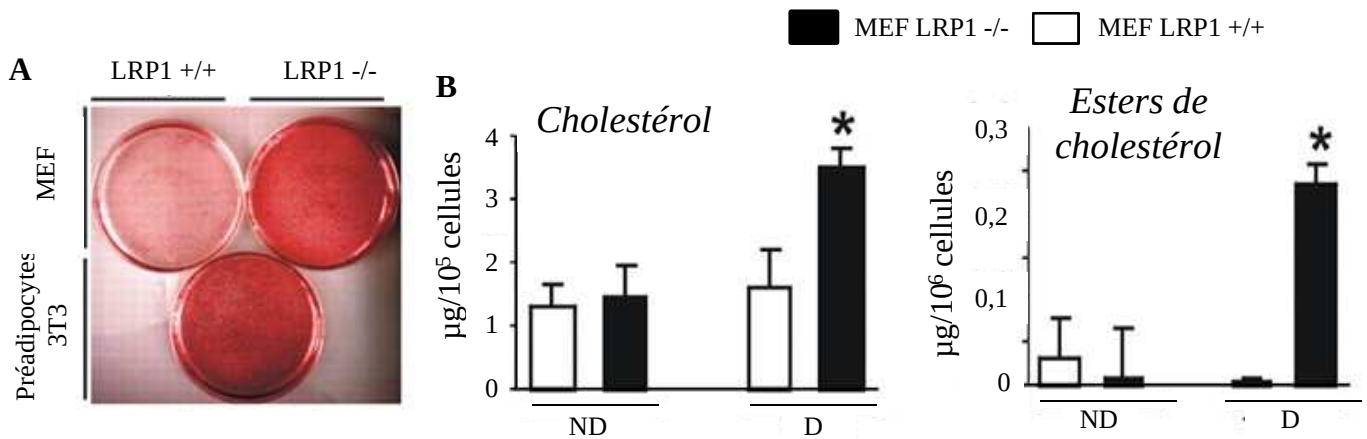


Figure 22 : Les MEF déficientes en LRP1 accumulent plus de cholestérol que les sauvages. A. Les MEF sauvages et déficientes en LRP1 ainsi que des préadipocytes 3T3 ont été traitées 10 jours avec un cocktail de différenciation adipogénique puis colorées à l'huile rouge qui marque les lipides neutres. B. Dosage du cholestérol et des esters de cholestérol dans les MEF LRP1+/+ et LRP1-/- avant (ND : non différenciées) et après 10 jours de différenciation adipogénique (D : différenciées). (Terrand et al., 2009).

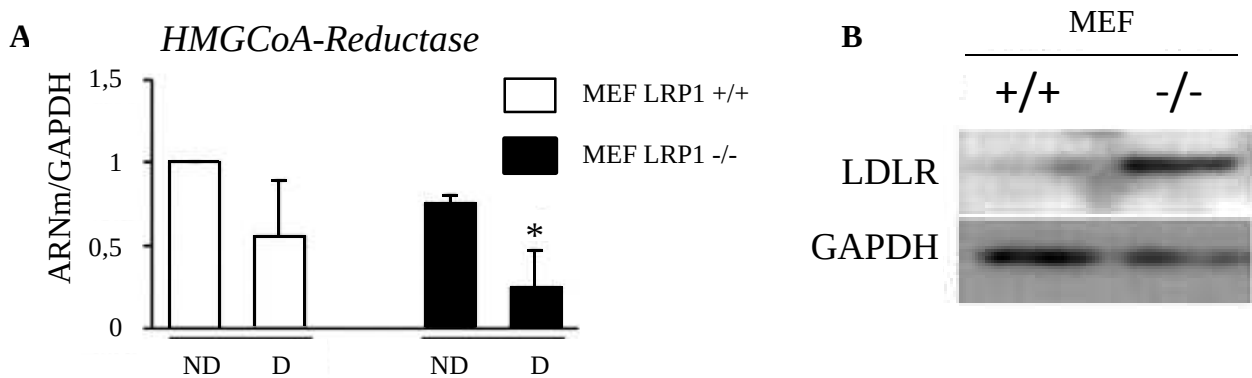


Figure 23 : L'augmentation de cholestérol dans les MEF LRP1-/- est due à une augmentation de l'import. A. L'expression de l'HMGCœA-Reductase est diminuée dans les MEF déficientes en LRP1. Mesure de la quantité d'ARNm de l'HMGCœA-Reductase dans les MEF LRP1+/+ et LRP1-/- avant (ND : non différenciées) et après 10 jours de différenciation adipogénique (D : différenciées). B. L'expression du récepteur aux LDL est augmentée dans les MEF déficientes en LRP1. Mesure de la quantité de protéine LDLR dans les MEF LRP1+/+ et LRP1-/- après 10 jours de différenciation adipogénique. (Terrand et al., 2009).

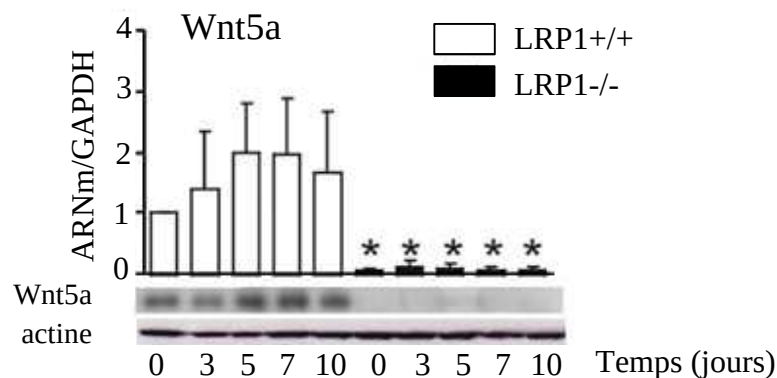


Figure 24 : L'expression de Wnt5a est indétectable dans les MEF déficientes en LRP1. Mesure des niveaux d'ARNm et de protéine Wnt5a dans les MEF sauvages (+/+) et déficiences en LRP1 (-/-) au cours de la différenciation adipogénique. (Terrand et al., 2009).

une activation de la voie PDGFR β , qui est une cible de Smad2/3, et révèle l'interaction entre les deux voies.

III.3.3.2 LRP1 limite l'accumulation de cholestérol dans les CMLv

Les colorations des aortes au Sudan IV ont montré une accumulation de lipides au sein des lésions athéromateuses des souris sm22LRP1- (figure 21.A) et l'analyse histologique des lésions a révélé qu'elles étaient enrichies en cellules spumeuses (figure 21.B) (Boucher et al., 2003). Des structures qui s'apparentent à des cristaux de cholestérol sont également observées sur les colorations histologiques. De plus, le dosage des quantités de cholestérol et d'esters de cholestérol a révélé qu'elles étaient augmentées dans les zones saines des aortes des souris sm22LRP1- (figure 21.C) et dans les CMLv en culture primaire (Zhou et al., 2009b). Cet effet est à priori contradictoire avec l'absence de deux principaux récepteurs responsables de l'internalisation des lipoprotéines LRP1 et LDLR. L'hypothèse de l'implication de LRP1 dans une ou plusieurs voies de signalisation régulant le métabolisme du cholestérol a alors été posée.

La diminution de l'expression de ABCA1 observée dans les aortes des souris sm22LRP1- étaye cette hypothèse (Zhou et al., 2009b). Le mécanisme de cette diminution a été expliqué en utilisant des cultures primaires des CMLv issues de ces souris (Zhou et al., 2009b) : il a été observé dans ces cellules une suractivation de la cPLA2 (*phospholipase cytosolique A2*), ce qui entraîne la libération d'acide arachidonique. Or cet acide gras exerce un effet inhibiteur sur les LXR (Ou et al., 2001; Yoshikawa et al., 2002), principaux activateurs de l'expression de ABCA1.

Une étude du laboratoire a mis en évidence l'implication d'une protéine sécrétée Wnt5a (*Wingless-type MMTV integration site*) dans l'effet protecteur de LRP1 contre l'accumulation de cholestérol (Terrand et al., 2009). Dans cette étude, les auteurs ont traité des MEF (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) déficientes en LRP1 (MEF LRP1 $^{-/-}$) et des MEF sauvages (LRP1 $^{+/+}$) avec à un cocktail de différenciation adipogénique. Ce cocktail est classiquement utilisé pour induire la différenciation de préadipocytes 3T3 en adipocytes. La coloration à l'huile rouge des cellules a montré que les MEF LRP1 $^{-/-}$ accumulaient plus de lipides neutres que les LRP1 $^{+/+}$, à un niveau similaire aux 3T3 (figure 22.A). Le dosage de ces lipides a montré que, contrairement aux 3T3, le cocktail adipogénique n'avait pas d'effet sur le métabolisme des triglycérides, leur quantité est identique dans les deux lignées et l'expression des gènes impliqués dans leur métabolisme n'est pas modifiée. Les lipides accumulés les MEF LRP1 $^{-/-}$ sont du cholestérol et des esters de cholestérol (figure 22.B et C).

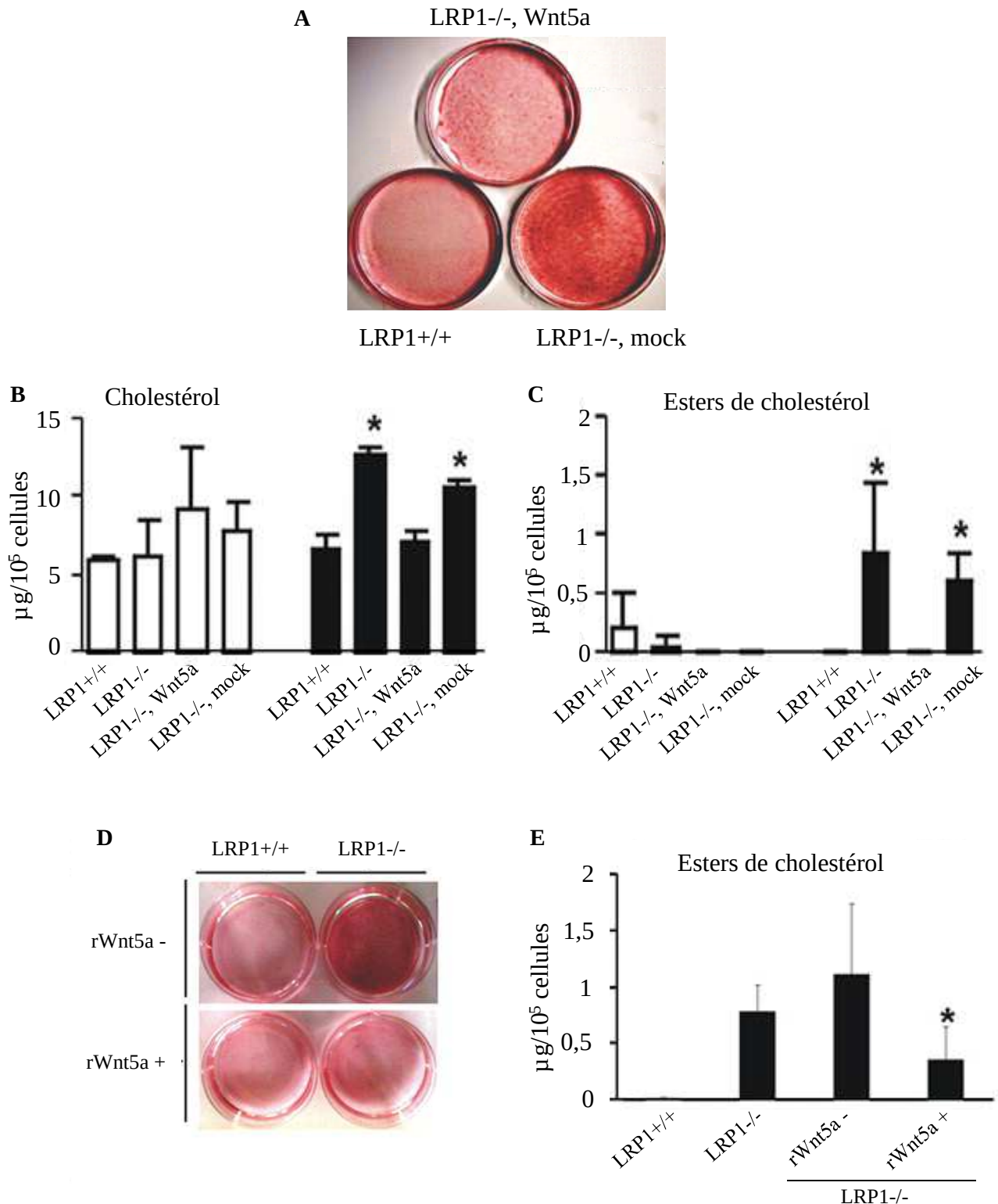


Figure 25 : Wnt5a prévient l'accumulation de cholestérol dans les MEF LRP1^{-/-}. Toutes les expériences ont été réalisées après 10 jours de différenciation **A.** Coloration à l'huile rouge des MEF LRP1^{+/+}, LRP1^{-/-} retransfectées par Wnt5a et LRP1^{-/-} retransfectées par un vecteur contrôle. **B.** Dosage du cholestérol et **C.** des esters de cholestérol dans les MEF LRP1^{+/+}, LRP1^{-/-}, LRP1^{-/-}; Wnt5a et LRP1^{-/-}; mock. (Terrand et al., 2009). **D.** Coloration à l'huile rouge des MEF LRP1^{+/+} et LRP1^{-/-} traitées par la protéine Wnt5a recombinante. **E.** Dosage des esters de cholestérol dans les MEF LRP1^{+/+} et LRP1^{-/-} traitées par la protéine Wnt5a recombinante.

Dans ces cellules LRP1^{-/-}, l'expression de l'HMGCoA-Reductase est diminuée par rapport aux LRP1^{+/+} indiquant que le rétrocontrôle exercé par le cholestérol sur sa synthèse est fonctionnel. En revanche, l'expression du LDLR est augmentée suggérant que le cholestérol s'accumule suite à une augmentation de son import et que la régulation de l'expression de ce récepteur est perturbée (figure 23).

Il a été observé que le milieu de culture des MEF LRP1^{+/+} parvenait à limiter l'accumulation de lipides lorsqu'il était mis en contact avec les MEF LRP1^{-/-}, suggérant qu'un facteur sécrété dans le milieu participait à ce phénotype. Les ligands Wnt sont une famille de protéines sécrétées impliquées dans de nombreux phénomènes, notamment l'adipogénèse (Bennett et al., 2002; Christodoulides et al., 2009; Ross et al., 2000), c'est pourquoi un screening des ligands Wnt a été réalisé dans les MEF. Ceci a permis de montrer que l'expression de Wnt5a, en ARNm comme en protéine, est abolie lorsque LRP1 est absent (figure 24). La confirmation de l'implication de Wnt5a dans l'effet protecteur de LRP1 a été réalisée par deux approches :

- la retransfection stable d'un plasmide codant pour Wnt5a dans les MEF LRP1^{-/-} (lignée de MEF LRP1^{-/-} ; Wnt5a)

- l'utilisation d'une protéine murine Wnt5a recombinante sécrétée dans le milieu de culture de cellules d'insectes SF21 préalablement infectées par un baculovirus contenant le gène codant Wnt5a. Ce milieu de culture est utilisé pour traiter des MEF LRP1^{+/+} et LRP1^{-/-}.

Après différenciation adipocytaire, les MEF LRP1^{-/-} retransfectées avec Wnt5a accumulent beaucoup moins de cholestérol et d'esters de cholestérol que les MEF retransfectées avec un plasmide contrôle (MEF LRP1^{-/-} ; mock) (figure 25.A-C). On observe également une diminution de la quantité d'esters de cholestérol après différenciation adipocytaire dans les MEF LRP1^{-/-} en présence de la protéine recombinante (figure 25.D et E).

Le rôle athéroprotecteur de LRP1 est clairement établi dans les macrophages et dans les cellules musculaires lisses. Dans ce dernier type cellulaire, LRP1 contrôle les voies de signalisation TGFβ et PDGF ce qui limite la prolifération des CMLv de la média. L'effet protecteur passe également par l'activation d'une voie de signalisation impliquant Wnt5a qui prévient l'accumulation de cholestérol intracellulaire.

Puisque les souris invalidées pour LRP1 dans les CML présentaient des lésions enrichies en cholestérol, l'hypothèse de l'implication de LRP1 dans la régulation du métabolisme du cholestérol a été posée. Le laboratoire a confirmé cette hypothèse dans un modèle in vitro, et identifié un intermédiaire impliqué dans cette régulation : la protéine sécrétée Wnt5a.

IV. La protéine Wnt5a

IV.1 Généralités sur les Wnt

Les membres de la famille des ligands Wnt sont des protéines de signalisation extracellulaire qui agissent de manière autocrine et paracrine. Elles interagissent avec des récepteurs membranaires tels que les Fzd (*Frizzled*) et LRP5/6 pour activer des voies de signalisation qui aboutissent à la transcription de gènes cibles (MacDonald and He, 2012). Ces protéines sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques durant l'embryogénèse et tout au long de la vie : la polarisation des cellules et l'homéostasie des tissus au cours du développement, la prolifération et la différenciation cellulaire, le renouvellement des cellules souches, l'apoptose... Des dérégulations de la signalisation Wnt ont été associées à des processus pathologiques comme les cancers (Anastas and Moon, 2013; Polakis, 2012).

Les Wnt sont très conservées entre les différentes espèces et chez l'Homme et la souris, 19 gènes *Wnt* ont été identifiés. Toutes les protéines Wnt sont sécrétées, et leur sécrétion ne peut avoir lieu qu'après des modifications post-traductionnelles de type glycosylations et palmitoylations (Komekado et al., 2007; Mikels and Nusse, 2006a; Smolich et al., 1993; Takada et al., 2006; Willert et al., 2003).

La signalisation Wnt est contrôlée par des protéines également sécrétées qui jouent un rôle d'antagoniste et/ou d'inhibiteur de Wnt (Cruciat and Niehrs, 2013). Les sFRPs (*secreted Frizzled related proteins*) se fixent à Wnt et aux récepteurs Fzd, inhibant les signalisations Wnt en interdisant l'interaction ligand/récepteur (Rattner et al., 1997). WIF (*Wnt Inhibitory Factor*) se lie uniquement aux Wnt (Hsieh et al., 1999; Malinauskas et al., 2011) tandis que Dkk (*Dickkopf*) se fixe au récepteur LRP6 et empêche son interaction avec le complexe Fzd/Wnt (Bafico et al., 2001).

La signalisation Wnt est classiquement divisée en 2 catégories : une voie canonique ou voie Wnt/ β caténine, et des voies non canoniques (Komiya and Habas, 2008; Miller et al., 1999). Si l'on pensait au départ que chaque Wnt était spécifique d'une voie, les avancées dans l'étude de cette signalisation tendent à montrer que le choix de la voie canonique ou non canonique dépend plus du contexte cellulaire et des récepteurs présents que de la protéine Wnt elle-même. Ainsi, même si Wnt5a est plutôt associée aux voies non canoniques, il semble qu'il n'y ait pas de Wnt « intrinsèquement » canonique ou non canonique (Willert and Nusse, 2012).

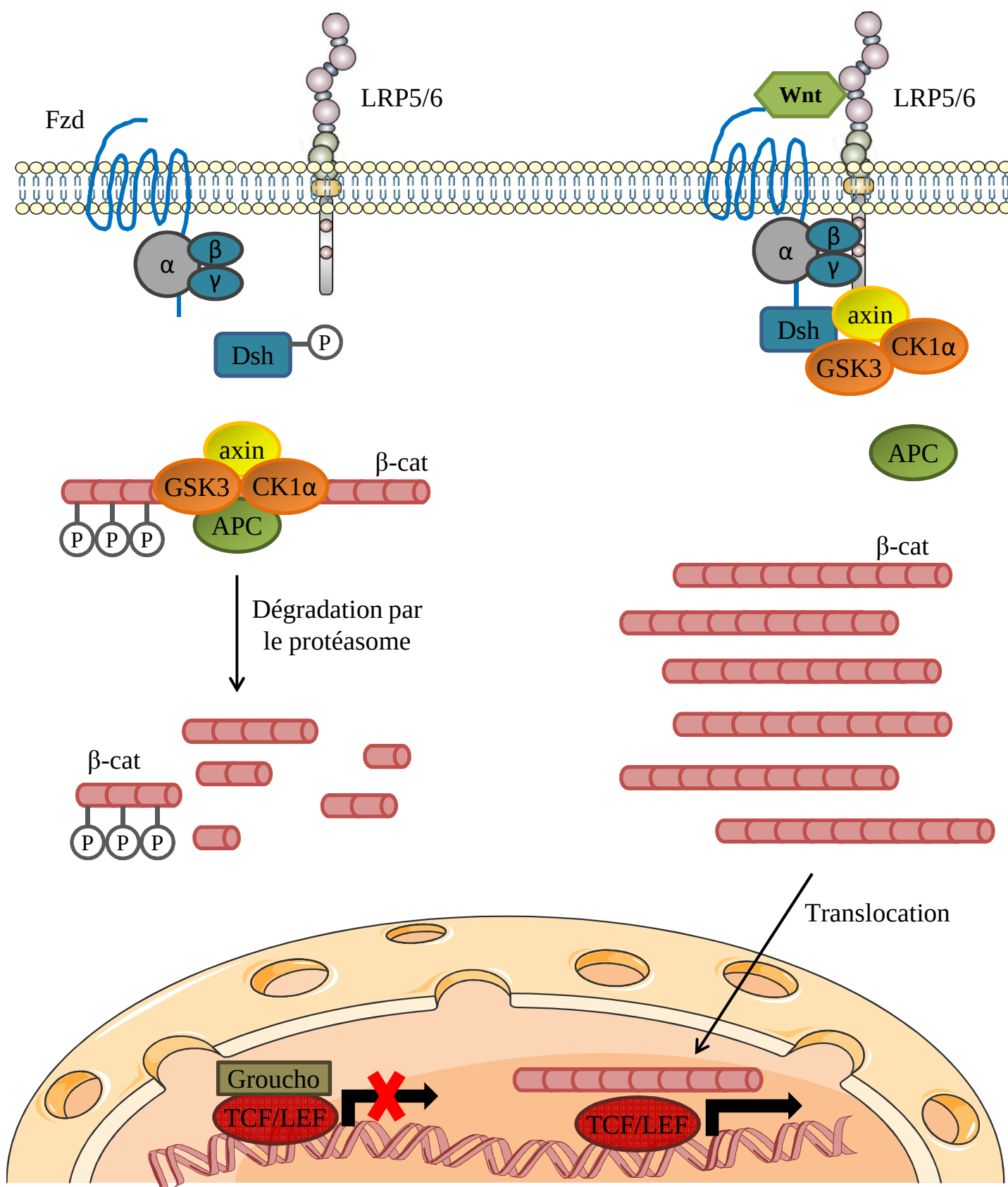


Figure 26 : La voie canonique Wnt/βcaténine. En absence de stimulation des récepteurs Fzd et LRP5/6 par un ligand Wnt, la βcaténine est phosphorylée au sein du complexe de destruction et dégradée par la protéasome. Lorsque qu'un ligand Wnt se lie à Fzd/LRP5/6, les protéines du complexe de destruction sont dissociées et la βcaténine s'accumule puis transloque dans le noyau pour activer ses gènes cibles. (Angers et Moon, 2009)

IV.1.1 La voie canonique

La voie canonique Wnt permet la modulation du taux intracellulaire de β -caténine, la protéine assurant la transduction du signal (MacDonald et al., 2009) (figure 26). En absence de ligand Wnt, la β -caténine cytoplasmique est prise en charge par un complexe protéique composé de l'Axin, de APC (*adenomatous Polyposis coli*), de la GSK3 β (*serine/threonine kinase Glycogen Synthase Kinase 3 β*) et de CK1 (*Casein Kinase 1*). Ce complexe est nommé complexe de destruction (Stamos and Weis, 2013). La CK1 phosphoryle la β -caténine en N-ter, puis la GSK3 β ajoute des phosphorylations supplémentaires. La β -caténine phosphorylée est alors reconnue par l'ubiquitine ligase β -TrCP (*β -transducin repeat containing protein*) et rapidement dégradée par le protéasome (Amit et al., 2002; Hart et al., 1999; Komiya and Habas, 2008; MacDonald et al., 2009). Les gènes cibles de la β -caténine restent réprimés par l'interaction des facteurs de transcription de la famille TCF/LEF (*T-cell-specific transcription factor/lymphoid-enhancer-binding factor*) avec le corépresseur Groucho (Brantjes et al., 2001).

L'interaction d'un ligand Wnt avec le récepteur Fzd entraîne une dimérisation avec LRP5/6. L'interaction de la protéine cytoplasmique Dvl (*Dishevelled*, nommée Dsh chez la drosophile) avec Fzd provoque le recrutement des protéines Axin, GSK3 β et CK1, ces deux kinases assurant la phosphorylation de LRP5/6 (Zeng et al., 2008). Le complexe de destruction est alors dissocié et la dégradation de la β -caténine est stoppée. Celle-ci s'accumule dans le cytoplasme puis transloque dans le noyau où elle déplace le facteur Groucho et lève ainsi la répression de ses gènes cibles (Daniels and Weis, 2005).

IV.1.2 Les voies non canoniques

Il existe plusieurs voies Wnt indépendantes de la β -caténine ou voies non canoniques, certaines n'étant pas encore bien caractérisées (Veeman et al., 2003). Si la liaison de Wnt à Fzd et le recrutement de Dvl sont communs aux deux types de voies (Grumolato et al., 2010; Habas and Dawid, 2005), les effecteurs finaux des voies non canoniques ne sont pas la β -caténine et les facteurs TCF/LEF.

La voie PCP (*planar cell polarity*) ou voie Wnt/JNK est activée dans l'embryogénèse et permet la migration des cellules nécessaire à l'étape de gastrulation et la mise en place de structures comme le tube de neural ou les ailes chez la drosophile. L'interaction de Wnt avec Fzd active cette voie sans l'intervention de LRP5/6 et permet le recrutement de Dvl. Dvl active alors la GTPase RhoA qui déclenche une cascade de phosphorylation aboutissant à la

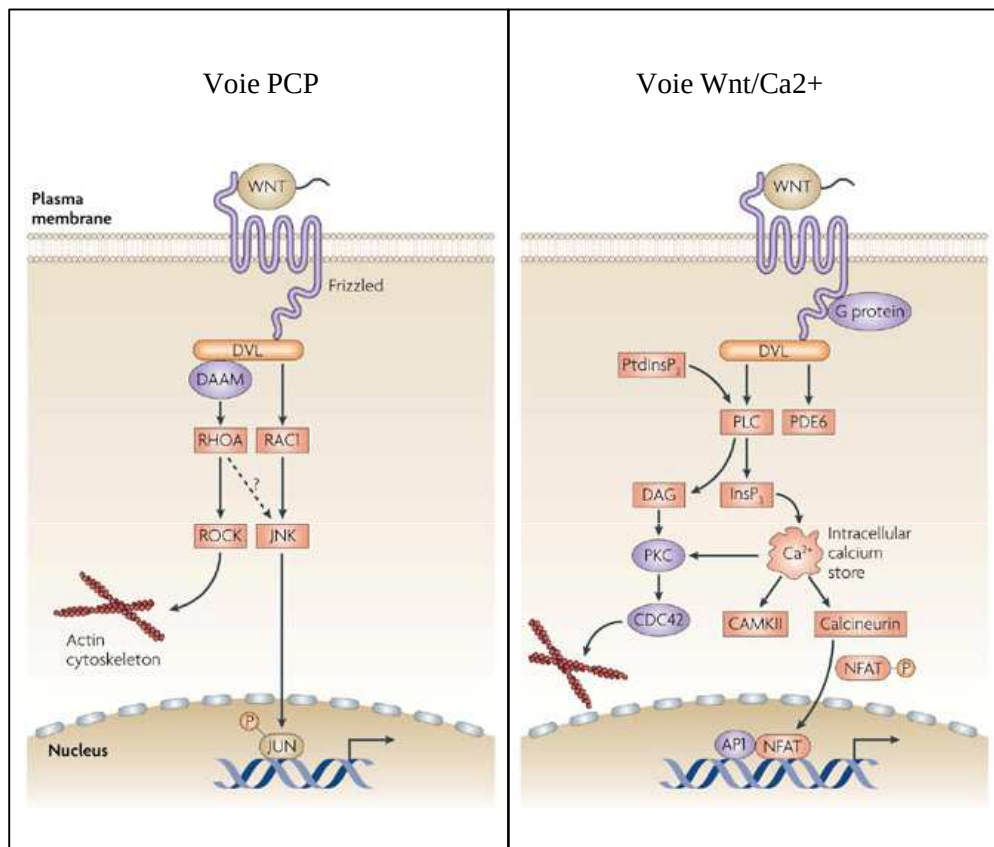


Figure 27 : Les voies de signalisation Wnt non canoniques. Les ligands Wnt peuvent activer une voie de polarité planaire (PCP) et une voie du calcium qui aboutissent à l'activation des facteurs de transcription NFAT, JUN ou NFκB (d'après Staal et al., 2008).

stabilisation de l'actine. Dvl peut également activer la GTPase Rac1 qui elle active la voie des kinases JNK (*c-Jun NH2-terminal kinase*) et régule la stabilité des microtubules (figure 27).

L'activation de la voie du calcium (Wnt/Ca²⁺) par la fixation de Wnt sur Fzd entraîne le recrutement de Dvl et l'activation de la PLC (*phospholipase C*). Cette enzyme conduit à la formation de DAG (diacylglycérol) et d'IP3 (inositol triphosphate), qui déclenchent un relargage de calcium du RE dans le cytoplasme. Cette augmentation du taux calcique active les kinases PKC et CaMK II (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase*). Les facteurs de transcription activés par cette voie sont NFκB, CREB (*C-AMP Response Element-binding protein*), et NF-AT (*Nuclear factor of activated t-cells*) (De, 2011; Kohn and Moon, 2005) (figure 27).

IV.2 La signalisation Wnt dans le métabolisme des lipides

Plusieurs revues font état des rôles des différents ligands Wnt dans le métabolisme des lipides et la différenciation adipogénique (Bennett et al., 2002; Christodoulides et al., 2009). Les adipocytes dérivent des cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui peuvent donner 3 types cellulaires distincts : les adipocytes, les myoblastes et les ostéoclastes. Globalement, la signalisation Wnt canonique inhibe l'adipogénèse tandis que les voies non canoniques l'activent.

Il a été montré par exemple que les signalisations canoniques Wnt1 et Wnt10b inhibaient la différenciation des CSM en préadipocytes et des préadipocytes en adipocytes (Bennett et al., 2002; Cawthorn et al., 2012; Ross et al., 2000). Cette inhibition passe par la répression de l'expression des facteurs de transcription adipogéniques C/EBPα (*CCAAT/enhancer binding protein α*) et PPARγ. *In vivo* cet effet se traduit par une diminution de la masse grasse et une résistance à l'obésité des animaux surexprimant Wnt10b (Longo et al., 2004; Wright et al., 2007). En parallèle de cet effet inhibiteur, la signalisation canonique Wnt stimule la différenciation des CSM en myoblastes et en ostéoblastes (Christodoulides et al., 2009; Takada et al., 2009).

La voie Wnt3a inhibe l'adipogénèse dépendamment de la β-caténine (Kanazawa et al., 2005; Liu et al., 2009), tandis que la stimulation de la voie Wnt5b favorise au contraire l'adipogénèse en inhibant cette voie Wnt3a/β-caténine et en activant PPARγ (Kanazawa et al., 2005; van Tienen et al., 2009). Comme Wnt5b, Wnt4 et Wnt5a stimule l'adipogénèse au stade initial de la différenciation adipocytaire, par l'activation des voies non canoniques et l'inhibition de la voie canonique (Nishizuka et al., 2008; van Tienen et al., 2009).

IV.3 Wnt5a

IV.3.1 Généralités

Comme toutes les protéines Wnt, Wnt5a subit des modifications post-traductionnelles, nécessaires à son activité et à sa structure. La palmitoylation de la cystéine 104 est indispensable à l'activité de la protéine, notamment sa fixation au récepteur Fzl5 et à l'internalisation de celui-ci. L'ajout de glycans sur les asparagines 114, 120, 311 et 325 est nécessaire à la sécrétion de la protéine (Kurayoshi et al., 2007). La structure tridimensionnelle de Wnt5a n'a pas été identifiée à ce jour. Les seules informations sur cette structure 3D proviennent de la cristallisation du couple ligand/récepteur Wnt8/Fz8 chez le xénope. Cette étude a permis d'identifier sur Wnt8 deux sites de liaisons au récepteur : la sérine 187 portant un acide palmitoléique et le domaine situé entre les cystéines 315 et 325 (Janda et al., 2012a). La protéine Wnt8 présente une conformation comparable à une main, tenant Fz8 entre le pouce (la sérine 187) et l'index (la séquence 315-325). On retrouve ces deux domaines parfaitement conservés sur les séquences de Wnt5a humaine en positions 258 et 371-381, et murine en positions 244 et 357-367. Ainsi, à partir de ce modèle 3D de l'interaction entre Wnt8 et Fzl8, on peut extrapoler la structure et le mécanisme de liaison de Wnt5a à son ligand.

Le gène codant Wnt5a produit deux isoformes différentes issues de deux promoteurs. L'expression de Wnt5a est régulée par un grand nombre de facteurs, les promoteurs comportant notamment des séquences cibles des facteurs de transcription Smad (*Smad Binding Element*), PPAR γ , NF κ B et Sp1 (Katoh, 2009). L'invalidation totale de Wnt5a chez la souris conduit à de multiples malformations et à la mort périnatale des animaux (Yamaguchi et al., 1999). Ceci montre bien l'importance de cette protéine dans le développement embryonnaire.

Wnt5a est initialement associée à l'activation des voies non canoniques (Bhatt and Malgor, 2014). En effet, l'interaction directe entre Wnt5a et ROR2 (*Receptor Tyrosine Kinase Like Protein Orphan Receptor*) et l'activation sous-jacente de JNK a été observé *in vitro* (Oishi et al., 2003; Schambony and Wedlich, 2007). De plus, il a été montré que Wnt5a déstabilise la β -caténine et inhibe la voie canonique (Topol et al., 2003). L'interaction de Wnt5a avec Fzl2 est conduit quant à elle à l'activation de la voie du calcium (Slusarski et al., 1997a, 1997b). Ce même récepteur permet à Wnt5a d'avoir deux actions distinctes : l'activation de la kinase Rac par internalisation du couple Wnt5a/Fzl2, et l'inhibition de l'interaction de Wnt3a avec Fzl2 (Sato et al., 2010). Cependant, lorsque le récepteur Fzl4 est

présent à la surface des cellules, Wnt5a s'y fixe et c'est la signalisation β -caténine qui est activée (Mikels and Nusse, 2006b). Il est maintenant admis que Wnt5a active préférentiellement les voies non canoniques mais peut aussi activer la β -caténine selon le contexte cellulaire.

IV.3.2 La signalisation Wnt5a et l'athérosclérose

Les effets de la signalisation Wnt et particulièrement Wnt5a sur l'athérosclérose ont été étudiés dans des lésions murines et humaines, dans des modèles animaux et *in vitro* dans les 3 types cellulaires qui composent les vaisseaux.

IV.3.2.1 Les cellules endothéliales

Dans les cellules endothéliales, les effets de Wnt sont assez contradictoires, certaines études montrent que la voie canonique Wnt1 favorise leur prolifération tandis que la voie non canonique Wnt5a l'inhibe (Goodwin et al., 2007; Wright et al., 1999), d'autres montrent l'inverse (Cheng et al., 2003, 2008; Masckauchán et al., 2006). Il semble que les différences de profil d'expression des Wnt selon l'origine et la confluence des cellules endothéliales expliquent ces contradictions (Matthijs Blankesteyn and Hermans). En plus de réguler la prolifération, la signalisation Wnt est également impliquée dans la dysfonction endothéliale. En effet, le traitement de cellules endothéliales en culture par Wnt5a recombinante active la voie non canonique Wnt/Ca²⁺ qui conduit à l'activation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 et IL-6 par NF κ B (Kim et al., 2010).

IV.3.2.2 Les macrophages

Le rôle de la signalisation Wnt5a dans les macrophages a commencé à être étudié après l'observation d'une forte concentration de Wnt5a dans les zones riches en macrophages des lésions humaines et de souris ApoE^{-/-} (Christman et al., 2008). *In vitro*, le traitement de macrophages par des LDL oxydés augmente l'expression de Wnt5a et de IL-6 alors que les LDL natifs n'ont pas d'effet (Bhatt et al., 2012). Ceci indique que Wnt5a pourrait être impliquée dans la formation des cellules spumeuses.

In vivo, on a observé que l'expression de Wnt5a était corrélée au grade des lésions, plus elles sont sévères, plus Wnt5a est exprimée (Bhatt et al., 2012). Elle est également augmentée dans le sérum des patients par rapport aux sujets sains et elle est corrélée à l'expression de TLR2 (*Toll Like Receptor*) et TLR4 (Malgor et al., 2013). D'autres études

associent la signalisation non canonique Wnt5a à l'activation des signalisations JNK et NFκB et de l'expression de médiateurs de l'inflammation tels que IL-8, IL-10 ou COX2 (Kim et al., 2012). Ces données montrent que la signalisation Wnt5a non canonique est associée à la réponse inflammatoire des macrophages au cours de l'athérosclérose.

Si l'effet pro-inflammatoire de Wnt5a est associé au développement des lésions, une étude récente a montré que Wnt5a aurait un rôle dans la protection contre l'accumulation de cholestérol dans les macrophages. En effet, des macrophages traités avec des LDLox dans lesquels Wnt5a a été ciblée par un siRNA contiennent plus de cholestérol et d'esters de cholestérol que les macrophages exprimant Wnt5a. Inversement, le traitement de ces macrophages avec une protéine Wnt5a recombinante entraîne une diminution de ce cholestérol. Cet effet passe par l'augmentation de l'expression de la cavéoline 1 et ABCA1 qui favorisent l'efflux de cholestérol (Qin et al., 2014).

IV.3.2.3 Les cellules musculaires lisses

Plusieurs études montrent que la signalisation canonique Wnt favorise la prolifération de CMLv, notamment en activant l'expression de la cycline D1 (Bedel et al., 2008; Lyon et al., 2011; Quasnichka et al., 2006). L'activation de la voie β-caténine par Wnt4 induit la prolifération des CMLv *in vitro*, tandis que WIF-1 inhibe la prolifération induite par le PDGF-BB. *In vivo*, l'épaississement de la paroi vasculaire est corrélé à l'augmentation de l'expression de Wnt4 et de la cycline D1 (Tsaousi et al., 2011). L'inhibition de la voie Wnt par sFRP1 réduit la prolifération des CMLv *in vitro* comme *in vivo* (Ezan et al., 2004). Toutes ces données indiquent que la stimulation de la signalisation canonique Wnt agit en faveur d'une stimulation de la prolifération des CMLv, événement contribuant à l'athérosclérose.

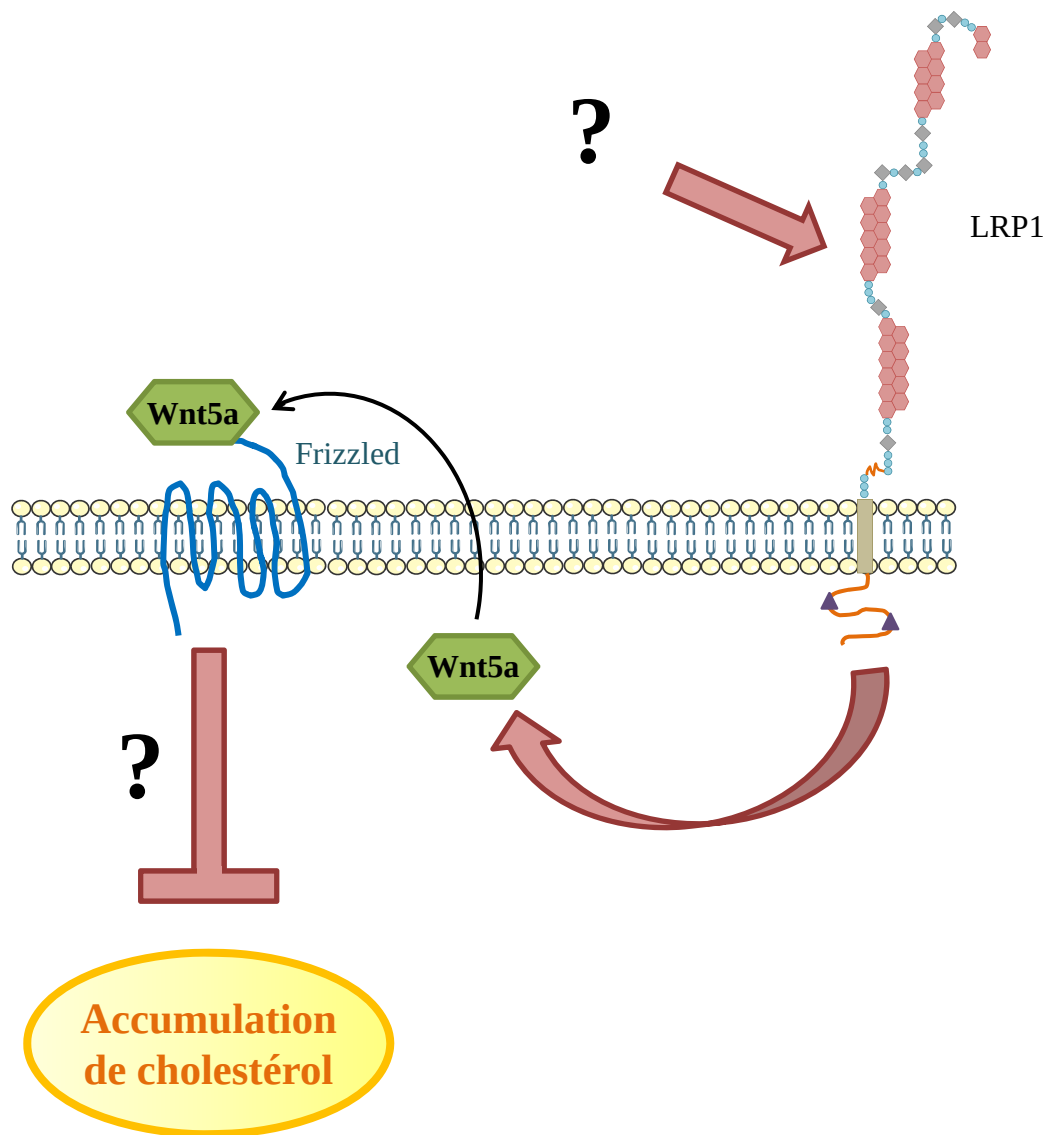
La signalisation Wnt5a canonique dans les CMLv exerce deux actions bénéfiques au cours de l'athérosclérose. En effet, Wnt5a favorise leur survie en stimulant l'expression de WISP-1 (*Wnt1-Inducible Secreted Protein-1*) qui diminue l'apoptose des CMLv induite par les ROS. Ainsi, Wnt5a, en prévenant l'apoptose des CMLv, contribue à maintenir et renforcer la chape fibreuse entourant le cœur lipidique. Il n'est donc pas surprenant que les plaques stables soient plus riches en Wnt5a et en WISP-1 que les plaques instables qui sont plus susceptibles de rompre (Mill et al., 2014). Par ailleurs, l'étude de notre laboratoire réalisée dans les MEF permet de montrer que l'activation de la synthèse de Wnt5a via LRP1 prévient l'accumulation de cholestérol, via une voie canonique (Terrand et al., 2009) (figure 24-25). Compte tenu du fait que cette activation de Wnt5a par LRP1 est retrouvée également dans les

CMLv (Woldt et al., 2012), et que les aortes des souris sm22LRP1- présentent une accumulation de cellules spumeuses (Zhou et al., 2009b), on peut supposer que Wnt5a, activée par LRP1, prévient l'accumulation de cholestérol au sein des lésions et protège de l'athérosclérose.

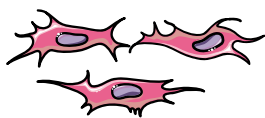
Le laboratoire a par ailleurs associé la protéine Wnt5a la calcification vasculaire, en absence de PPAR γ . Wnt5a est connu pour stimuler la chondrogenèse au cours de l'embryogénèse et de la formation du cartilage articulaire (Bradley and Drissi, 2010). Chez les souris invalidées pour LRP1 dans les CMLv (qui n'expriment donc pas Wnt5a) il n'a jamais été observé de calcification des lésions. En absence de PPAR γ , LRP1 pourrait stimuler une voie Wnt5a, retrouvée exprimée au niveau des lésions calcifiées. Cette voie est concurrencée par une signalisation PPAR γ /sFRP2 qui protège contre la calcification (Woldt et al., 2012).

Plusieurs éléments convergeaient vers l'hypothèse d'une implication de la signalisation Wnt5a dans la régulation du métabolisme du cholestérol dans les CMLv et d'un effet protecteur contre son accumulation. Nous avons confirmé cette hypothèse *in vitro* mais les mécanismes moléculaires de cette régulation restent à identifier.

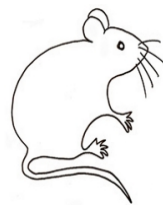
Projet de thèse



A. MEF LRP1+/+, LRP1-/-, LRP1-/-; Wnt5a, LRP1-/-; mock



B. Souris aTgWnt5a



Paramètres du métabolisme du cholestérol

- efflux
- synthèse
- import

PARTIE I. Caractériser la voie de signalisation LRP1/Wnt5a mise en jeu dans la régulation du métabolisme du cholestérol. **A.** Les modèles *in vitro* sont des MEF sauvages (LRP1+/+), des MEF déficientes pour LRP1 n'exprimant pas Wnt5a (LRP1-/-), ces MEF déficientes pour LRP1 retransfectées par Wnt5a (LRP1-/-; Wnt5a) et leur contrôle retransfectées par un plasmide vide (LRP1-/-; mock). **B.** L'effet de Wnt5a sur le métabolisme du cholestérol *in vivo* a été analysé chez des souris transgéniques surexprimant Wnt5a spécifiquement dans le tissu adipeux (souris aTgWnt5a).

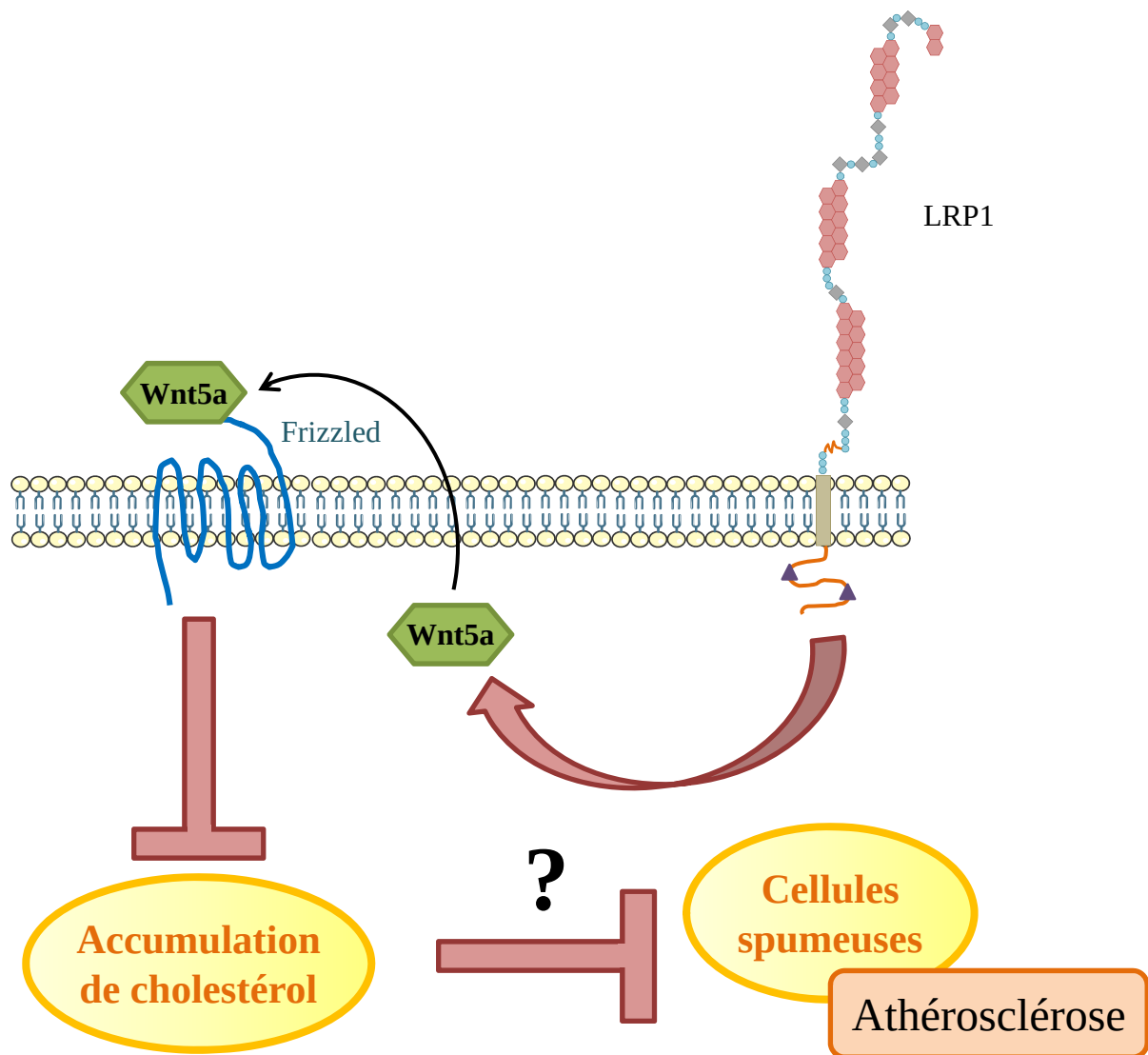
L'accumulation de cholestérol dans les cellules vasculaires (macrophages et CMLv) est un événement initiateur de l'athérosclérose. Le récepteur LRP1 a été identifié comme un facteur protecteur contre cette pathologie. Il contrôle les voies de signalisation PDGF et TGF β qui régulent la prolifération et la migration des CMLv (Boucher et al., 2003, 2007; Zhou et al., 2009a). Ces études ont également mis en évidence le rôle protecteur de LRP1 contre l'accumulation de cholestérol. Au sein du laboratoire, nous avons montré *in vitro* que cette protection nécessite l'expression de la protéine sécrétée Wnt5a (Terrand et al., 2009). LRP1 est nécessaire à l'expression de Wnt5a dans les MEF et dans les CMLv, et la réexpression de Wnt5a *in vitro* prévient l'accumulation intracellulaire de cholestérol, par des mécanismes indéterminés.

L'objet de ce travail de thèse consistait à identifier ces mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet protecteur de la signalisation LRP1/Wnt5a et à confirmer le rôle antiathérogène de Wnt5a chez la souris :

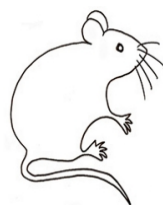
PARTIE I/ Caractériser la voie de signalisation LRP1/Wnt5a mise en jeu dans la régulation du métabolisme du cholestérol.

- *in vitro* : déterminer comment LRP1 permet l'expression de Wnt5a et sur quels paramètres du métabolisme du cholestérol (synthèse, import et/ou export) agit la signalisation LRP1/Wnt5a pour limiter son accumulation intracellulaire.

- *in vivo* : analyser les paramètres du métabolisme du cholestérol retrouvés modifiés *in vitro* chez des souris transgéniques surexprimant Wnt5a dans le tissu adipeux (souris aTgWnt5a). Le tissu adipeux blanc, principalement composé d'adipocytes, est le siège du stockage des triglycérides, dont l'hydrolyse assure un apport d'acides gras aux tissus de l'organisme dans les périodes de jeûne (Ahmadian et al., 2010). Notre intérêt s'est porté sur ce tissu car c'est également là que l'on trouve le plus grand stock de cholestérol libre de l'organisme (Nestel et al., 1969; Prattes et al., 2000).



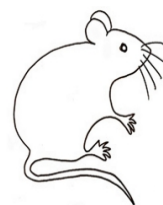
A. Souris sm22LRP1-



Activation de la
voie Wnt

- traitement au LiCl
- injection de Wnt5a purifiée

B. Souris sm22Wnt5a-



Invalidation
de Wnt5a

- régime Paigen

PARTIE II. Confirmer le rôle athéroprotecteur de Wnt5a *in vivo*. **A.** Nous avons utilisé des souris sm22LRP1- dans lesquelles nous avons tenté d'activer la voie Wnt par deux approches : l'ajout de chlorure de lithium (LiCl), un inhibiteur de la GSK3 β dans l'eau de boisson des animaux et l'injection intrapéritonéale de protéine Wnt5a purifiée. **B.** Nous avons également invalidé Wnt5a spécifiquement dans les CMLv de souris LDLR-/- (souris sm22Wnt5a -) et observé l'apparition de lésions après un régime Paigen.

PARTIE II/ Confirmer le rôle athéroprotecteur de Wnt5a *in vivo*.

Notre hypothèse est que l'effet protecteur de LRP1 contre l'athérosclérose passe en partie par une signalisation Wnt5a qui prévient l'accumulation de cholestérol. Pour confirmer cette hypothèse et déterminer si Wnt5a pouvait limiter le développement de l'athérosclérose, nous souhaitons activer la signalisation Wnt5a chez les souris sm22LRP1-, qui présentent de faibles quantités de Wnt5a dans les aortes, et observer si l'étendue des lésions athéromateuses induites par le régime Paigen est diminuée. Pour cela, deux approches ont été utilisées : le traitement des souris sm22LRP1- et sm22LRP1+ par du chlorure de lithium, un inhibiteur de la GSK3 β , et l'injection intrapéritonéale de Wnt5a recombinante purifiée.

Nous avons par ailleurs utilisé une lignée de souris dans lesquelles l'expression de Wnt5a est invalidée spécifiquement dans les cellules musculaires lisses et présentant un fond génétique LDLR-/- afin d'augmenter la susceptibilité des animaux à développer de l'athérosclérose. Ces souris ont été nourries avec un régime riche en cholestérol pendant 5 mois pour favoriser l'apparition de lésions athéromateuses. Nous avons analysé le phénotype vasculaire de ces souris afin d'observer si les animaux présentent, comme les souris sm22LRP1- (Boucher et al., 2003), plus de lésions athéroscléreuses.

Matériels et Méthodes

I. Procédures standards

I.1 Analyse des niveaux de protéines par western blot

I.1.1 Extraction et dosage des protéines

I.1.1.1 Extraction des protéines totales

Les cellules sont récupérées par grattage sur glace puis lysées dans un tampon d'extraction RIPA froid (Tris HCl 50 mM, NP40 1%, déoxycholate de sodium 0,25%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, aprotinin 1 µg/ml, leupeptin 1 µg/ml, pepstatin 1 µg/ml, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM) auquel est ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC, Sigma). L'extrait est lysé mécaniquement avec une seringue puis incubé 30 min sur glace, avant d'être centrifugé 40 min à 11700 g à 4°C. La concentration de protéines dans le surnageant est dosée selon la méthode de Lowry contre une gamme BSA (*Bovin serum Albumin*) avec le kit DC Protein Assay (Biorad).

I.1.1.2 Fractionnement cellulaire

Cette procédure permet d'isoler les différentes fractions (membranaire, nucléaire et cytoplasmique) des cellules. Toutes les étapes et les centrifugations sont réalisées à 4°C. Dans chaque tampon, on ajoute extemporanément un cocktail d'inhibiteurs de protéases. Les cellules sont récoltées puis lavées dans du PBS 1X froid additionné de 0,5 mM de PMSF. Les cellules sont ensuite lysées dans du tampon de lyse (HEPES 10 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, sucrose 250 mM, MgCl₂ 1,5 mM, NaF 2 mg/ml, βglycérophosphate 5,5 mg/ml, Na₃VO₄ 0,4 mg/ml), incubées sur glace 20 min puis l'extrait est passé dans une seringue 22G une trentaine de fois. Une centrifugation de 5 min à 1000 g permet de séparer les noyaux du reste des cellules. Le surnageant qui contient la fraction cytoplasmique et la fraction membranaire subit une ultracentrifugation de 30 min à 55000 rpm (Beckmann TL100 Ultracentrifuge), ce qui culote les membranes. Le cytoplasme est éliminé et la fraction membranaire est resuspendue dans du tampon SDS (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, SDS 10%, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM). Le culot de noyaux est lysé dans du tampon (HEPES 20 mM, glycérol 2,5%, NaCl 0,42 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM) et incubé à 4 °C sous agitation 45 min, puis ultracentrifugé 30 min à 55000 rpm. Le surnageant qui contient la

Anticorps	Espèce	Fournisseur
ABCA1	Chèvre	Santa Cruz
ABCG1	Chèvre	Abcam
Wnt5a	Rat	R&D system
GAPDH	Lapin	Santa Cruz
HSV tag monoclonal	Souris	Novagen
C-myc	Souris	Santa Cruz
Erk1/2	Lapin	Cell Signaling
pErk1/2 (p44/42 MAPK)	Lapin	Cell Signaling
CD68	Lapin	Santa Cruz
Galectin 3	Lapin	Abcam
LDL receptor	Souris	Santa Cruz
HMGCoA-Reductase	Lapin	Donné par R. de Bose-Boyde (UTSWMC, Dallas, Texas)

fraction nucléaire est conservé. Les fractions membranaires et nucléaires sont dosées avec le kit DC Protein Assay.

I.1.1.3 Extraction des protéines du tissu adipeux

Pour extraire les protéines du tissu adipeux périgonadique de souris, au minimum 1/3 d'un lobe de tissu est broyé manuellement à l'aide d'un mortier dans du tampon RIPA, puis l'extrait est passé au travers d'une seringue de 22G environ 20 fois. Le lysat de tissu est ensuite centrifugé 40 min à 11700 g et à 4°C. Les protéines du surnageant sont dosées avec le kit DC Protein Assay.

I.1.1.4 Préparation des échantillons

Qu'elles soient d'origine cellulaire ou tissulaire, les protéines sont préparées en échantillons de 50 µg, dans lesquels est ajouté du tampon de dénaturation Laemli 4X (Tris-HCl 277.8 mM, pH 6.8, SDS 4.4%, glycérol 44.4%, bleu de bromophénol 0.02%). Le tout est chauffé 10 min à 90°C pour dénaturer les protéines qui vont pouvoir être séparées uniquement en fonction de leur poids moléculaire.

I.1.2 Séparation des protéines par électrophorèse et western blot

Les échantillons de 50 µg de protéines sont déposés sur gel de polyacrylamide dénaturant et les protéines sont séparées par électrophorèse dans un tampon de migration Tris-Glycine contenant 5% de SDS 20%. Les protéines sont transférées en milieu liquide (tampon Tris-Glycine, éthanol 100%) sur membrane de nitrocellulose ou de PVDF, selon l'anticorps utilisé par la suite. Les sites de liaisons non spécifiques de la membrane sont saturés dans du TBS-Tween 10%, 5% lait, puis l'incubation avec l'anticorps primaire est réalisée sur la nuit à 4°C (tableau 1). La membrane est ensuite lavée 5 fois 5 min au TBS-Tween 10%, puis incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase pendant 1h. Après 5 lavages au TBS-Tween, la membrane est révélée par électrochimiluminescence avec le kit Clarity Western ECL Substrate (Biorad). L'intensité des signaux est quantifiée avec le logiciel ImageJ puis rapportée au signal de la GAPDH, protéine de référence utilisée comme contrôle de dépôt.

I.2. Analyses des niveaux d'ARNm

I.2.1 Extraction d'ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits des cellules ou des tissus selon la même procédure. Après lyse manuelle dans le TRI reagent, du BCP (1-Bromo-3-chloropropane, Molecular Research Center) est ajouté et les échantillons sont homogénéisés par vortex puis centrifugés 20 min à 11700 g à 4°C. Cela permet la séparation de la phase aqueuse, qui contient les ARN, et de la phase organique contenant les protéines. L'ADN est présent dans l'interface, la phase aqueuse doit donc être prélevée et isolée en évitant toute contamination par cette interface. L'ajout d'isopropanol dans la phase aqueuse récupérée entraîne la précipitation des ARN et après une heure à - 20°C, une centrifugation de 20 min à 11700 g permet de former le culot d'ARN. Ce culot est lavé à l'éthanol 75% froid, puis séché dans un concentrateur (Concentrator Plus, Eppendorf) et dissous dans de l'eau DEPC (DiEthylPyroCarbonate). Les mesures des concentrations sont effectuées avec un Nanodrop qui donne les rapports de DO 260/280 et 260/230 permettant d'estimer la pureté des ARN et l'absence de contamination par de l'ADN ou du solvant.

I.2.2 Reverse transcription

Les ARN sont rétrotranscrits en ADN complémentaires avec le kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem). 5µg d'ARN sont mélangés avec le tampon de réaction, des dNTP, du MgCl₂, des amorces aléatoires et l'enzyme polymérase Multiscribe Reverse Transcriptase puis convertis en ADNc à 37°C pendant 2h dans un thermocycleur (MJ Research).

I.2.3 PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR)

L'amplification par qPCR des ADNc est réalisée dans la machine StepOne Plus Real Time PCR system avec le kit SYBR Fast qPCR (KAPA). Les ADNc dilués sont amplifiés avec une polymérase, la sonde SYBRGREEN qui s'intègre au brin d'ADN néosynthétisé et libère de la fluorescence au cours de l'amplification, et les amorces spécifiques choisies pour chaque gène. Le design des amorces est réalisé avec l'outil primer blast de NCBI, puis les amorces sont contrôlées avec le logiciel Oligoanalyzer afin de vérifier qu'elles ne s'hybrident

pas entre elles. Pour chaque échantillon, la GAPDH est amplifiée afin d'avoir un gène de référence.

I.3 Transfection de plasmide

Des transfections sont réalisées pour l'établissement de lignées stables ainsi que pour apporter des protéines de façon transitoire. Pour ces 2 procédures, les cellules sont ensemencées et la transfection est réalisée après 48h lorsque les cellules ont atteint une densité de 60%. L'agent transfectant le Fugène6 (Promega) est mélangé goutte à goutte à du milieu DMEM (Dublecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) sans antibiotique ni sérum et ce mélange est incubé 5 min à température ambiante. L'ADN plasmidique (1 µg par puits de plaque 6 puits, 8 µg par boîte de 10 cm de diamètre) est ensuite ajouté goutte à goutte au mélange puis incubé 15 min. Le milieu des cellules est changé par du milieu DMEM sans antibiotique avec 0.5% de sérum de veau fœtal (FBS, Gibco), puis le mélange milieu/Fugène6/plasmide est ajouté goutte à goutte sur les cellules. Après 5h d'incubation à 37°C 5% de CO₂, le milieu est changé par du DMEM 10% FBS contenant 1% d'ultraglutamine (Lonza) et des antibiotiques (pénicilline 100 U/ml/ streptomycine 100 µg/ml, Lonza). Après 12h, le milieu est de nouveau changé soit par ce milieu DMEM 10% FBS contenant l'antibiotique de sélection à 1 mg/ml pour établir une lignée stable, soit par du milieu contenant le traitement apporté aux cellules pour une expérience de transfection transitoire. Les cellules exprimant le gène transfecté sont sélectionnées et amplifiées pendant environ un mois, puis une fois que l'expression de la protéine a été vérifiée par western blot, un stock de cellules stables est congelé. Les cellules transfectées transitoirement sont quant à elles récoltées au terme de l'expérience et l'on en extrait les protéines ou les ARN selon les analyses souhaitées.

II. Expérimentations *in vitro* : les modèles cellulaires

Plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées dans cette étude : des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), des fibroblastes de souris de la lignée LMTK et des cellules embryonnaires humaines de rein (HEK293).

II.1 Fibroblastes embryonnaires de souris

II.1.1 Conditions de culture

Nous avons utilisé des MEF sauvages exprimant LRP1 (LRP1+/+), et 3 lignées modifiées : des MEF LRP1-/-, qui n'expriment pas Wnt5a, ces mêmes MEF retransfectées de façon stable avec un plasmide codant pour Wnt5a (LRP1-/- ; Wnt5a), et leur contrôle retransfectées avec un plasmide vide (LRP1-/- ; mock) (Terrand et al., 2009). Ces 4 lignées sont cultivées dans un milieu DMEM complété avec 10% (v/v) de sérum de veau nouveau né (NCS, Gibco), 1% d'ultraglutamine et des antibiotiques (pénicilline 100U/ml/streptomycine 100µg/ml). Le milieu des MEF LRP1-/- ; Wnt5a et mock est supplémenté avec 50 µg/ml de zéocine (Sigma-Aldrich) afin de maintenir une pression de sélection sur ces cellules transfectées.

II.1.2 Différenciation adipocytaire

Pour lancer un programme de différenciation adipocytaire, les MEF sontensemencées en plaque 6 puits à raison de 50000 cellules par puits dans leur milieu de culture DMEM-10%NCS. Après 48h, les cellules ont atteint 60% de confluence et le milieu est changé par du milieu de culture supplémenté avec 10% de FBS et avec le cocktail de différenciation composé de 10 µg/ml d'insuline (Sigma-Aldrich), 500 µM d'IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, Sigma-Aldrich), 1 µM de dexaméthasone (Sigma-Aldrich) et 10 µM de roziglitazone (APIN System). Ce milieu reste au contact des cellules pendant 2 jours puis est remplacé tous les 2 jours pendant 7 jours par du milieu de culture additionné seulement d'insuline et de roziglitazone.

II.1.3 Coloration à l'huile rouge

L'efficacité de la différenciation est évaluée par coloration à l'huile rouge (Oil Red O, Sigma-Aldrich) qui marque les lipides neutres. Les cellules sont lavées au PBS 1X (Lonza) puis fixées dans 2 ml de formaline (Sigma-Aldrich) 10% pendant 30 minutes à température ambiante. Après 3 lavages au PBS 1X, la coloration est réalisée dans 1 ml d'Oil Red O (0.5% w/v dans du 1,2-propandiol) dilué dans de l'eau à raison de 6 volumes d'ORO pour 4 volumes d'eau. Après 15 minutes d'incubation, l'excédent d'ORO est éliminé par 3 lavages au PBS 1X.

II.1.4 Traitement au TGFβ1

Les MEF sont ensemencées à une densité de 60000 cellules par puits de plaque 6 puits et poussent jusqu'à 90% de confluence. A ce stade, elles sont carencées pendant 18h dans du milieu DMEM 0.5% FBS, puis le TGFβ1 (5ng/ml, Sigma-Aldrich) est ajouté au milieu pendant 15 min, 30 min, 2h, 4h et 24h. Les cellules sont rincées au PBS 1X froid puis récupérées par grattage sur glace, soit dans du tampon d'extraction de protéine (tampon RIPA, soit dans du TRI reagent pour l'extraction des ARN.

II.1.5 Mesure d'efflux du cholestérol

Les MEF sont ensemencées à raison de 50000 cellules par puits. Pour la condition « non différenciée », les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de NCS et pour la condition « différenciée », les cellules reçoivent du milieu DMEM supplémenté avec 10% de FBS, 10 µg/ml d'insuline et 10 µM de rosiglitazone. Le cholestérol marqué (Cholesterol, [1,2-3H(N)], 15 µCuries, Parkin Elmer) est ajouté aux deux conditions. Pour prévenir l'estérification de ce cholestérol, un inhibiteur d'ACAT (TMP153, Sigma-Aldrich) est ajouté dans le milieu à une concentration finale de 220 nM. Après 24h, les cellules sont carencées pendant 18h dans du milieu DMEM 5% de BSA et 5% de sérum délipoprotéinisé. Après cela, 6 µg/ml de l'accepteur ApoA-1 (Sigma-Aldrich) sont ajoutés au milieu durant 3h. Au terme de ces 3h, le milieu et les cellules sont récoltées et le taux de radioactivité est mesuré avec un compteur β dans les deux fractions.

II.1.6 Mesure de la stabilité des ARNm

L'expérience est réalisée à la fin d'un programme de différenciation adipocytaire. Après 8 jours de différenciation, les MEF sont traitées avec 1 µM d'actinomycine D (Sigma-Aldrich) pendant 6h et 8h puis lavées au PBS 1X et récoltées dans le TRI Reagent pour l'extraction des ARN totaux. L'ARNm de ABCG1 est quantifié par RTq-PCR pour chaque temps.

II.1.7 Mesure de l'activité de la luciférase

Les MEF LRP1-/- ; Wnt5a et LRP1-/- ; mock sont ensemencées dans leur milieu de culture à raison de 50000 cellules par puits. Après 48h de croissance, elles sont transfectées de façon transitoire avec un plasmide pGl4 codant pour le gène de la luciférase sous contrôle du promoteur A ou du promoteur B du gène ABCG1 ou avec un plasmide pGl3 contrôle. La

mesure de l'activité de la luciférase est réalisée 48h après transfection à l'aide du kit Dual-luciférase reporter assay system (Promega). Pour cela, les cellules sont lavées au PBS 1X puis récoltées dans le tampon spécifique fourni dans le kit. L'activité est mesurée dans un luminomètre et donnée en unité arbitraire.

II.1.8 Mesure de la stabilité de Insig1

Les MEF sontensemencées à raison de 70000 cellules par puits dans des plaques 6 puits. Après 24h, un plasmide codant Insig1 portant un tag c-Myc est transfecté de façon transitoire dans les cellules. Après 24h, le milieu de culture est remplacé par du DMEM supplémenté avec 5% de sérum délipoprotéinisé, 50 μ M de simvastatin (Sigma-Aldrich) et 50 μ M de mévalonolactone (Sigma-Aldrich). Après 16h, le milieu est remplacé par ce même milieu additionné de 100 μ M de cycloheximide (CHX, Sigma-Aldrich) qui bloque la transcription et 1 μ g/ml de 25-hydroxycholestérol qui stabilise Insig1. Après 15 min, 30 min, 1h et 1h30, les cellules sont récoltées dans du tampon d'extraction de protéines.

II.2 LMTK

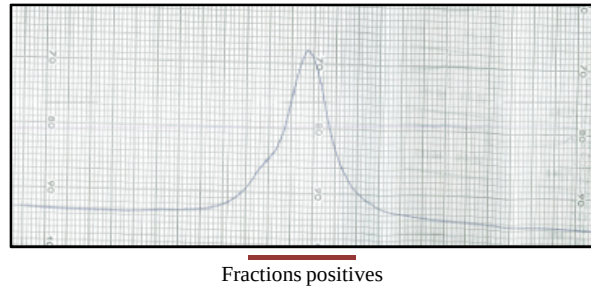
II.2.1 Conditions de culture

Nous avons utilisé 2 lignées de LMTK (American Type Culture Collection) : une sauvage (WT) et une surexprimant Wnt5a (LMTK Wnt5a+). Les 2 lignées sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de FBS, 1% d'ultraglutamine et des antibiotiques (pénicilline 100 U/ml/streptomycine 100 μ g/ml). Les LMTK Wnt5a+ sont maintenues sous une pression de sélection avec 0,6 mg/ml de Geneticin G418 (Euromedex).

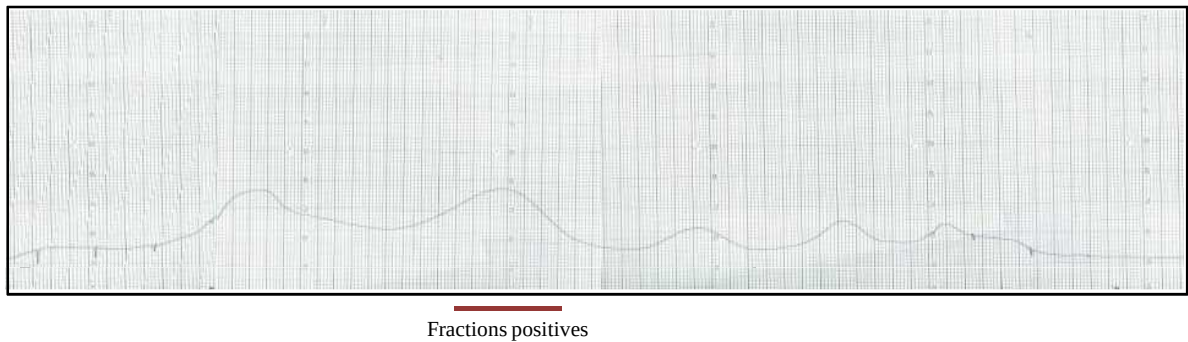
II.2.2 Préparation du milieu conditionné

Ces cellules sont utilisées pour collecter du milieu enrichi en Wnt5a, le milieu contrôle étant le milieu des LMTK WT. Pour obtenir ce milieu, les cellules sontensemencées dans des flasques T175 puis lorsqu'elles atteignent 80% de confluence, leur milieu est remplacé par du milieu frais. Ce nouveau milieu est maintenu 3 jours sur les cellules puis collecté. Il est centrifugé 5 minutes à 3000 g afin d'éliminer les débris cellulaires puis il peut être stocké 24 à 48h à 4°C avant son utilisation, soit en traitement sur des cellules, soit pour la purification de Wnt5a.

A. Chromatographie d'affinité



B. Filtration sur gel



C. Chromatographie échangeuses d'ions

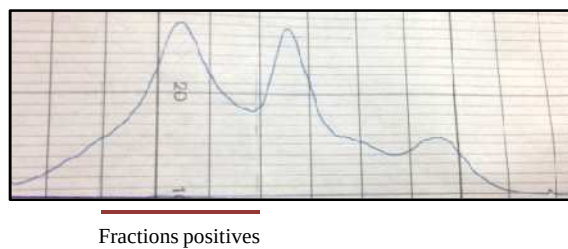


Figure 28 : Purification par chromatographie de la protéine Wnt5a recombinante. Chromatogrammes pour chaque chromatographie **A.** Chromatographie d'affinité. **B.** Filtration sur gel. **C.** Chromatographie échangeuse d'ions. Les fractions ont été analysées par western blot avec un anticorps dirigé contre Wnt5a, permettant de détecter les fractions positives les plus concentrées.

II.2.3 Purification de Wnt5a

J'ai réalisé en collaboration avec le Dr C. Boudier la purification de la protéine Wnt5a sécrétée par les cellules LMTK+ selon la procédure décrite par Kurayoshi (Kurayoshi et al., 2007). Elle consiste à isoler Wnt5a par 3 étapes successives : une chromatographie d'affinité, une filtration sur gel puis une chromatographie échangeuse d'ions (figure 28). Entre chaque étape, la protéine est localisée dans les fractions d'élution par western blot avec un anticorps anti-Wnt5a et les fractions positives sont utilisées pour l'étape suivante. Pour cette purification, 2 litres de milieu LMTK+ sont nécessaires.

- Chromatographie d'affinité : Les tampons utilisés pour ce protocole sont les suivants : tampon A : 20 mM Tris HCl, 50 mM KCl, CHAPS 1%, pH 7.4 ; tampon B : 20 mM Tris HCl, 1.5 M KCl, CHAPS 1%, pH 7.5. La colonne de chromatographie d'affinité est une colonne de bleu cibacron, qui reconnaît les protéines hydrophobes et qui doit être équilibrée avec du tampon A. Le milieu LMTK+ collecté est chargé sur la colonne qui est ensuite lavée avec du tampon A. L'élution est réalisée avec le tampon B et le produit d'élution est collecté dans des tubes de 6 ml.

- Concentration de la protéine : Les fractions positives pour Wnt5a issues de la chromatographie d'affinité sont regroupées mais elles représentent un volume trop important pour être chargé sur la colonne de gel filtration. La protéine doit donc être concentrée, par centrifugation dans un filtre Centricon Plus 70 (Millipore) jusqu'à obtenir un volume d'environ 10ml.

- Filtration sur gel : La protéine concentrée a été injectée dans la colonne de gel filtration (HiLoad Superdex 200), qui permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire, préalablement équilibrée avec du PBS 1X-1% CHAPS à pH 7,5. L'élution est également réalisée avec ce PBS 1X-1% CHAPS et les protéines sont récupérées dans des fractions de 6 ml.

- Les fractions positives sont ensuite chargées sur une colonne échangeuse d'ions (HiTrap Heparin, GE Healthcare) équilibrée avec du PBS 1X-1% CHAPS à pH 7,5. La colonne est lavée avec cette même solution puis l'application d'un gradient linéaire de chlorure de sodium (solution de PBS 1X, 1% CHAPS, 1M NaCl, pH 7,5) permet le décrochage de la protéine Wnt5a. Les fractions positives les plus riches en Wnt5a sont regroupées puis dialysées contre 15 litres de sérum physiologique stérile et conservées à -20°C. Pour avoir une solution servant de contrôle négatif lors des expériences utilisant la protéine purifiée, les 5 dernières fractions issues de cette chromatographie, dans lesquelles aucune protéine n'a été détectée au

chromatogramme, ont été regroupées et dialysées contre 15 litres de sérum physiologique stérile.

La DO à 280nm de la solution contenant les fractions positives a été mesurée puis la quantité de protéine a été estimée à 53µg à partir du coefficient d'absorption molaire de Wnt5a.

II.3 Human Embryonic Kidney cells

II.3.1 Conditions de culture

Les cellules embryonnaires de rein HEK293 sont entretenues dans du milieu DMEM supplémentées de 10% de SVF, 1% d'ultraglutamine et des antibiotiques (pénicilline 100U/ml/streptomycine 100µg/ml).

Ces cellules ont été utilisées pour établir une lignée stable de HEK293 exprimant le plasmide pTK-SREBP2-HSV, nommée HEK-SREBP2, selon la procédure décrite en I.3 ce chapitre.

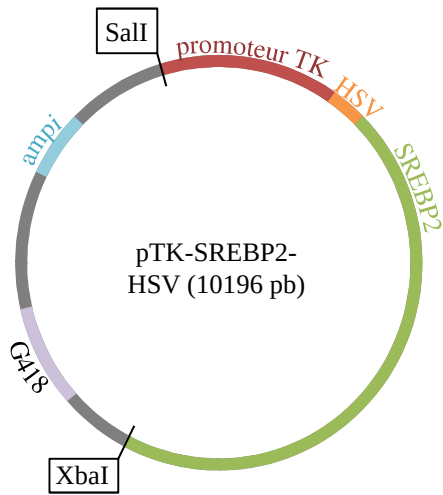
II.3.2 Analyse de l'effet de Wnt5a sur la translocation de SREBP2

II.3.2.1 Traitement des HEK-SREBP2 par le milieu conditionné LMTK

Les cellules stables HEK-SREBP2 sontensemencées dans leur milieu de culture à raison de 1 million par boîte de Pétri. Après 48h de croissance, les cellules sont rincées au PBS 1X à 37°C puis le milieu est remplacé par du milieu conditionné issu de LMTK Wnt5a+ ou LMTK WT pendant 2h, 6h, 12h et 24h. Les cellules sont ensuite récoltées, les fractions nucléaire, membranaire, et cytoplasmique sont isolées par ultracentrifugation dans des tampons spécifiques. Les fractions membranaire et nucléaire ainsi que du lysat non fractionné sont analysés par western blot avec un anticorps dirigé contre le tag HSV.

II.3.2.2 Transfection transitoire de Wnt5a

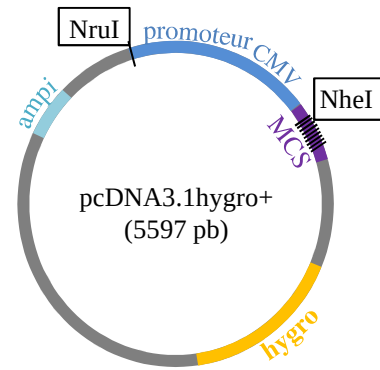
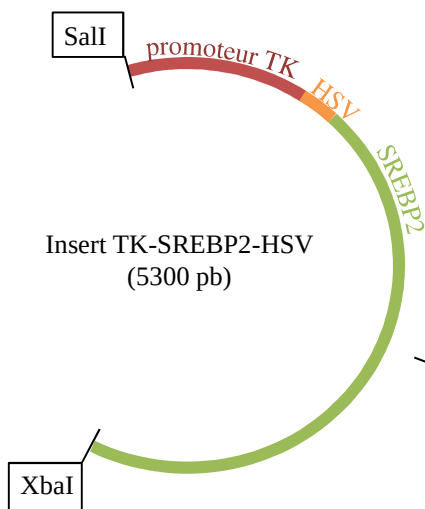
Les cellules stables HEK-SREBP2 ont étéensemencées à raison de 1 million par boîte de pétri dans leur milieu de culture DMEM + 10% FBS. Après 48h de croissance, le plasmide pcDNA3.1-zéo codant Wnt5a ou le plasmide vide est transfecté. Les cellules sont récoltées après 48h selon le protocole de fractionnement cellulaire décrit précédemment. Les échantillons sont analysés par western blot avec un anticorps dirigé contre le tag HSV.



-Digestion du plasmide pTK-SREBP2-HSV par SalI

- Transformation du site de coupure en bord franc par une enzyme Klenow

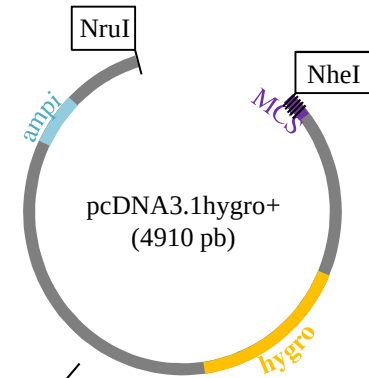
- Digestion par XbaI



-Digestion de pcDNA3.1hygro+ par NruI

-Digestion de pcDNA3.1hygro+ par NheI

-Déphosphorylation avec CIP



Ligation du bord franc avec NruI et de NheI avec XbaI

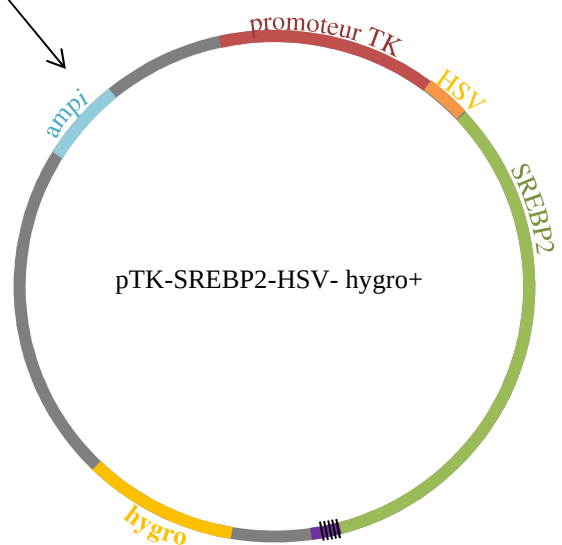


Figure 29 : Stratégie de clonage du plasmide pTK-SREBP2-HSV-hygro+.

II.3.2.3 Transfection transitoire de *Wnt5a* et traitement aux stérols

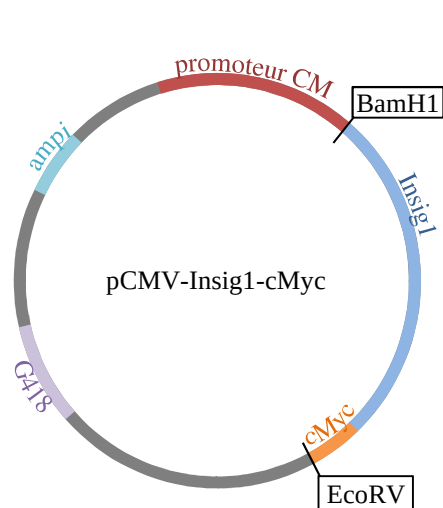
Les cellules sont ensemencées et transfectées comme décrit ci-dessus. Après 12h de transfection, le milieu est remplacé par du DMEM supplémenté de 5% de sérum délipoprotéinisé, de 50 μ M de compactine (Sigma-Aldrich) et 50 μ M de mévalonate (Sigma-Aldrich), en absence ou en présence des concentrations de 25-hydroxycholestérol (25-HC) et de cholestérol indiquées. 3h avant de récolter les cellules, 25 μ g/ml d'ALLN (N-acetyl-leucinal-leucinal-norleucinal, Sigma-Aldrich) sont ajoutés au milieu. Les échantillons de fractions membranaire et nucléaire ainsi que du lysat non fractionné sont analysés par western blot avec un anticorps dirigé contre le tag HSV.

III. Clonages et plasmides

III.1 pTK-SREBP2-HSV

Le plasmide codant le gène humain de SREBP2 a été donné par Russell DeBose-Boyd (UT Southwestern Medical Center, Dallas, Texas). C'est un plasmide pcDNA3.1 qui porte une résistance à la néomycine (G418) et dans lequel le promoteur fort CMV (*cytomegalovirus*) a été remplacé par un promoteur faible TK (*Tymidine Kinase*). Le plasmide comprend également un tag HSV (*Herpes Simplex Virus*) en 5' du gène qui servira à la détection de la protéine par western blot avec un anticorps dirigé contre ce tag.

Le transfert de l'insert et du promoteur dans un vecteur pcDNA3.1hygro+ a été réalisé par 2 stratégies : par clivage enzymatique et par recombinaison homologue. Pour la stratégie par clivage, le plasmide pTK-SREBP2-HSV a été digéré par l'enzyme SalI dont un site de reconnaissance est situé au début de la séquence promotrice. Cette digestion donnant un bord cohésif, il a été complété avec une polymérase Klenow pour donner un bord franc. Une digestion avec XbaI a ensuite libéré la séquence de 5300 pb comprenant l'insert et le promoteur TK. Le vecteur pcDNA3.1hygro+ a été linéarisé avec l'enzyme NruI qui libère un bord franc, puis le promoteur a été excisé avec l'enzyme NheI. Le fragment de 5300 pb (insert + promoteur TK) et le fragment de 4910 pb du vecteur receveur ont été mis en contact avec une ligase pour relier les bords francs entre eux et les bords cohésifs libérés par XbaI et NheI qui sont compatibles (figure 29). Après transformation dans des bactéries compétentes (DH5 α) les colonies positives ont été amplifiées et la présence de l'insert a été vérifiée en faisant une carte de restriction avec les enzymes EcoR5, HindIII, NheI, NotI et XhoI.



- Digestion du pCMV-Insig1-cMyc par BamH1 et EcoRV

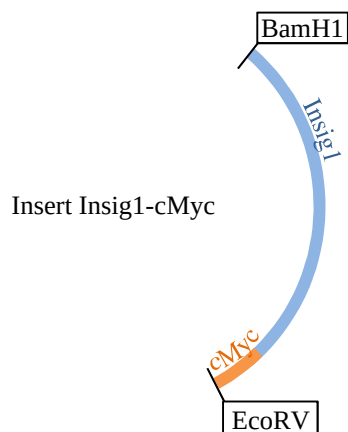
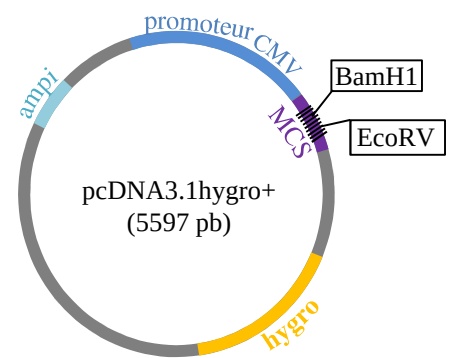
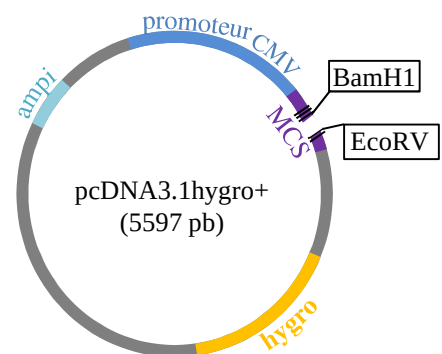


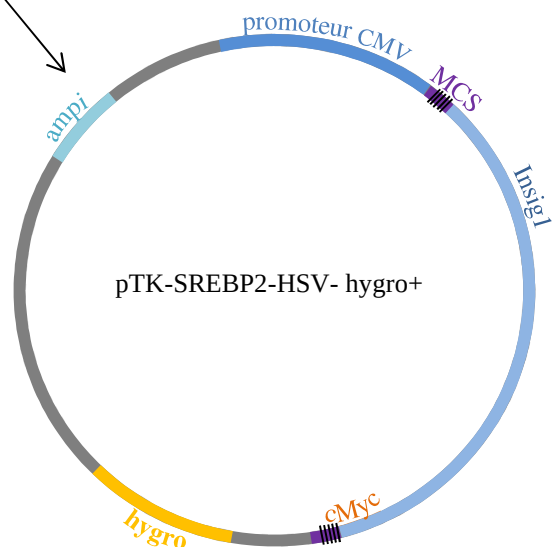
Figure 30 : Stratégie de clonage du plasmide pcDNA3.1hygro+Insig1-cMyc.



- Digestion du pcDNA3.1hygro+ par BamH1 et EcoRV



Ligation des sites de restriction par leurs extrémités complémentaires



Pour le clonage par recombinaison homologue, la séquence contenant le promoteur TK et l'insert a été amplifiée par PCR avec les amorces suivantes :

sens :GCGTTTTGCTCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGACCGGACGGGACGCTCCTG
CGCCTGATAC

antisens :GTGCTGGATATCTGCAGAATTCCACCACACTGGACATTTAGGTGACACTA
TAGAATAGGGCCC. Ces amorces contiennent à leurs extrémités des séquences homologues au vecteur pcDNA3.1hygro+. Ce vecteur a été linéarisé puis transformé avec le produit de l'amplification dans des bactéries compétentes. Les colonies positives sont alors celles dans lesquelles il y a eu recombinaison entre les séquences homologues et formation du nouveau plasmide pTK-SREBP2-HSV- hygro+.

III.2 pCMV-Insig1-cMyc

Le plasmide codant Insig1 est un pCMV comprenant la séquence du gène Insig1 humain sous contrôle d'un promoteur CMV et, en 3' du gène, 10 copies de la séquence codant le tag c-Myc.

Le transfert de l'insert dans le plasmide pcDNA3.1hygro+ a été réalisé par clivage enzymatique comme décrit dans la figure 30. L'insert Insig1-cMyc a été libéré du vecteur pcDNA par digestion avec les enzymes BamHI et EcoRV. Le vecteur pcDNA3.1hygro+ a été linéarisé avec les mêmes enzymes, puis le fragment purifié de 1200 pb de l'insert y a été inséré par ligation et reformation des sites de coupure. Après transformation dans les bactéries compétentes, les colonies positives sont criblées par digestion avec les enzymes PstI et SacII.

IV. Expérimentations *in vivo* : les modèles murins

Toutes les souris sont maintenues dans un cycle jour/nuît de 12h. Les anesthésies sont réalisées par injection intra-péritonéale d'un mélange de xylazine (50 mg/kg) et de kétamine (750 mg/kg). Les procédures et protocoles utilisés ont été approuvés par un comité d'éthique et sont en conformité avec les normes européennes de réglementation en matière d'utilisation d'animaux en expérimentation scientifique.

IV.1 Les souris transgéniques aTgWnt5a

IV.1.1 Génération de la lignée

Dans cette étude nous avons utilisé des souris transgéniques qui surexpriment Wnt5a au niveau du tissu adipeux (souris aTgWnt5a). La génération de ces souris a été réalisée en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris (ICS) à Illkirch-Graffenstaden. Un vecteur pcDNA composé du gène codant pour Wnt5a murin sous contrôle du promoteur FABP4/aP2 (*Fatty Acid Binding Protein 4/adipocyte protein 2*), d'un fragment intronique du gène de la β -globine pour l'épissage et d'une séquence de polyadénylation a été micro-injecté dans le pronucléus mâle d'ovocytes fécondés qui a été ensuite réimplanté dans l'utérus d'une souris femelle pseudo-gestante. Le promoteur du gène FABP4/aP2 est exprimé principalement dans le tissu adipeux. Les individus F0 sont ensuite croisés avec des sauvages pour créer la lignée. La présence du transgène est vérifiée pour chaque souris par amplification de deux séquences d'ADN génomique : 1) la fin du promoteur et le début de la séquence de Wnt5a (sens : GTGAGCTATCTGGACTTCAGAGGC, antisens : CCCTTTCTCTAGCGTCCACG) et 2) la fin de Wnt5a et le motif de la β -globine (sens : CAACTACATCCTGGTCATCATCCT, antisens : AGGTCTTGTTGCACAGGCGT).

IV.1.2 Purification des adipocytes des souris aTgWnt5a

Les adipocytes sont purifiés à partir du tissu adipeux blanc périgonadique. Après dissection, le tissu blanc est découpé au scalpel en petits morceaux qui sont incubés à 37°C sous agitation pendant 1h avec du tampon de digestion Krebs Ringer Bicarbonate (NaCl 118 mM, KCl 41,8 mM, CaCl₂ 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, BSA 0,1%, collagénase type II (Sigma-Aldrich) 3mg/ml). Une centrifugation à 400 g pendant 2 min permet d'éliminer les débris et les adipocytes se retrouvent à flotter sur le tampon. Ils sont récupérés à la pipette, déposés dans un nouveau tube contenant du tampon de lavage (identique au tampon de digestion excepté que la collagénase est remplacée par 5 mM de glucose) puis centrifugés une nouvelle fois. Les adipocytes sont ensuite récupérés soit dans du tampon de lyse RIPA pour extraire les protéines, soit dans le TRI reagent pour extraire les ARN.

IV.1.3 Dosage des lipides du tissu adipeux blanc

Le cholestérol total du tissu adipeux blanc des souris transgéniques et sauvages a été quantifié avec le kit « cholesterol/cholesteryl ester quantitation kit » (Clabiochem-EMD Biosciences, San Diego, CA). Selon la procédure, une quantité fixe de tissu est dissoute dans du chloroforme 1% Triton-100x puis centrifugée à 11700 g 10 min à température ambiante. La phase organique est alors récupérée puis le chloroforme est évaporé à 55°C. Les lipides présents sur les parois du tube sont dissous dans le tampon fourni dans le kit. Le cholestérol est ensuite mesuré par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 545 nm.

IV.1.4 Colorations histologiques

Pour pouvoir observer la structure du tissu adipeux des souris sauvages et transgéniques, des morceaux de tissu sont fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% au minimum 24h puis rincés au PBS 1X et transférés dans un bain d'éthanol 70%. Ils sont inclus à la plateforme d'histologie de l'IGBMC par un système automatisé qui réalise une succession de bain d'éthanol pour déshydrater le tissu (éthanol 70%, 80%, 90%, absolu) puis des bains d'histosol et enfin de paraffine liquide. Les blocs solides sont ensuite coupés au microtome en sections de 5 µm d'épaisseur. Les sections sont déposées sur des lames de verre traitées pour optimiser l'adhérence de la coupe (lame Superfrost+, ThermoScientific).

Les coupes de tissus adipeux blanc et brun ont été colorées à l'Hématoxyline/Eosine. Afin de comparer les tailles des adipocytes, l'aire de chaque cellule a été mesurée avec le logiciel de traitement d'image ImageJ grâce à une macro conçue spécialement pour cette tâche. La macro donne l'aire moyenne des cellules d'un champ et pour chaque souris une dizaine de champs est quantifiée.

IV.1.5 Induction des macrophages péritonéaux

Pour récupérer des macrophages en quantité importante, la méthode la plus utilisée consiste à induire une inflammation au niveau péritonéal (Zhang et al., 2008). Chez les souris aTgWnt5a et leur contrôle, l'inflammation a été induite par injection intra-péritonéale de 1 ml de bouillon de thioglycolate (29 g de poudre « bouillon de thioglycolate » (Merck Millipore) dans 1 L d'eau). 3 jours après l'injection, du PBS 1X a été injecté également en intra-péritonéal, puis récupéré après un massage de l'abdomen. Les macrophages présents dans la solution ont été directement lysés pour extraire les ARN totaux.

IV.2 Les souris sm22Wnt5a-

IV.2.1 Génération de la lignée

Des souris possédant des sites loxP encadrant l'une des copies du gène codant Wnt5a (souris hétérozygotes Wnt5a lox/wt) ont été générées en collaboration avec l'ICS. Au laboratoire, ces souris ont été croisées entre elles pour obtenir des souris homozygotes Wnt5a lox/lox. Afin d'accroître la susceptibilité des souris à développer des plaques sous l'effet du régime, elles ont été croisées avec des souris invalidées pour le gène du récepteur aux LDL (souris LDLR -/-). Les souris Wnt5a lox/lox ; LDLR-/- ont été ensuite croisées avec des souris portant une copie du gène de la recombinaise Cre sous le contrôle du promoteur sm22 spécifique des cellules musculaires lisses (souris sm22Cre+) ou avec les contrôles sm22Cre-. Une seule copie de la Cre recombinaise est suffisante pour invalider le gène porteur des sites loxP. Il a alors été obtenu des souris Cre+, sm22Wnt5a lox/lox, LDLR-/-; et leur contrôle Cre-, sm22Wnt5a lox/lox, LDLR-/- . Pour simplifier la lecture dans la suite de ce manuscrit, les premières seront nommées sm22Wnt5a- et les secondes sm22Wnt5a+.

IV.2.2 Régime athérogène

Les souris sont nourries avec un régime riche en cholestérol (de type Paigen) pour induire l'apparition de plaques d'athérosclérose. La nourriture est composée de 250 g de beurre à 82% de matière grasse, 12.5 g de cholestérol, 5 g d'acide cholique et de 775 g de farine A03 (SAFE) mélangé à 250 ml d'eau.

IV.2.3 Dissection et coloration des aortes

Au terme du régime Paigen, les souris sont anesthésiées puis une perfusion cardiaque avec une solution de PBS 1X élimine le sang de tous les organes. Pour les coupes en face et les colorations des aortes entières uniquement, du PFA 4% est ensuite perfusé après le PBS 1X afin de fixer les tissus. L'aorte est récupérée de la crosse jusqu'à la bifurcation iliaque et débarrassée du tissu adipeux qui l'entoure. Elle est ensuite coupée dans sa longueur et fixée sur un support pour donner ce que l'on nomme une coupe en face. Les lésions sont colorées au Sudan IV qui marque en rouge les lipides neutres. Les aortes ainsi marquées sont photographiées puis l'aire totale de lésions est quantifiée dans le logiciel ImageJ.

IV.2.4 Dissection des embryons

Les souris mâles et femelles sm22Wnt5a⁻ et sm22Wnt5a⁺ mis ensemble dans une cage pendant une nuit. Ils sont séparés le matin et les femelles présentant des bouchons vaginaux sont disséquées 14,5 jours ou 18,5 jours après le croisement. Les embryons entiers sont immédiatement anesthésiés par le froid et fixés dans du PFA 4% pour être ensuite inclus en paraffine.

IV.3 Souris sm22LRP1-

IV.3.1 Génération de la lignée

L'article (Boucher et al., 2003) décrit la procédure utilisée pour générer les souris sm22LRP1-, qui est identique à celle utilisée pour les souris sm22Wnt5a-.

IV.3.2 Traitement au chlorure de lithium

Le chlorure de lithium est ajouté à l'eau de boisson des souris à raison de 10 mg par kg et par jour. Nous avons évalué la consommation d'eau des souris durant 3 semaines avant le début du protocole et adapté la concentration du LiCl en fonction. Les souris sont mises sous régime Paigen pendant 2 mois, et la consommation d'eau est mesurée régulièrement afin d'ajuster la concentration de LiCl si nécessaire. Le groupe contrôle recevait de l'eau sans LiCl à volonté. Les aortes sont ensuite récupérées et colorées au Sudan IV selon les procédures utilisées pour les souris sm22Wnt5a- décrite en IV.2.3.

IV.3.3 Injection de Wnt5a purifiée

Des souris sm22LRP1- âgées de 2 mois sont mises sous régime Paigen. Au premier jour du régime, des injections intrapéritonéales de protéine Wnt5a purifiée (25 µg/kg) ou du même volume de solution mock stérile sont réalisées. Les aortes sont ensuite récupérées et colorées au Sudan IV selon les procédures utilisées pour les souris sm22Wnt5a- décrite en IV.2.3.

Résultats // Partie I

Caractérisation de la voie de signalisation LRP1/Wnt5a mise en jeu dans la régulation du métabolisme du cholestérol.

Les précédents travaux de l'équipe avaient révélé l'existence d'une voie de signalisation LRP1/Wnt5a qui protège les cellules de l'accumulation de cholestérol (Terrand et al., 2009). Ni les mécanismes d'activation de cette voie ni ses effets sur le métabolisme du cholestérol n'ont été décrits. Dans cette première partie du projet de thèse, nous avons utilisé les modèles cellulaires de cette précédente étude, les MEF sauvages (LRP1+/+), LRP1-/-, LRP1-/- retransfectées avec Wnt5a (LRP1-/- ; Wnt5a) et leur contrôle (LRP1-/- ; mock) pour tenter de caractériser cette voie de signalisation LRP1/Wnt5a. Dans un second temps, nous avons analysés les paramètres modifiés *in vitro* par Wnt5a dans un modèle de souris transgéniques qui surexpriment Wnt5a spécifiquement dans le tissu adipeux. Cette approche *in vivo* nous a permis de compléter la caractérisation du rôle de Wnt5a dans le métabolisme du cholestérol. Ce travail fait l'objet d'un article publié dans *Journal of Biological Chemistry* (p 114).

I. La régulation de l'expression de Wnt5a par LRP1

Nous avons commencé par identifier le mécanisme par lequel LRP1 entraînait l'expression de Wnt5a. En effet, notre équipe a montré que l'expression de Wnt5a, en ARNm comme en protéine, est fortement diminuée dans les MEF LRP1-/- (Terrand et al., 2009). Nous avons observé de la même façon que l'invalidation de LRP1 dans les CMLv des aortes de souris entraîne une importante diminution de l'expression de Wnt5a dans ces cellules (Woldt et al., 2012). Ceci indique que le récepteur LRP1 est nécessaire à l'expression de Wnt5a.

Nous avons émis l'hypothèse que l'expression de Wnt5a est stimulée par le TGFβ1 via le récepteur LRP1 en nous basant sur plusieurs observations :

- Le traitement de cellules, notamment de CMLv des voies aériennes humaines, par du TGFβ1 entraîne une augmentation de l'expression de Wnt5a (Katoh, 2009; Kumawat et al., 2013), mais les mécanismes à l'origine cette régulation ne sont pas connus.
- *In vitro* LRP1 a été identifié comme étant identique au TGFβ-receptor V (Huang et al., 2003; Tseng et al., 2004). Il fixe le TGFβ1 ce qui inhibe la croissance chez tous les types cellulaires utilisés : MEF, cellules épithéliales pulmonaires saines et cancéreuses, cellules d'ovaires de hamster (CHO *Chinese Hamster Ovary*).

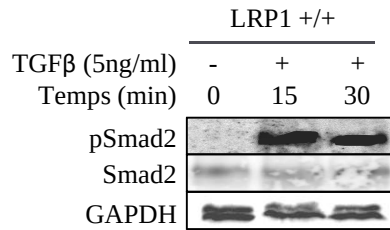


Figure 31 : Activation de la voie Smad2 par le TGFβ1. Analyse par western blot de l'expression de Smad2 et de Smad2 phosphorylée (pSmad2) dans les MEF LRP1+/+ après traitement de 15 min et 30 min par 5ng/ml de TGFβ1.

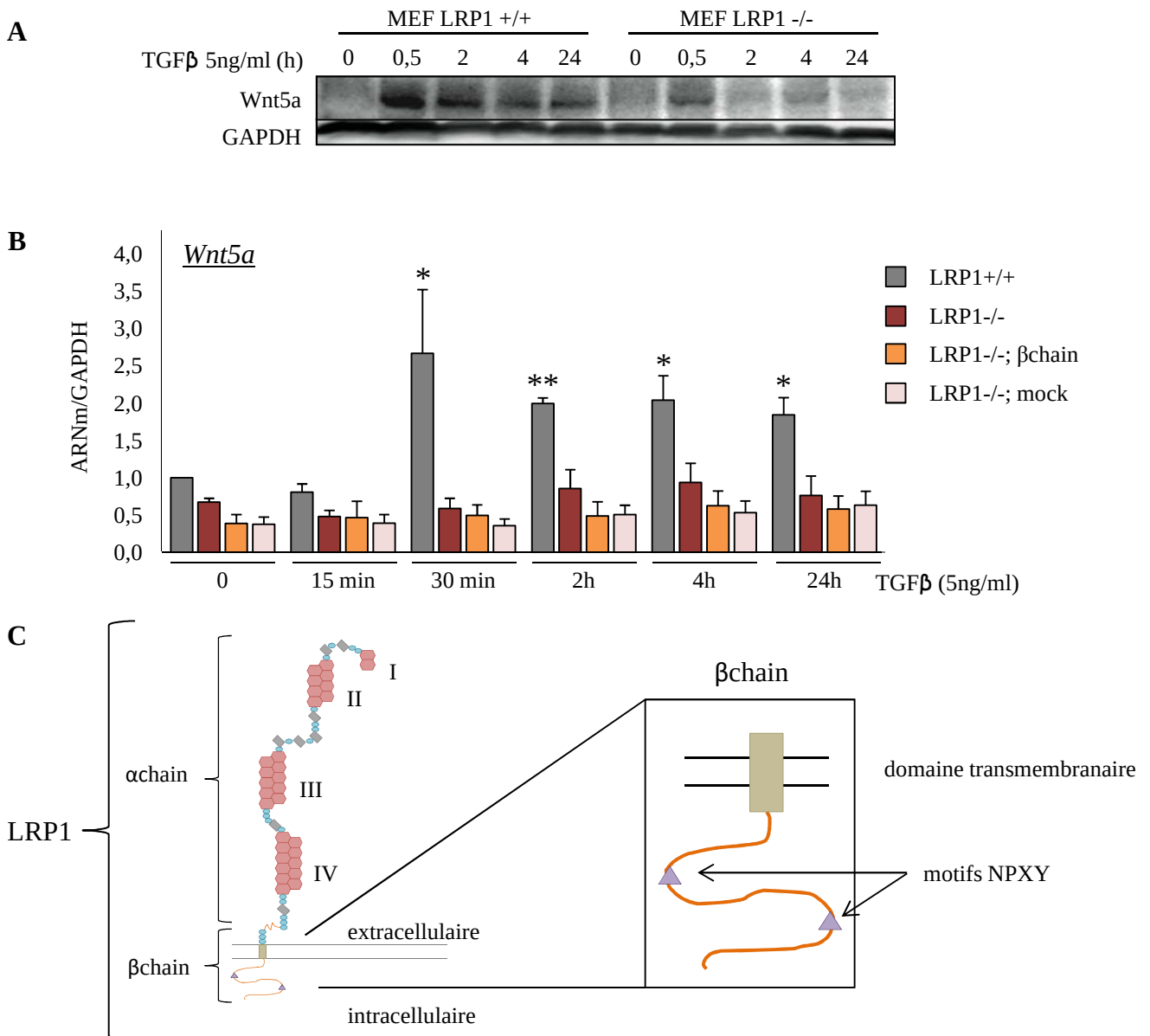


Figure 32 : TGFβ1 induit l'expression de Wnt5a via le domaine extracellulaire de LRP1. **A.** Analyse par western blot de la quantité de protéine Wnt5a dans les MEF LRP1+/+ et LRP1-/- après traitement avec 5 ng/ml de TGFβ1 durant les temps indiqués. **B.** Analyse par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) de la quantité d'ARNm de Wnt5a dans les MEF LRP1+/+, LRP1-/-, LRP1-/- retransfectées avec le domaine cytoplasmique de LRP1 (βchain) ou avec un plasmide vide (mock) après traitement avec 5 ng/ml de TGFβ1 durant les temps indiqués (n = 4). **C.** Représentation schématique du domaine cytoplasmique de LRP1 (βchain).

- *In vivo* LRP1 réprime une voie de signalisation TGF β , ce qui protège de l'athérosclérose en limitant la prolifération des CMLv (Boucher et al., 2007).

Toutes ces informations suggèrent que LRP1 pourrait être le récepteur par lequel TGF β 1 exerce cette régulation positive sur l'expression de Wnt5a.

Afin de déterminer si LRP1 est effectivement nécessaire à l'induction de l'expression de Wnt5a par TGF β , nous avons traité les MEF LRP1^{+/+} et LRP1^{-/-} par du TGF β 1 recombinant. Les facteurs qui assurent la transduction du signal lorsque la voie TGF β est activée sont les protéines cytoplasmiques Smad. Lorsque les récepteurs au TGF β sont stimulés par le ligand, Smad2 et son partenaire Smad3 sont phosphorylées et elles s'associent à Smad4. Les Smad ainsi complexées transloquent dans le noyau cellulaire pour activer leurs gènes cibles (Heldin et al., 1997; Moustakas et al., 2001; Nakao et al., 1997). Nous avons commencé par vérifier que le TGF β 1 recombinant était efficace pour activer la phosphorylation de la protéine Smad2. Après 15 min et 30 min de traitement des MEF LRP1^{+/+} par 5ng/ml de TGF β 1, nous pouvons observer par western blot la présence de Smad2 phosphorylée (figure 31). Cette activation de Smad2 montre que le TGF β 1 recombinant est intègre et est en mesure d'activer sa signalisation dans les MEF.

Nous avons ensuite testé l'hypothèse selon laquelle le TGF β 1 active l'expression de Wnt5a via LRP1 en mesurant les quantités d'ARNm et de protéine Wnt5a dans les MEF LRP1^{+/+} et LRP1^{-/-} traitées avec 5ng/ml de TGF β 1 pendant différents temps. Dans les MEF LRP1^{+/+}, on observe que la quantité de protéine Wnt5a est augmentée dès 30 min de traitement et reste élevée jusqu'à 24h. En revanche, dans les MEF déficientes pour LRP1, l'expression protéique n'est pas induite (figure 32.A). Au niveau de l'activité transcriptionnelle de Wnt5a, on observe une augmentation significative de l'ARNm à partir de 30 min de traitement qui se maintient jusqu'à 24h dans les MEF LRP1^{+/+}, mais pas d'augmentation dans les MEF LRP1^{-/-} quelle que soit la durée du traitement (figure 32.C). Ces données montrent que LRP1 est nécessaire à l'induction de l'expression de Wnt5a par le TGF β 1.

Pour identifier quel domaine de LRP1 est impliqué dans cette régulation de l'expression de Wnt5a par le TGF β 1, nous avons utilisé une lignée de MEF LRP1^{-/-} exprimant de façon stable uniquement le domaine intracellulaire de LRP1 (β chain) (figure 32.C). Dans ces MEF LRP1^{-/-} ; β chain, le TGF β ne peut donc pas interagir avec le domaine extracellulaire du LRP1. Dans ces cellules comme dans leur contrôle transfectées avec un plasmide vide (mock), on n'observe pas d'augmentation de la quantité d'ARNm de Wnt5a

après traitement par le TGF β 1 (figure 32.B). On peut conclure de cette expérience que le domaine extracellulaire de LRP1 est nécessaire à l'induction de Wnt5a par le TGF β 1.

Le récepteur LRP1, particulièrement son domaine extracellulaire, est indispensable à l'activation de l'expression de Wnt5a par le TGF β 1.

II. La régulation du métabolisme du cholestérol par Wnt5a *in vitro*

Notre équipe avait observé que par rapport aux MEF LRP1+/+ qui expriment de grandes quantités de Wnt5a, les MEF LRP1-/-, qui n'expriment pas de Wnt5a endogène, accumulent du cholestérol lorsqu'elles sont traitées par un cocktail induisant la différenciation adipocytaire (Terrand et al., 2009). La réexpression de Wnt5a dans ces cellules LRP1-/- limite cette accumulation de cholestérol (Terrand et al., 2009). Nous avons envisagé 3 mécanismes par lesquels Wnt5a pourrait limiter cette accumulation de cholestérol : une diminution de la synthèse endogène ou de l'import ou une augmentation de l'efflux du cholestérol. Nous avons testé ces différentes hypothèses et comparé les niveaux d'expression des principales protéines impliquées dans la synthèse (l'HMGCoA-Reductase, SREBP2), dans l'efflux (les transporteurs ABCA1 et ABCG1) et dans l'import (le LDLR) en présence et en absence de Wnt5a.

II.1 La régulation de l'efflux de cholestérol par Wnt5a

II.1.1 Wnt5a stimule l'efflux de cholestérol

Afin de caractériser l'effet de Wnt5a sur l'efflux du cholestérol, la vitesse d'efflux a été comparée entre des MEF LRP1-/- réexprimant Wnt5a de façon stable (LRP1-/- ; Wnt5a) et leur contrôle transfecté avec un plasmide vide (LRP1-/- ; mock), après traitement par un cocktail de différenciation adipocytaire. Le principe de cette expérience consiste à apporter une quantité connue (ici 15 μ Curies) de cholestérol radioactif (Cholesterol, [1,2-3H(N)]) aux cellules puis à ajouter l'accepteur de cholestérol ApoA-1 pendant un temps fixé. Il faut ensuite observer la répartition de ce cholestérol tritié entre le lysat cellulaire et le milieu de culture en mesurant la radioactivité dans chacun de ces compartiments.

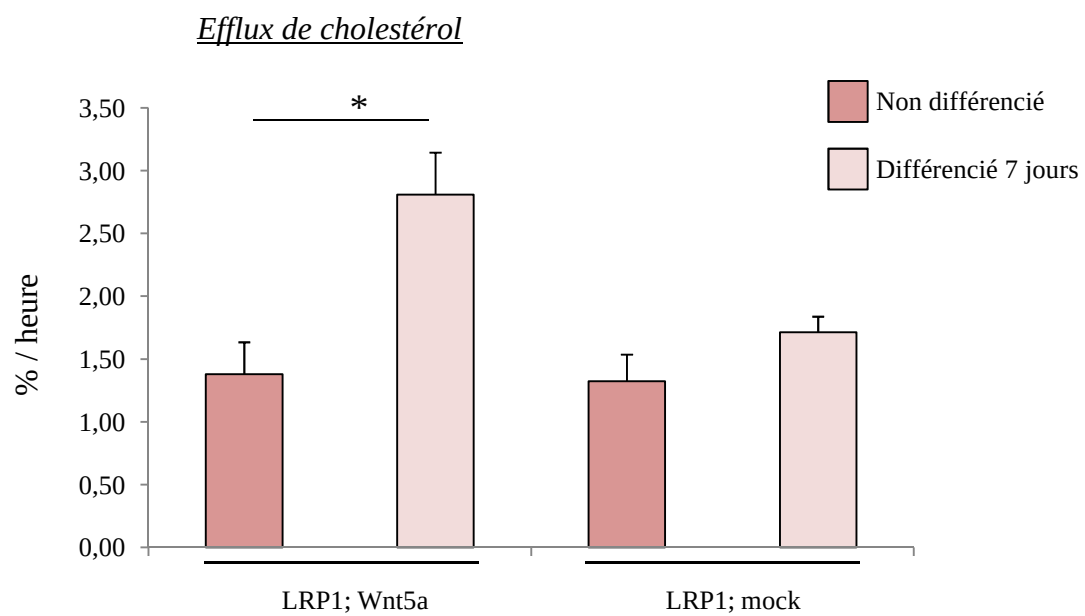


Figure 33 : Wnt5a stimule l'efflux de cholestérol *in vitro*. Calcul du rapport cholestérol tritié dans le milieu/cholestérol tritié total, exprimé en pourcentage par heure, dans les MEF LRP1^{-/-}, Wnt5a et LRP1^{-/-}, mock avant et après 7 jours de traitement par un cocktail de différenciation adipocytaire ($p < 0.05$, $n = 4$).

Cette radioactivité a été quantifiée puis le rapport entre la quantité de radioactivité dans le milieu de culture (RM) et la quantité de radioactivité totale (RT) (radioactivité dans le milieu de culture + radioactivité dans le lysat cellulaire) pour chaque condition a été calculé. Ce rapport donne la proportion de cholestérol tritié transféré des cellules vers le milieu de culture durant le temps de contact avec l'accepteur ApoA-1. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cholestérol tritié exporté par heure et sont présentés dans la figure 33.

Dans les MEF LRP1^{-/-} ; Wnt5a non différenciées, le rapport RM/RT est de 1,5%/heure. Après traitement avec le cocktail de différenciation adipocytaire, le rapport augmente significativement jusqu'à atteindre 3%/heure. Cela indique que la quantité de radioactivité présente dans le milieu de culture est plus élevée lorsque les MEF LRP1^{-/-} ; Wnt5a ont été traitées 7 jours par le cocktail de différenciation adipocytaire que lorsqu'elles ne sont pas traitées. En d'autres termes, le mécanisme d'efflux du cholestérol est stimulé dans ces cellules en réponse au traitement adipogénique. En revanche, dans les MEF LRP1^{-/-} ; mock, le rapport RM/RT ne varie pas de façon significative entre l'état non différencié et l'état différencié. Cela signifie que la répartition de la radioactivité reste identique que les cellules soient traitées ou non par le cocktail de différenciation adipocytaire. Ainsi, ces cellules qui n'expriment pas Wnt5a n'activent pas le mécanisme d'efflux du cholestérol lorsqu'elles sont traitées par le cocktail de différenciation adipocytaire.

Ces données montrent que les MEF LRP1^{-/-} ; Wnt5a et LRP1^{-/-} ; mock exportent le cholestérol avec la même efficacité à l'état basal, et que lorsqu'elles sont traitées par le cocktail de différenciation adipocytaire, seules les MEF exprimant Wnt5a activent l'efflux du cholestérol. On peut conclure de cette expérience que Wnt5a est nécessaire pour l'efflux du cholestérol des cellules.

II.1.2 Wnt5a stimule l'expression de ABCG1

Puisque l'efflux de cholestérol est stimulé par Wnt5a, nous avons mesuré les niveaux d'expression des deux principaux transporteurs responsables de ce mécanisme, ABCA1 et ABCG1, dans les 4 lignées de MEF : LRP1^{+/+}, LRP1^{-/-}, LRP1^{-/-} ; Wnt5a et LRP1^{-/-} ; mock après différenciation adipocytaire.

Nous n'avons pas observé de différence dans les quantités d'ARNm de ABCG1 entre les MEF LRP1^{+/+} et LRP1^{-/-}. En revanche, dans les MEF LRP1^{-/-} ; Wnt5a, la quantité d'ARNm de ABCG1 est augmentée après 10 jours de différenciation par rapport au contrôle LRP1^{-/-} ; mock (figure 34.A). Cette augmentation est retrouvée au niveau protéique, en

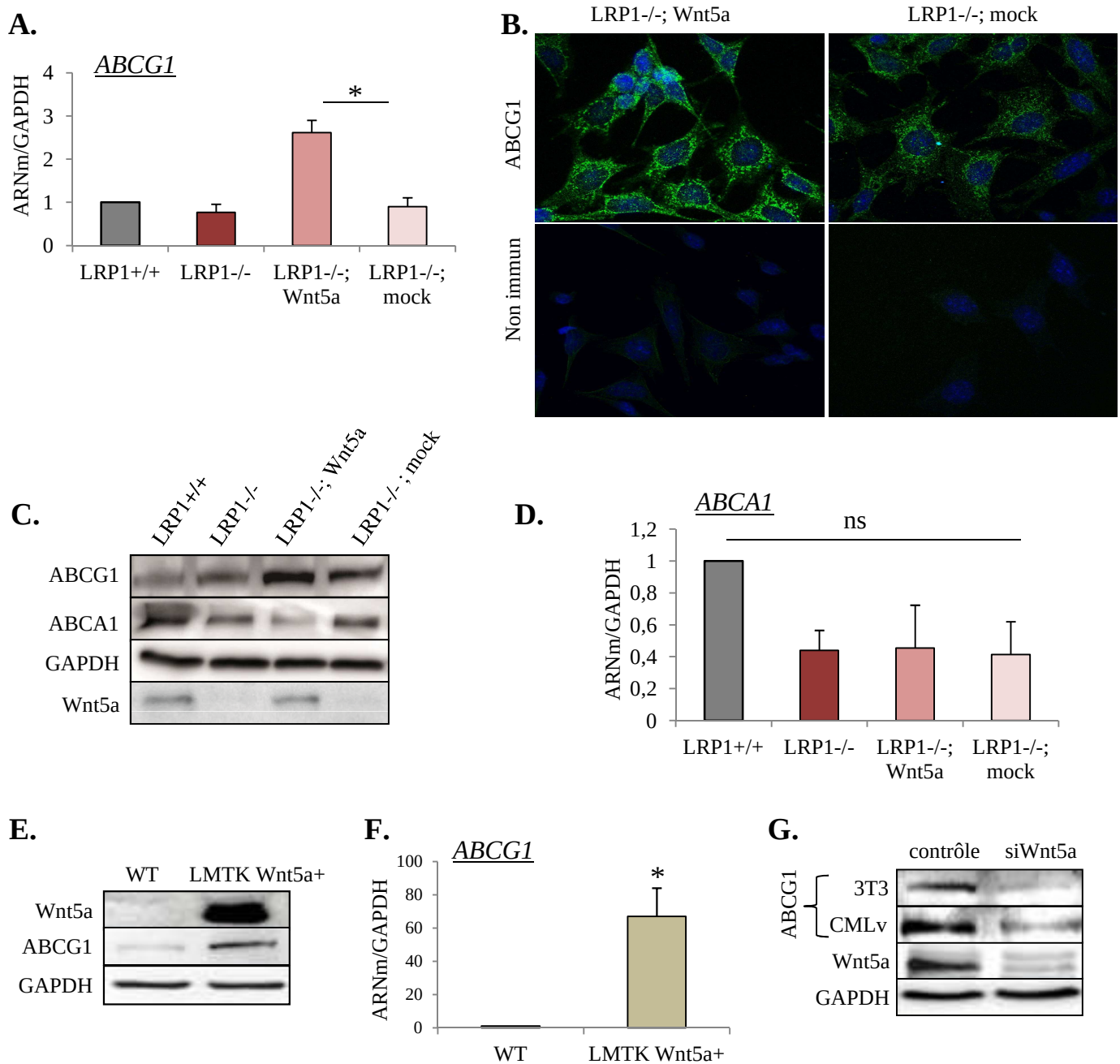


Figure 34 : Wnt5a stimule l'expression de ABCG1. Les expériences sur les MEF ont été réalisées après 10 jours de traitement par le cocktail de différenciation adipocytaire. **A.** Analyse par RT-qPCR de la quantité d'ARNm de ABCG1 dans les lignées de MEF ($p < 0,05$, $n = 7$). **B.** Marquage par immunofluorescence de ABCG1 dans les MEF LRP1^{-/-}; Wnt5a et LRP1^{-/-}; mock fixées ($n = 6$). Vert : ABCG1, bleu : marquage des noyaux au DAPI. **C.** Analyse par western blot des quantités de protéines ABCG1 et ABCA1 rapportées à la GAPDH dans les lignées de MEF ($n = 3$). **D.** Analyse par RT-qPCR de la quantité d'ARNm de ABCA1 dans les lignées de MEF (ns: non significatif, $n = 8$). **E.** Analyse par western blot des quantités de protéine ABCG1 et Wnt5a dans les LMTK. **F.** Analyse par RT-qPCR de la quantité d'ARNm de ABCG1 dans les LMTK ($p < 0,05$, $n = 3$). **G.** Analyse par western blot de la quantité de protéine ABCG1 dans des préadipocytes 3T3L1 et des CMLv en culture transfectées avec un siARN dirigé contre Wnt5a ou un siARN contrôle ($n = 3$).

immunofluorescence comme en western blot (figure 34.B et C). Le niveau d'ARNm de ABCA1 est stable dans les 4 lignées et le niveau de protéine tend à diminuer lorsque LRP1 est absent, que Wnt5a soit exprimée ou non (figure 34.C et D). Ces données montrent que Wnt5a stimule spécifiquement l'expression du transporteur ABCG1 dans les MEF.

Afin de confirmer cette observation, nous avons utilisé un second modèle de fibroblastes : des LMTK surexprimant Wnt5a de façon stable (LMTK Wnt5a+) et leur contrôle sauvage (WT) (figure 34.E). Dans ces LMTK Wnt5a+, nous avons retrouvé une augmentation de l'expression de ABCG1 par rapport aux LMTK WT, aussi bien au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique (figure 34.E et F). L'équipe a par ailleurs montré que l'inactivation par siARN de Wnt5a dans des préadipocytes murins 3T3-L1 et dans une lignée de CMLv humaine entraîne une diminution de la quantité de protéine ABCG1 (figure 34.G). Ces résultats confirment dans trois autres modèles cellulaires que Wnt5a stimule l'expression de ABCG1.

Ces résultats indiquent que l'augmentation de l'efflux en présence de Wnt5a s'accompagne d'une augmentation de l'expression de ABCG1, principale protéine responsable de l'efflux de cholestérol.

II.1.3 L'augmentation de ABCG1 est indépendante des LXR

Nous avons montré que la retransfection de Wnt5a dans les MEF LRP1-/- stimule l'expression de ABCG1 en ARNm et en protéine. Les facteurs de transcription LXR, préférentiellement LXR α , sont les principaux activateurs de la transcription du gène de ABCG1 (Kennedy et al., 2001; Sabol et al., 2005). Nous avons alors émis l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de ABCG1 en présence de Wnt5a résulte de son activation par LXR α .

Lorsqu'il est activé, LXR α cible les éléments LXRE présent sur son propre promoteur et active la transcription de son ARNm (Laffitte et al., 2001). Ainsi, une augmentation de la quantité d'ARNm de LXR α reflète l'activation du facteur de transcription LXR α sur ses gènes cibles. Pour vérifier si l'augmentation de l'ARNm de ABCG1 dans les MEF LRP1-/- ; Wnt5a résulte d'une activation de LXR α , nous avons donc quantifié l'ARNm de ce facteur dans les MEF.

Après traitement avec le cocktail de différenciation adipocytaire, le niveau d'ARNm de LXR α est identique entre les 4 lignées de MEF (figure 35.A), suggérant que ce facteur de transcription n'est pas plus activé lorsque Wnt5a est retransfectée dans les MEF LRP1-/-.

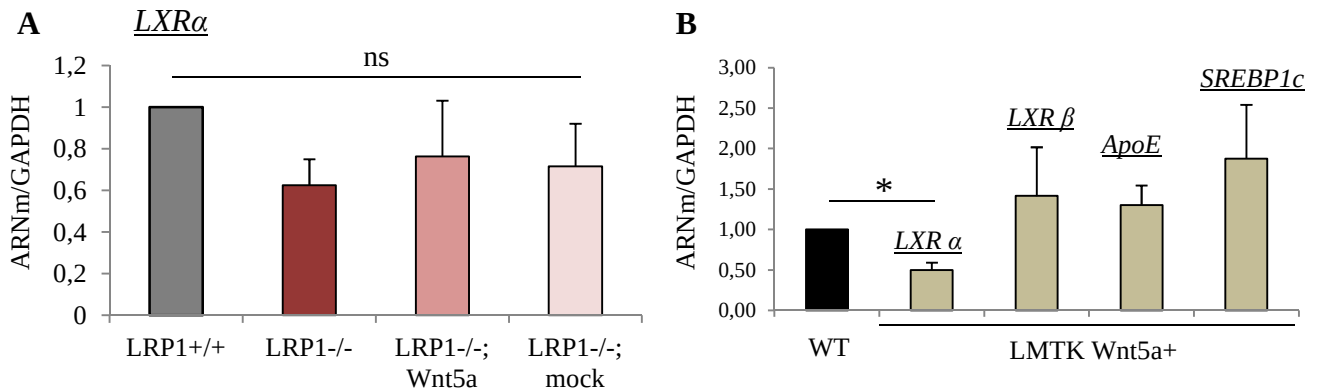


Figure 35 : L'augmentation de l'expression de ABCG1 est indépendante des LXR. A. Analyse par RT-qPCR de l'expression de LXRα dans les MEF LRP1+/+, LRP1-/-, LRP1-/-; Wnt5a et LRP1-/-; mock après 10 jours de traitement par le cocktail de différenciation adipogénique. (ns : non significatif, n= 4) **B.** Analyse par RT-qPCR des niveaux d'ARNm de LXRα et LXRβ ainsi que de deux de leurs gènes cibles, ApoE et SREBP1c, dans les LMTK sauvages et surexprimant Wnt5a (p<0,05, n=4).

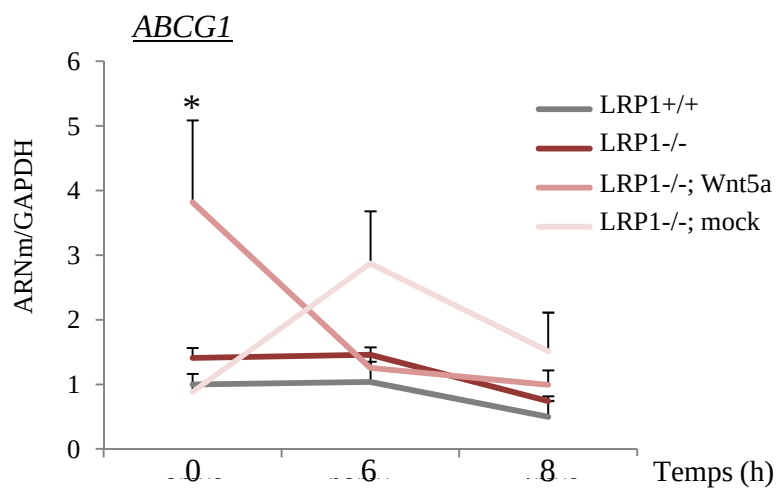


Figure 36 : Wnt5a ne stabilise pas l'ARNm de ABCG1. Analyse par RT-qPCR des quantités d'ARNm de ABCG1 dans les lignées de MEF LRP1+/+, LRP1-/-, LRP1-/-; Wnt5a et LRP1-/-; mock différenciées pendant 7 jours et après 6h et 8h d'inhibition de la transcription par l'actinomycine D (p<0,05, n = 4).

Dans les cellules LMTK Wnt5a+, qui présentent une induction de ABCG1, nous avons également mesuré les quantités d'ARNm de LXR α , LXR β et de deux gènes cibles des LXR : ApoE et SREBP1c. La quantité d'ARNm de LXR α est diminuée par rapport aux LMTK WT tandis que les quantités d'ARNm de LXR β , ApoE et SREBP1c restent stables entre les deux lignées de LMTK (figure 35.B). Ces résultats montrent que les LXR ne sont pas non plus activés dans les LMTK Wnt5a+. Toutes ces données indiquent que l'augmentation de l'expression de ABCG1 induite par Wnt5a est indépendante de l'activation des récepteurs nucléaires LXR.

II.1.4 Wnt5a ne stabilise pas l'ARNm de ABCG1

Dans les MEF et les LMTK exprimant Wnt5a, nous avons observé une augmentation de l'expression de ABCG1 qui semble indépendante des LXR, les principaux activateurs de la transcription du gène codant ce transporteur. Nous avons alors envisagé l'hypothèse selon laquelle Wnt5a favoriserait la stabilité de l'ARNm de ABCG1. En effet, une augmentation de la quantité d'ARNm d'un gène mesurée par qPCR peut résulter d'une stimulation de la transcription du gène mais également d'une stabilisation de cet ARNm. Pour tester cette hypothèse, l'ARNm de ABCG1 dans les MEF différenciées a été quantifié à différents temps, après avoir bloqué la transcription grâce à l'actinomycine D. Ainsi, nous pouvons comparer la vitesse de dégradation des ARNm de ABCG1 entre chaque lignée et observer si la présence de Wnt5a ralentit cette dégradation.

Sans actinomycine, la quantité d'ARNm de ABCG1 dans les MEF LRP1-/- ; Wnt5a est supérieure à celle dans les autres lignées, ce qui est en accord avec les résultats de la figure 34.A. Après 6h de traitement, le taux d'ARNm de ABCG1 dans les MEF LRP1-/- ; Wnt5a a diminué jusqu'à atteindre un taux identique à celui des autres lignées (figure 36). Ainsi, lorsque la transcription est inhibée, la quantité d'ARNm de ABCG1 est identique dans les 4 lignées de MEF. Cette expérience montre que l'expression de Wnt5a ne favorise pas la stabilisation de l'ARNm de ABCG1.

II.1.5 Wnt5a stimule la transcription de ABCG1

Les LXR ne semblent donc pas impliqués dans l'activation de l'expression de ABCG1 par Wnt5a, et Wnt5a ne stabilise pas l'ARNm de ce transporteur. Il est donc probable que l'augmentation de l'expression de ABCG1 par Wnt5a résulte d'une activation de la transcription du gène mais par d'autres facteurs de transcription que les LXR. En effet, si les

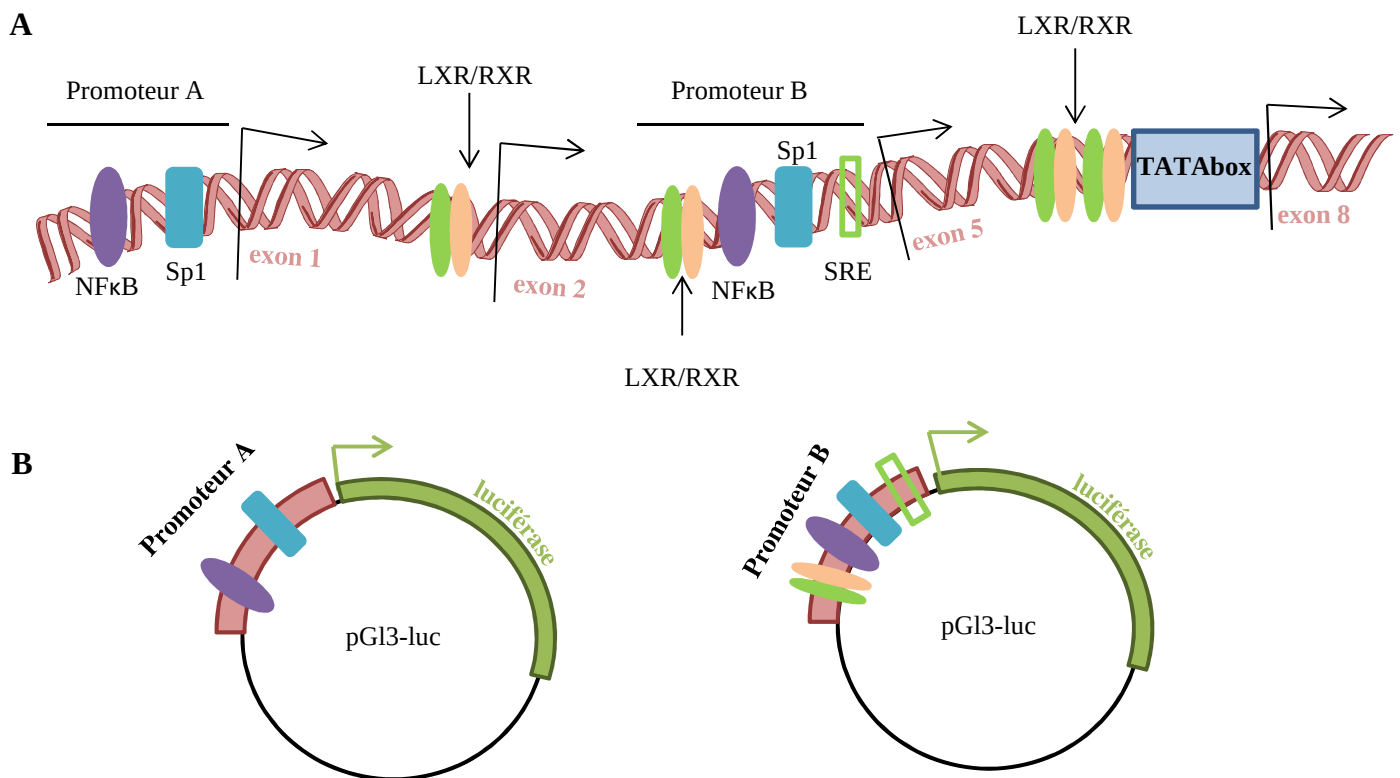


Figure 37 : Le clonage des promoteurs de ABCG1. **A.** Schéma des différents promoteurs du gène codant ABCG1. **B.** Schéma des deux constructions codant les promoteurs en amont des exons 1 et 5 du gène de ABCG1 et transfectées dans les MEF LRP1^{-/-}; Wnt5a et LRP1^{-/-}; mock.

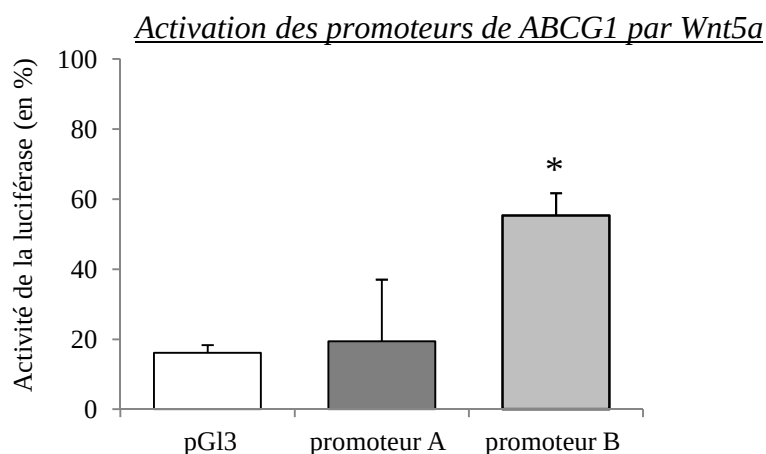


Figure 38 : Wnt5a induit la transcription de ABCG1 via le promoteur en amont de l'exon 5 du gène du transporteur. Mesure de l'activation du gène de la luciférase sous contrôle du promoteur A ou du promoteur B de ABCG1 dans les MEF LRP1^{-/-}, Wnt5a par rapport aux MEF LRP1^{-/-}, mock, exprimé en pourcentage. pGl3 est un plasmide vide utilisé comme contrôle négatif ($p < 0,05$, $n=3$).

LXR sont les principaux activateurs du gène codant ABCG1, ce gène possède plusieurs promoteurs qui contiennent chacun des séquences cibles de nombreux facteurs de transcription autres que les LXR (*cf* figure 15) (Langmann et al., 2002; Lorkowski et al., 2001; Sabol et al., 2005). Pour tester cette hypothèse, les séquences codant pour les promoteurs A (en amont de l'exon 1) ou B (en amont de l'exon 5) du gène de ABCG1 (Lorkowski et al., 2001) ont été clonées dans un vecteur contenant le gène de la luciférase (pGl4-luc) (figure 37). Ces constructions ont ensuite été transfectées de façon transitoire dans les MEF LRP1^{-/-} ; Wnt5a et LRP1^{-/-} ; mock. L'expression de la luciférase mesurée dans chacune des deux lignées renseigne alors sur l'activation des parties du promoteur de ABCG1. La figure 38 montre, pour chaque promoteur, l'activité de la luciférase dans les MEF LRP1^{-/-} ; Wnt5a par rapport à l'activité dans les MEF LRP1^{-/-} ; mock. Les valeurs représentent ce rapport exprimé en pourcentage d'activité. Un plasmide vide (pGl3) est utilisé comme contrôle.

Pour le promoteur A, le rapport entre l'activité de la luciférase dans les 2 lignées de MEF est identique au rapport observé dans le contrôle pGl3. Ceci indique que ce promoteur n'est activé dans aucune des 2 lignées cellulaires. En revanche, le rapport entre l'activité de la luciférase dans les MEF LRP1^{-/-} ; Wnt5a et celle dans les MEF LRP1^{-/-} ; mock est augmenté lorsque le gène de l'enzyme est sous contrôle du promoteur B de ABCG1. Cela signifie que l'expression de la luciférase sous contrôle du promoteur B est activée dans les MEF LRP1^{-/-} ; Wnt5a, mais pas dans les contrôles (figure 38). Ces données montrent que Wnt5a stimule la transcription de ABCG1 via le promoteur B situé en amont de l'exon 5 du gène codant ce transporteur. Ce promoteur contient un site cible du couple LXR/RXR ainsi que des sites cibles des facteurs de transcription NFκB, Sp1 et SREBP. Puisque nous avons précédemment éliminé l'implication des LXR dans l'activation de l'expression de ABCG1 par Wnt5a, on peut supposer que cette activation passe par l'un des autres facteurs de transcription. Cette hypothèse reste à ce jour à explorer en reproduisant l'expérience avec des constructions dans lesquelles les différents sites concernés seront mutés.

Ces expériences démontrent que Wnt5a active la transcription du gène codant pour ABCG1 via son promoteur situé en amont de l'exon 5, et ceci indépendamment de l'activation des LXR. Cette induction de ABCG1 s'accompagne d'une stimulation de l'efflux de cholestérol.

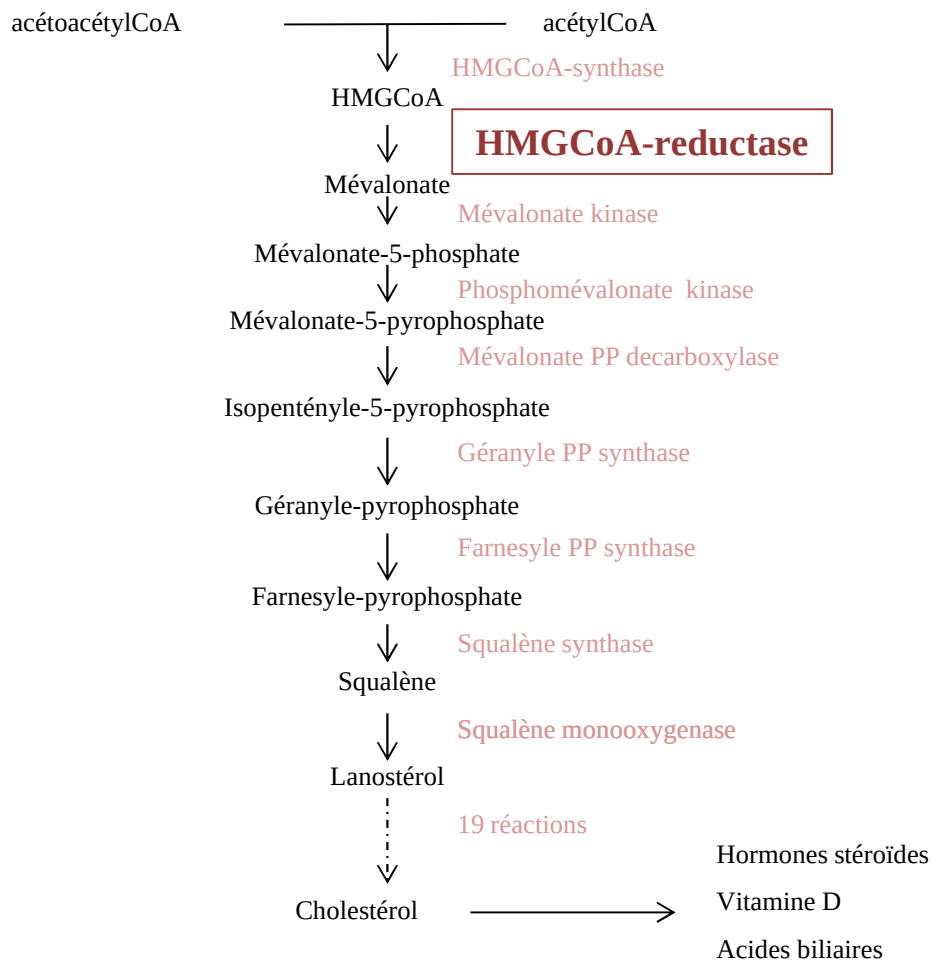


Figure 39 : La voie du mévalonate (rappel figure 7). L'HMGC&A-Reductase est l'enzyme limitante de cette voie.

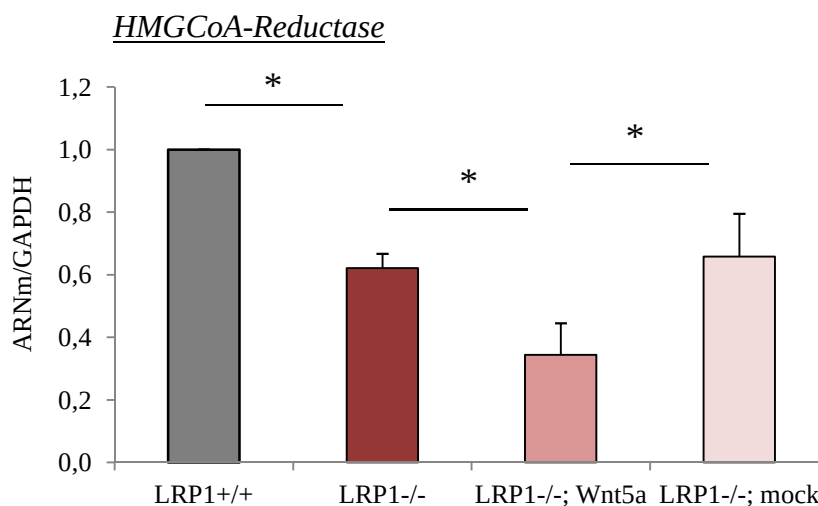


Figure 40 : Wnt5a diminue l'expression de l'HMGC&A-Reductase. Analyse par RT-qPCR de la quantité d'ARNm de l'HMGC&A-Reductase dans les MEF LRP1+/+, LRP1-/-, LRP1-/-; Wnt5a et LRP1-/-; mock après 10 jours de traitement avec le cocktail de différenciation adipogénique ($p < 0,05$, $n = 7$).

II.2 La régulation de la synthèse de cholestérol par Wnt5a

L'équipe a montré que Wnt5a prévient l'accumulation de cholestérol dans les MEF LRP1^{-/-} (Terrand et al., 2009) et les résultats précédents révèlent que ceci passe notamment par une activation de son efflux via le transporteur ABCG1. Dans cette partie du projet, nous nous sommes intéressés à l'hypothèse selon laquelle Wnt5a pourrait également diminuer la synthèse endogène du cholestérol, ce qui contribuerait à limiter son accumulation dans les cellules.

II.2.1 Wnt5a inhibe l'expression de l'HMGCoA-Reductase

La synthèse endogène du cholestérol est assurée par une succession de réactions enzymatiques dont l'HMGCoA-Reductase est l'enzyme limitante (figure 39). Pour connaître l'effet de Wnt5a sur le niveau d'expression de cette enzyme, nous avons mesuré sa quantité d'ARNm dans les lignées de MEF après différenciation adipocytaire. Comme dans la précédente étude du laboratoire (Terrand et al., 2009) (*cf* figure 22), la quantité d'ARNm de l'HMGCoA-Reductase est diminuée dans les MEF LRP1^{-/-} par rapport aux MEF LRP1^{+/+} (figure 40). Nous savons que les MEF LRP1^{-/-} accumulent du cholestérol, qui exerce un contrôle inhibiteur sur sa propre synthèse (*cf* II.5.1.1 de l'Introduction). Ce mécanisme de rétrocontrôle peut expliquer la diminution de l'expression de l'HMGCoA-Reductase.

Lorsque Wnt5a est réexprimé dans les cellules LRP1^{-/-}, l'expression de l'HMGCoA-Reductase est diminuée par rapport aux cellules contrôles LRP1^{-/-} ; mock (figure 40), or les cellules LRP1^{-/-} ; Wnt5a accumulent peu de cholestérol (Terrand et al., 2009) (*cf* figure 21). Cette diminution de l'expression de l'HMGCoA-Reductase ne peut donc être attribuée au seul rétrocontrôle par le cholestérol. Ces résultats indiquent que Wnt5a exerce un effet inhibiteur sur l'expression de l'HMGCoA-Reductase, l'enzyme clé de la voie de synthèse du cholestérol.

II.2.2 Wnt5a inhibe la translocation de SREBP2

L'expression de l'HMGCoA-Reductase est contrôlée par un mécanisme complexe qui active ou inhibe la translocation nucléaire du facteur SREBP2 en fonction du niveau de cholestérol dans la cellule. Pour rappel, lorsque ce niveau est faible, SREBP2 quitte le réticulum endoplasmique (RE), est clivé au niveau de l'appareil de Golgi et sa fraction N-ter migre dans le noyau pour activer ses gènes cibles tels que le gène de l'HMGCoA-Reductase. A l'inverse, lorsque le niveau de cholestérol est élevé, SREBP2 est séquestré dans la

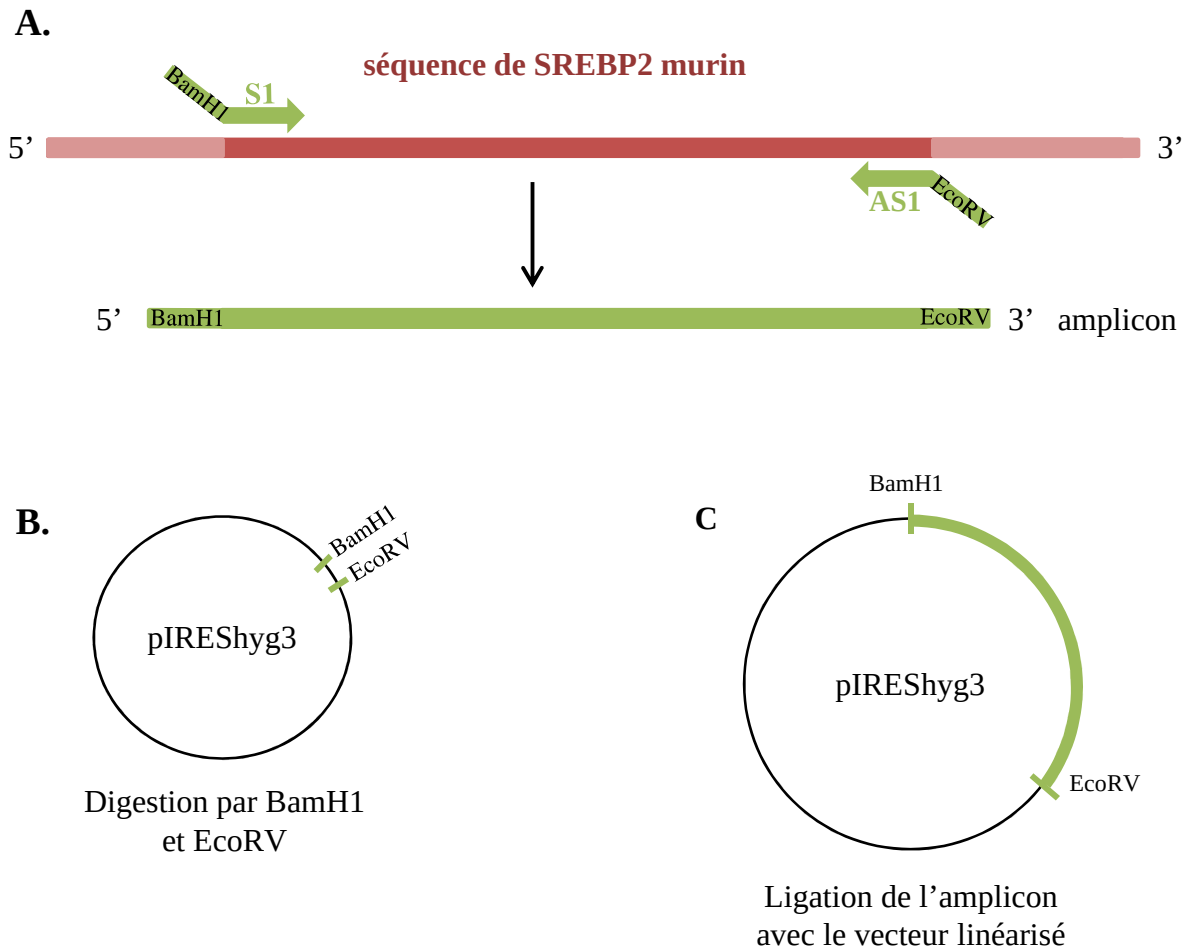


Figure 41 : Stratégie de clonage du gène SREBP2 par PCR. **A.** Amplification de la séquence complète du gène de SREBP2 avec un couple d'amorces sens (S1) et antisens (S2). **B.** Digestion du vecteur par les enzymes de restriction BamH1 et EcoRV. **C.** Ligation de l'amplicon dans le vecteur linéarisé au niveau des bord cohésifs des sites de restriction.

membrane du RE au sein d'un complexe avec les protéines Insig1 et Scap et le taux d'HMGC_oA-Reductase diminue (*cf* figure 10 de l'Introduction).

Dans les MEF LRP1^{-/-} ; Wnt5a, nous observons une diminution de la quantité d'ARNm de l'HMGC_oA-Reductase. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'expression de Wnt5a interfère dans la translocation de SREBP2. Pour tester cette hypothèse, nous avons cloné le gène codant pour SREBP2 et généré des lignées de MEF stables pour ce facteur. Ces cellules stables doivent permettre d'observer la répartition des fractions membranaire et nucléaire de SREBP2 en fonction de l'expression de Wnt5a. Les MEF LRP1^{-/-} sont issues de souris LRP1^{-/-} qui ont été générées avec un vecteur contenant une cassette néomycine. De ce fait, elles sont résistantes à l'antibiotique G418. Le plasmide Wnt5a utilisé pour établir les lignées stables de MEF LRP1^{-/-} ; Wnt5a contient une cassette de résistance à la zéocine. Pour pouvoir établir des lignées stables avec de MEF, il fallait donc que le gène de SREBP2 soit exprimé dans un vecteur portant une cassette qui ne soit ni néomycine ni zéocine. Nous avons donc utilisé un vecteur pIRES-hyg3, portant une cassette hygromycine. Certaines difficultés techniques rencontrées lors de ce clonage de SREBP2 et de l'établissement des lignées de MEF stables nous ont contraint à modifier cette stratégie initiale.

II.2.2.1 Les étapes du clonage de SREBP2

- stratégie 1 : clonage de la séquence SREBP2 par PCR :

La première stratégie pour cloner SREBP2 consistait à insérer dans le plasmide d'expression linéarisé la séquence complète du gène SREBP2 obtenue par amplification par PCR. Pour cela, nous avons utilisé comme matrice de l'ADN complémentaire (ADNc) rétrotranscrit à partir des ARN totaux extraits de foie de souris sauvages et comme amorces les séquences sens : AATTAGGATCCAATCGCATGGCGGCGGTTG qui contient un site reconnu par l'enzyme BamH1 et antisens : AATTGATATCCCGGGTCTCTGCTGCCTGC qui contient un site reconnu par l'enzyme EcoRv. Après digestion de l'amplicon et du pIRES_{hyg}3 par BamH1 et EcoRV, l'amplicon peut être inséré dans le vecteur par ligation des sites de restriction identiques (figure 41).

Les conditions de PCR choisies n'ont pas permis d'obtenir d'amplicon. La séquence de SREBP2 est composée d'environ 4500 paires de bases, ce qui est relativement long et rends l'amplification plus difficile. Nous avons donc adapté les conditions de PCR en utilisant une polymérase spécifique des longues séquences (Dreamtaq DNA Polymerase) et en augmentant le nombre de cycles d'amplification. Nous avons également modifié l'origine des

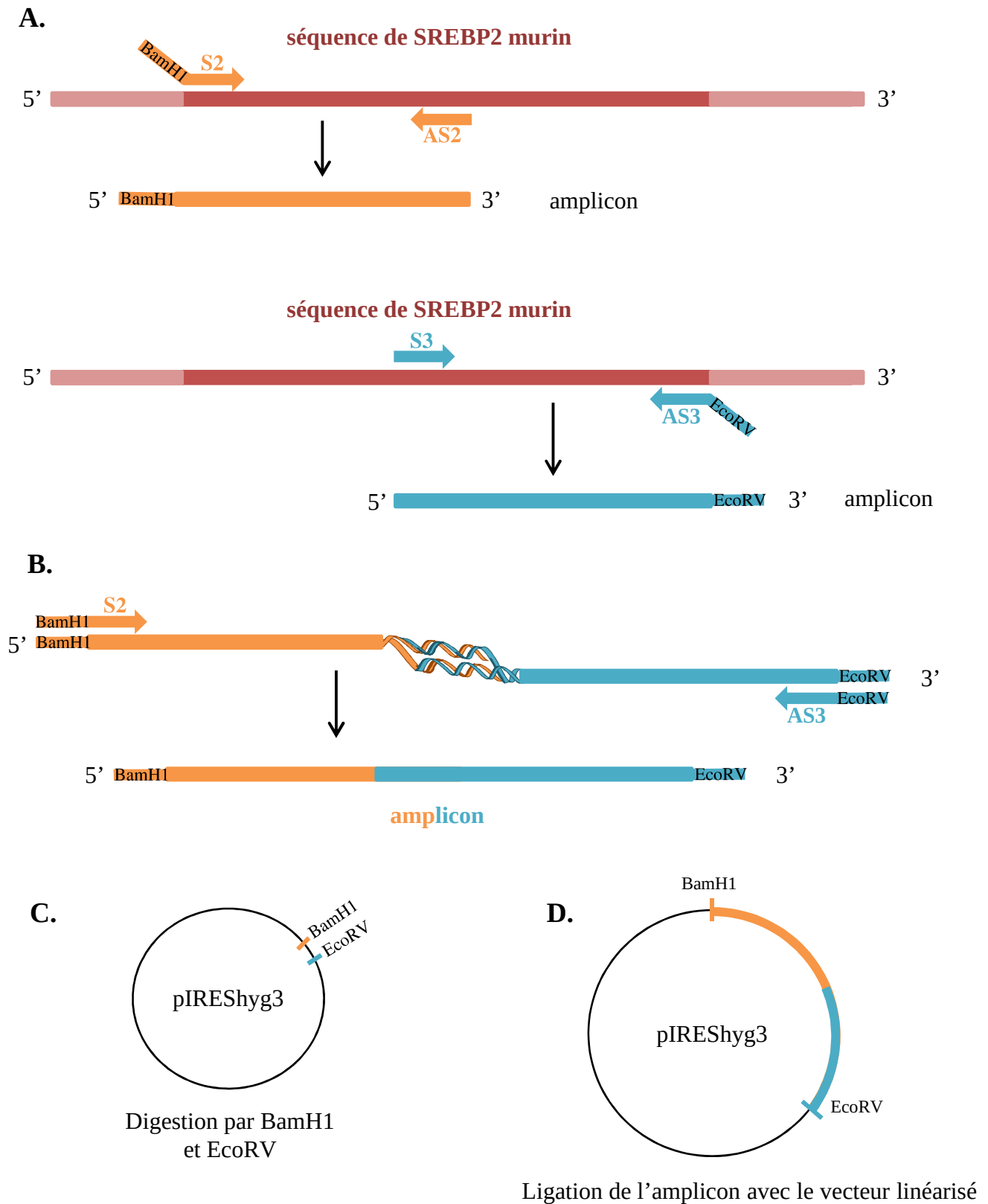


Figure 42 : Stratégies de clonage du gène SREBP2 par PCR en deux parties. **A.** Amplification de chaque moitié de la séquence avec deux couples d'amorces sens (S2 et S3) et antisens (AS2 et AS3) lors de deux réactions distinctes. **B.** Amplification avec comme matrice les deux parties purifiées et les amorces S2 et AS3. Les parties centrales homologues peuvent s'hybrider et l'amplification se poursuit sur toute la longueur de la séquence. **C.** Digestion du plasmide pIRESHyg3 avec BamHI et EcoRV. **D.** Ligation de l'amplicon dans le vecteur linéarisé.

ADNc (foie et cœurs de souris et MEF LRP1+/+) et fait varier la température d'hybridation des amorces. Malgré ces modifications, aucune des conditions de PCR n'a permis d'obtenir un amplicon de SREBP2.

- stratégie 2 : clonage de la séquence SREBP2 par PCR en deux parties :

L'amplification de la séquence complète de SREBP2 n'ayant pas fonctionné, nous avons tenté de réaliser le clonage en 2 étapes afin de s'affranchir de la longueur de la séquence et de concentrer la quantité de matrice. La première étape consistait à amplifier séparément les deux moitiés de la séquence à partir de l'ADNc. Pour cela, nous avons utilisé deux couples d'amorces choisies de sorte que l'extrémité 3' de la première moitié soit chevauchante avec l'extrémité 5' de la deuxième moitié. La seconde étape consistait à réunir les deux moitiés. Pour cela, les deux moitiés de séquence obtenues lors de la première étape étaient purifiées pour être utilisées comme matrice lors d'une PCR supplémentaire avec uniquement les deux amorces externes, sur lesquels sont toujours ajoutés les sites BamH1 et EcoRV. Après le cycle de dénaturation, la température est abaissée jusqu'à atteindre la température d'hybridation des amorces, et à cette étape, les parties chevauchantes homologues des deux moitiés peuvent s'hybrider entre elles. Ceci réunit les deux moitiés et forme une nouvelle matrice codant toute la séquence de SREBP2, encadrée des sites de restriction nécessaires à la ligation dans le vecteur d'expression (figure 42).

La seconde moitié de la séquence a pu être amplifiée puis purifiée sans difficulté. Cependant, la PCR sur la première moitié du gène n'a pas donné d'amplicon, malgré les différentes modifications des conditions expérimentales (augmentation du nombre de cycles d'amplification, variation de la température d'hybridation des amorces). Il n'a donc pas été possible d'aller plus loin dans la réalisation de cette stratégie.

- stratégie 3 : clonage par digestion enzymatique à partir du plasmide pTK-SREBP2-HSV (néo) :

L'amplification de la séquence par PCR n'ayant pas abouti, nous nous sommes procurés auprès du laboratoire de R. de Bose-Boyd (UT Southwestern Medical Centre, Dallas, Texas) le plasmide pTK-SREBP2-HSV codant pour le gène humain de SREBP2 (cf figure 29). Ce plasmide contient une cassette de résistance à la néomycine. Nous avons donc établi une stratégie de clonage par digestion enzymatique afin d'exciser l'insert comprenant le promoteur TK, le tag HSV et la séquence SREBP2 et de le transférer dans un plasmide pcDNA3.1hygro+, fourni par J.M Garnier (IBGMC) contenant une cassette de résistance à l'hygromycine. Ce plasmide a été linéarisé et son promoteur CMV a été excisé lors de la

digestion (figure 29). Les étapes de digestion et de purification des fragments correspondants à l'insert et au pIRESHyg3 débarrassé de son promoteur CMV ont été réalisées. Cependant, après ligation de ces fragments entre eux et transformation dans les bactéries compétentes, aucune colonie positive n'a pu être détectée. Ceci suggère que l'étape de ligation n'a pas été efficace.

- stratégie 4 : clonage par recombinaison homologue à partir du plasmide pTK-SREBP2-HSV (néo) :

Puisque le transfert de l'insert par digestion enzymatique n'a pas abouti, nous avons, avec l'aide de J.M Garnier, tenté une approche par recombinaison homologue entre l'insert (pTK, HSV et SREBP2) et le vecteur pcDNA3.1hygro+ linéarisé. Nous avons amplifié l'insert par PCR avec comme matrice le plasmide pTK-SREBP2-HSV (néo) en utilisant des amorces possédant des séquences homologues aux séquences du vecteur receveur. Lors de la transformation du produit de PCR avec le vecteur linéaire dans les bactéries compétentes, il peut y avoir des événements de recombinaison entre les séquences homologues. Nous avons conçu des amorces avec des séquences homologues encadrant le promoteur CMV, ainsi, il sera éliminé du vecteur lors de la recombinaison. Le plasmide pcDNA3.1hygro-TK-SREBP2-HSV est alors formé et confère aux bactéries une résistance à l'antibiotique de sélection hygromycine. Cette stratégie a donné des colonies positives et nous avons obtenu un plasmide pcDNA3.1hygro-TK-SREBP2-HSV. Nous avons donc procédé à la transfection de ce plasmide dans les lignées de MEF LRP1+/+, LRP1-/-, LRP1-/- ; Wnt5a et LRP1-/- ; mock. Après transfection, nous avons sélectionné les cellules ayant intégré le plasmide à leur génome en traitant les MEF avec l'antibiotique hygromycine afin d'obtenir des lignées stables pour SREBP2. Dans les 4 lignées de MEF, la majorité des cellules sont mortes rapidement tandis que quelques colonies résistantes à l'hygromycine se sont développées. La vérification de l'expression du plasmide dans ces cellules résistantes a été réalisée par western blot avec un anticorps dirigé contre le tag HSV. Bien que les cellules résistent à l'antibiotique, ce qui laisse supposer qu'elles ont intégré le plasmide à leur génome, l'expression de SREBP2-HSV n'a pas pu être observée dans les MEF LRP1-/- ni dans les LRP1-/- ; mock (n = 3 transfections différentes).

L'expression du plasmide codant SREBP2 dans les lignées de MEF n'a pas pu être observée. Nous avons donc choisi d'utiliser une lignée de cellule embryonnaire de rein d'origine humaine (HEK293) pour étudier la translocation de SREBP2.

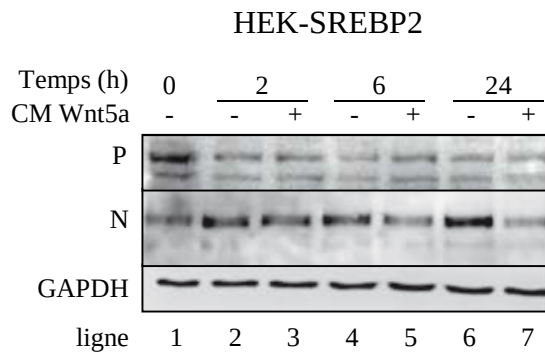


Figure 43 : Wnt5a inhibe la translocation nucléaire de SREBP2. Western blot représentatif de la quantité de protéine SREBP2 dans les fractions membranaire et nucléaire des cellules HEK-SREBP2 après traitement avec du milieu conditionné enrichi en Wnt5a (+) ou du milieu contrôle (-) (n=5). L'anticorps détecte le tag HSV porté par SREBP2. P: précurseur. N: fragment clivé nucléaire.

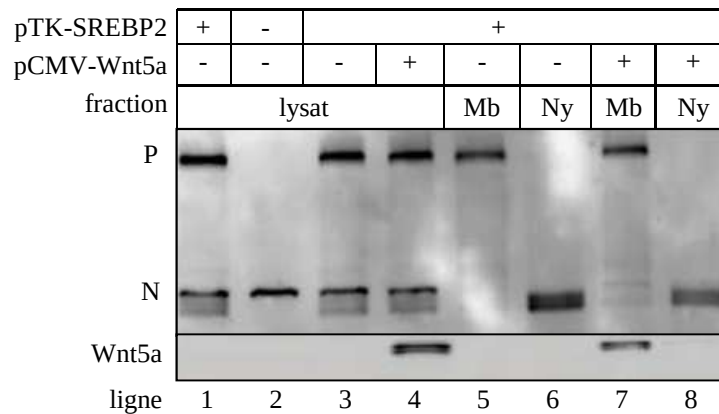


Figure 44 : Wnt5a inhibe la translocation nucléaire de SREBP2. Western blot représentatif de la quantité de SREBP2 dans les HEK293 transfectées de façon stable pour SREBP2-HSV et après transfection transitoire de Wnt5a. Le signal est détecté avec un anticorps dirigé contre le tag HSV porté par SREBP2 (n=5). P : précurseur, N : fragment clivé nucléaire, Mb : membrane, Ny : noyau.

II.2.2.2 Analyse de la translocation de SREBP2 dans les HEK293

Puisque l'expression de SREBP2-HSV dans les MEF n'a pas pu être observée, j'ai établi une lignée stable de HEK293 exprimant le plasmide originel pTK-SREBP2-HSV (néo). Les HEK293 se transfectent facilement et j'ai rapidement obtenu une lignée stable de HEK293 exprimant la protéine SREBP2 taguée avec une séquence HSV (nommées HEK-SREBP2). Le but de cette expérience étant de connaître l'effet de Wnt5a sur la translocation nucléaire de la fraction clivée de SREBP2, deux approches ont été utilisées au laboratoire pour ajouter Wnt5a aux HEK-SREBP2 : 1) le traitement avec du milieu conditionné enrichi en Wnt5a et 2) la transfection transitoire avec un plasmide codant Wnt5a. Le fractionnement des cellules permet d'isoler les compartiments membranaire et nucléaire et de détecter SREBP2-HSV par immunoblot dans chacun d'eux avec un anticorps anti-HSV.

o Traitement par le milieu conditionné Wnt5a

Wnt5a étant une protéine sécrétée, le milieu de culture en contact avec des cellules LMTK Wnt5a⁺ s'enrichit en protéine Wnt5a en restant au contact de ces cellules (CM Wnt5a). Ce milieu est ensuite récolté puis ajouté sur les HEK-SREBP2 pendant différentes durées. Le milieu en contact avec des LMTK sauvages est utilisé comme contrôle négatif (CM mock). La figure 43 montre qu'à partir de 6h de traitement avec le CM Wnt5a, la fraction nucléaire (N) de SREBP2 est diminuée par rapport aux HEK-SREBP2 ayant reçu le CM mock (ligne 5). Cette diminution est retrouvée également après 24h de traitement par le CM Wnt5a (ligne 7). Ces résultats montrent qu'en présence de Wnt5a, la translocation nucléaire de SREBP2 est diminuée.

o Transfection stable de Wnt5a

La seconde approche pour analyser l'effet de Wnt5a sur la translocation nucléaire de SREBP2 consistait à observer la répartition de SREBP2 au sein des compartiments cellulaires après transfection transitoire dans les HEK-SREBP2 d'un plasmide codant pour Wnt5a ou d'un plasmide contrôle. La figure 44 montre qu'après transfection de Wnt5a, la quantité de SREBP2 nucléaire est diminuée par rapport aux cellules transfectées avec le plasmide contrôle (lignes 6 et 8).

Il a été montré que l'ajout d'oxystérols, notamment le 25-hydroxycholestérol (25-HC), dans le milieu de culture des cellules CHO inhibe la translocation nucléaire de SREBP2 (Adams et al., 2004). Afin de comparer les effets inhibiteurs du 25-HC sur la translocation

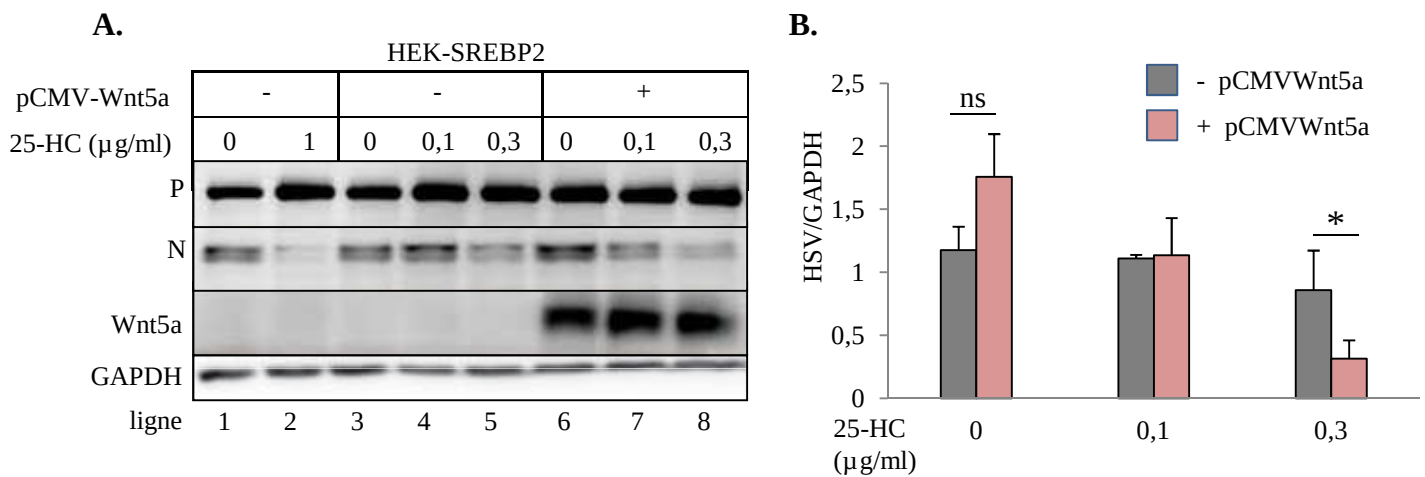


Figure 45 : Wnt5a potentialise l'effet inhibiteur du 25-hydroxycholestérol sur la translocation de SREBP2. **A.** Western blot représentatif de la quantité de SREBP2 dans les HEK293 stables pour SREBP2-HSV après transfection transitoire de Wnt5a (+) ou d'un plasmide contrôle (-) et traitement au 25-HC (n=3). Le signal est détecté avec un anticorps dirigé contre le tag HSV porté par SREBP2. **B.** Quantification de l'intensité des signaux détectés par western blot (p<0,05, n=3). P : précurseur, N : fragment clivé nucléaire.

nucléaire de SREBP2 en présence et en absence de Wnt5a, nous avons ajouté du 25-HC au milieu de culture des HEK-SREBP2 non transfectées et après transfection de Wnt5a. La figure 45.A montre que le traitement des cellules non transfectées par 1 µg/ml de 25-HC inhibe fortement la translocation de SREBP2 (figure 45 lignes 1 et 2) Ce résultat est en accord avec les données de la littérature et fait office de contrôle positif pour nos conditions expérimentales.

Le traitement des HEK-SREBP2 avec des concentrations de 25-HC de 0,1 et 0,3 µg/ml montre que la translocation de SREBP2 est inhibée à partir de 0,3 µg/ml (figure 45, lignes 3, 4, 5). Lorsque l'on associe ces concentrations de 25-HC avec la transfection transitoire de Wnt5a, on remarque que la translocation de SREBP2 est inhibée dès 0,1 µg/ml de 25-HC (figure 45, lignes 6, 7 et 8). Ces données confirment que Wnt5a exerce un effet inhibiteur sur la translocation nucléaire de SREBP2. Par ailleurs, il est à noter qu'avec une dose de 0,3 µg/ml de 25-HC associée à la transfection de Wnt5a, l'inhibition de la translocation est équivalente à celle observée lorsque les cellules sont traitées avec 1 µg/ml de 25-HC seul (figure 45, lignes 2 et 8). Cette observation suggère que Wnt5a potentialise l'effet inhibiteur du 25-HC sur la translocation de SREBP2.

Ces effets inhibiteurs de Wnt5a sur la translocation nucléaire de SREBP2 expliquent la diminution de l'expression de l'HMGCoA-Reductase dans les MEF LRP1-/- réexprimant Wnt5a.

II.2.3 Wnt5a stabilise la protéine Insig1

Lorsque le taux intracellulaire de cholestérol est élevé, celui-ci se fixe à Scap qui interagit alors avec Insig1. Cette interaction ancre le complexe Scap/SREBP2 dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et empêche la translocation nucléaire de SREBP2. A l'inverse, lorsque le taux de cholestérol est faible, le complexe est dissocié de Insig1 et SREBP2 peut transloquer dans le noyau après l'étape de maturation dans l'appareil de Golgi. Insig1 est alors rapidement dégradée par le protéasome (Lee et al., 2006; Tsai et al., 2012). Insig1 est donc une protéine indispensable à la rétention du complexe SREBP2/Scap au niveau de la membrane du RE. D'ailleurs, la transfection de Insig1 dans des cellules ou sa surexpression dans le foie de souris diminue la quantité de SREBP2 nucléaire (Engelking et al., 2004). Nous avons observé que Wnt5a inhibe la translocation de SREBP2 dans le noyau, nous avons donc émis l'hypothèse que cet effet passe par la stabilisation de la protéine Insig1 en présence de Wnt5a.

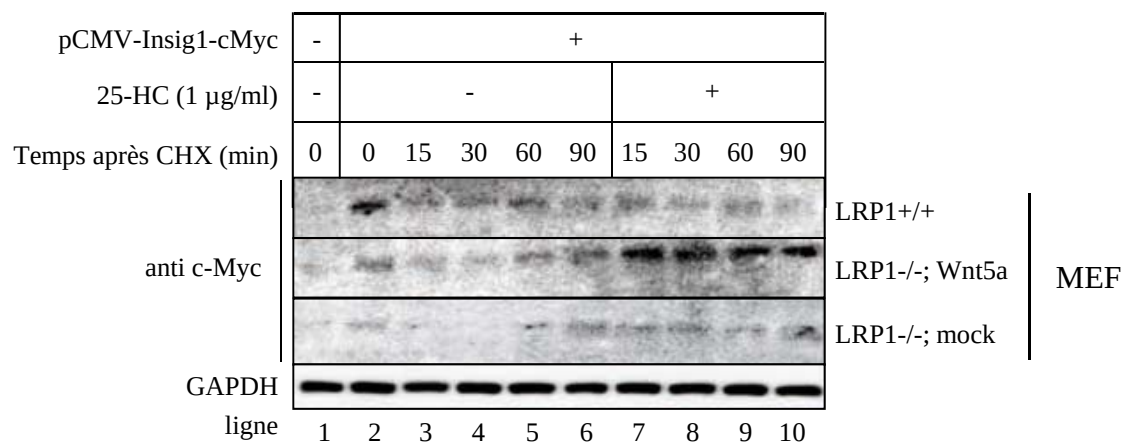


Figure 46 : Wnt5a stabilise la protéine Insig1. Western blot représentatif de la quantité de protéine Insig1 dans les MEF LRP1+/+, LRP1-/-; Wnt5a, et LRP1-/-; mock transfectées avec un plasmide codant pour Insig1-cMyc, avec un anticorps dirigé contre le tag cMyc. 48h après transfection, les cellules ont été traitées avec 1µg/ml de 25-hydroxycholestérol (25-HC) et 100µM de cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la traduction, pendant les temps indiqués (n=4).

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons voulu établir des lignées stables exprimant la protéine Insig1 fusionnée avec un tag, la séquence cMyc. Le plasmide utilisé est un pcDNA3-Insig-cMyc contenant une cassette de résistance à la néomycine. Comme pour l'établissement des lignées de MEF-SREBP2-HSV, nous étions donc confrontés au problème de la résistance des MEF LRP1^{-/-} à la néomycine. Nous avons établi une stratégie de clonage par digestion enzymatique pour transférer l'insert Insig1-cMyc dans le vecteur pcDNA3.1hygro⁺ (cf figure 30). Cette stratégie a permis d'obtenir un plasmide pcDNA3.1hygro3-Insig1-cMyc que nous avons transfecté dans les 4 lignées de MEF. Après sélection des MEF résistantes à l'hygromycine, nous avons contrôlé l'expression du plasmide par western blot avec un anticorps dirigé contre le tag cMyc. Aucun signal n'a pu être détecté dans les MEF LRP1^{-/-} et LRP1^{-/-} ; Wnt5a (n=3).

Au laboratoire, le plasmide pcDNA3-Insig1-cMyc a alors été transfecté de façon transitoire dans les lignées de MEF. Les cellules ont ensuite été traitées avec du 25-HC dans le but de stabiliser Insig1. Pour suivre uniquement la dégradation de la protéine, la néosynthèse a été inhibée par la cycloheximine (CHX). Sans 25-HC, on observe que la quantité de Insig1 est légèrement plus élevée dans les MEF LRP1^{-/-} retransfectées par Wnt5a que dans les MEF LRP1^{-/-} ; mock (figure 46, lignes 2-6). Avec le traitement au 25-HC, la quantité de Insig1 est augmentée fortement dans les MEF LRP1^{-/-} ; Wnt5a par rapport au MEF LRP1^{-/-} ; mock (figure 46, lignes 7-10). Ces données indiquent que la présence de Wnt5a favorise la stabilisation de Insig1 par le 25-HC, ce qui apporte une explication à l'effet inhibiteur de Wnt5a sur la translocation nucléaire de SREBP2 et l'expression de l'HMGCoA-Reductase.

Ces expériences *in vitro* montrent qu'une voie de signalisation activée par TGFβ1 via le domaine extracellulaire de LRP1 permet l'expression de Wnt5a qui stimule l'efflux de cholestérol par ABCG1 et inhibe l'expression de l'HMGCoA-Reductase. Ces deux mécanismes permettent de limiter l'accumulation de cholestérol dans les cellules.

III. La régulation du métabolisme du cholestérol par Wnt5a *in vivo*

Nous avons souhaité vérifier si nos observations quant à l'effet inhibiteur de Wnt5a sur l'accumulation de cholestérol *in vitro* pouvaient s'appliquer au métabolisme du cholestérol *in vivo*. Pour cela nous avons utilisé des souris transgéniques surexprimant Wnt5a

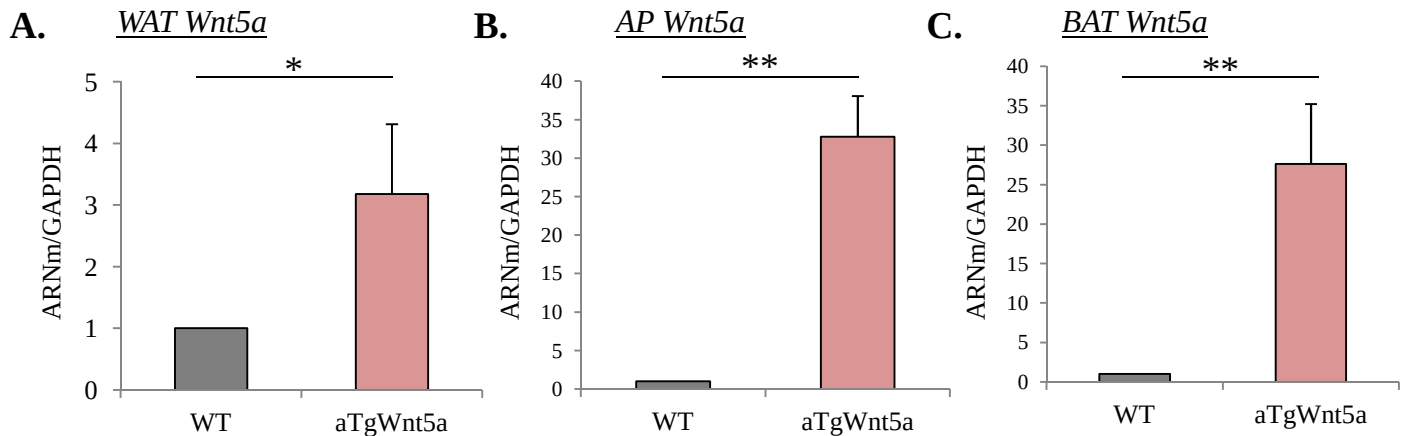


Figure 47 : Surexpression de Wnt5a dans le tissu adipeux. Analyse par RT-qPCR des niveaux d'ARNm de Wnt5a dans (A) le tissu adipeux blanc total (WAT) ($p < 0.05$, $n = 5$), (B) les adipocytes blancs purifiés (AP) ($p < 0.005$, $n = 11$) et (C) le tissu adipeux brun (BAT) ($p < 0.005$, $n = 5$).

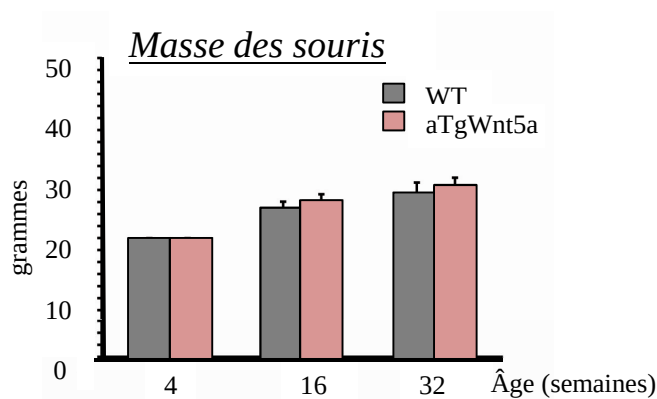


Figure 48 : Wnt5a ne perturbe pas la prise de poids des souris transgéniques. Masse en grammes des souris sauvages et transgéniques âgées de 4, 16 et 32 semaines ($n = 43$).

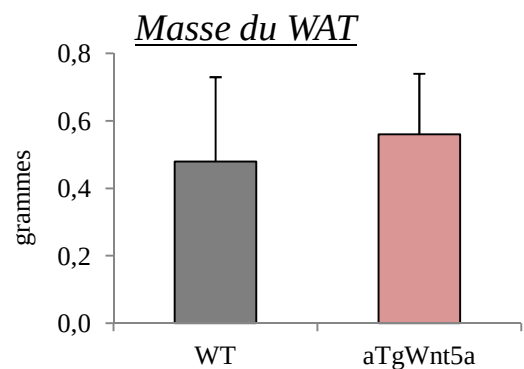


Figure 49 : Wnt5a ne modifie pas la masse du tissu adipeux blanc. Masse en grammes du tissu adipeux blanc périgonadique des souris sauvages et transgéniques âgées de 11 mois ($n = 43$).

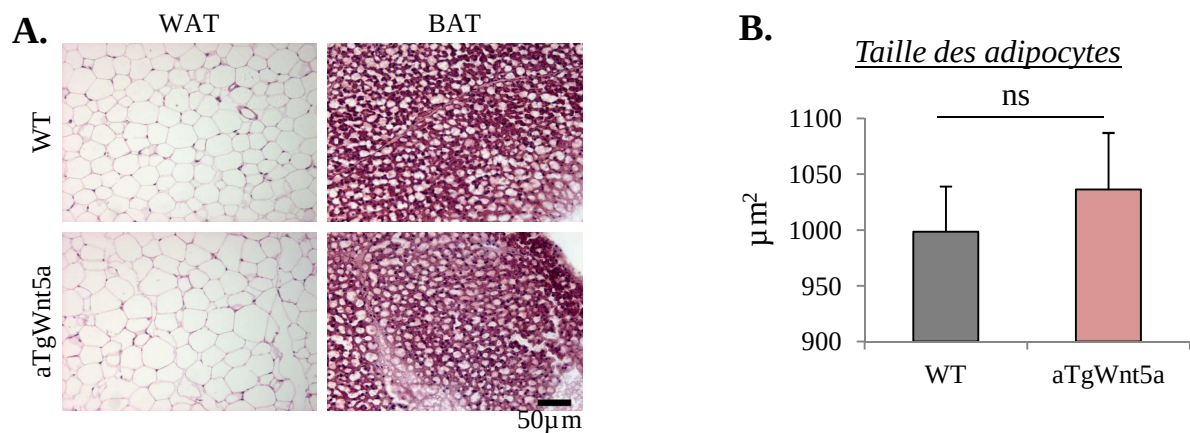


Figure 50 : Wnt5a n'altère pas la morphologie des tissus adipeux des souris. A. Coloration hématoxyline/éosine de tissu adipeux blanc (WAT) et brun (BAT). B. Taille moyenne des adipocytes mesurée avec le logiciel de traitement d'image ImageJ ($n = 3$) ns : non significatif.

dans le tissu adipeux (souris aTgWnt5a). Le tissu adipeux constitue le plus grand stock de cholestérol libre de l'organisme (Krause and Hartman, 1984; Nestel et al., 1969; Prattes et al., 2000), ce qui en fait un modèle approprié pour l'analyse *in vivo* de l'effet de Wnt5a sur le métabolisme du cholestérol. Les analyses ont été réalisées au laboratoire sur le tissu adipeux blanc (*White Adipose Tissue*, WAT) périgonadique, qui est présent en grande quantité chez la souris.

III.1 Validation du modèle

La génération de la lignée de souris transgéniques a été réalisée comme décrit en Matériel et Méthode. La surexpression de Wnt5a a été vérifiée en mesurant la quantité d'ARNm de Wnt5a par qPCR dans les tissus adipeux blanc (WAT) et brun (*Brown Adipose Tissue*, BAT) des animaux. Dans le WAT des souris transgéniques, l'ARNm de Wnt5a est en moyenne 3,5 fois plus exprimé que dans le WAT des souris sauvages, et 35 fois plus lorsque l'on compare les adipocytes purifiés issus des tissus blancs des souris transgéniques et sauvages. Dans le BAT des souris transgéniques, l'ARNm de Wnt5a est environ 25 fois plus exprimé que dans le BAT des souris sauvages (figure 47).

III.2 Caractérisation du phénotype structurel

Dans le cadre d'une étude visant à approfondir le rôle de la signalisation Wnt dans l'adipogénèse, les auteurs ont utilisé des souris transgéniques qui surexpriment une autre protéine Wnt, Wnt10b, également sous contrôle du promoteur FABP4/aP2. Wnt10b ayant un effet inhibiteur sur l'adipogénèse, ces souris transgéniques présentent une diminution de la masse du tissu adipeux de près de 50%, associée à une diminution du nombre d'adipocytes, par rapport aux souris contrôles (Longo et al., 2004).

Au laboratoire, il a été montré que l'invalidation de LRP1 (et donc de Wnt5a) spécifiquement dans le tissu adipeux de souris entraîne une modification de la structure des tissus adipeux brun et blanc périgonadique ainsi qu'une diminution de la masse de ce dernier (Terrand et al., 2009). Il est donc envisageable que la surexpression de Wnt5a puisse également entraîner des modifications de la structure du tissu adipeux. Pour vérifier cette hypothèse, le poids des souris aTgWnt5a et contrôle a été suivi au laboratoire sur 32 semaines. Par ailleurs, nous avons analysé l'histologie des tissus adipeux de ces souris.

La masse corporelle des animaux sous régime standard ne varie pas entre les souris sauvages et les transgéniques du même âge (figure 48), indiquant que la surexpression de

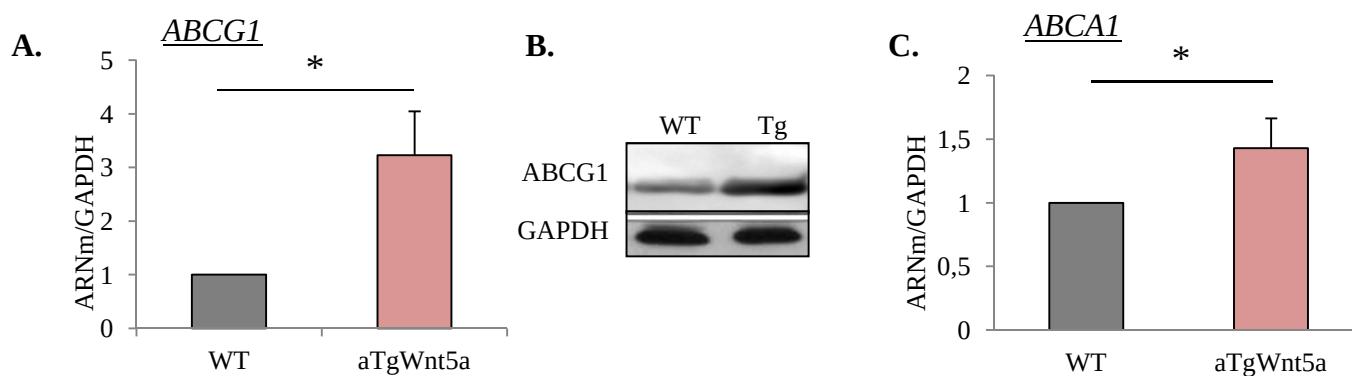


Figure 51 : Wnt5a augmente l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1. Analyse par RT-qPCR et par western blot des quantités d'ARNm de ABCG1 (**A**) et de protéine ABCG1 (**B**) dans le tissu adipeux blanc des souris WT et transgéniques ($p < 0.05$, $n=5$). **C.** Analyse par RT-qPCR de la quantité d'ARNm de ABCA1 dans le tissu adipeux blanc des souris WT et transgéniques ($p < 0,05$, $n=5$).

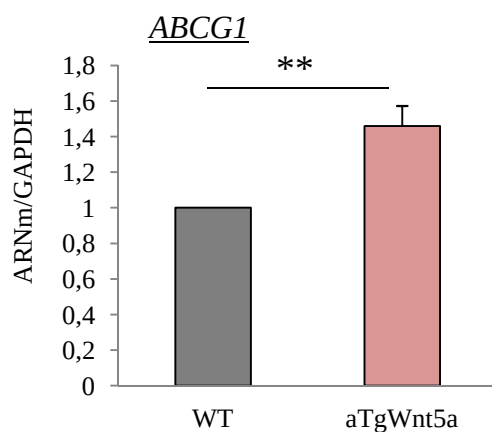


Figure 52 : Wnt5a augmente l'expression d'ABCG1 dans les adipocytes. Analyse par RT-qPCR de la quantité d'ARNm de ABCG1 dans les adipocytes purifiés à partir du tissu adipeux blanc des souris transgéniques et sauvages ($p < 0,005$, $n=11$).

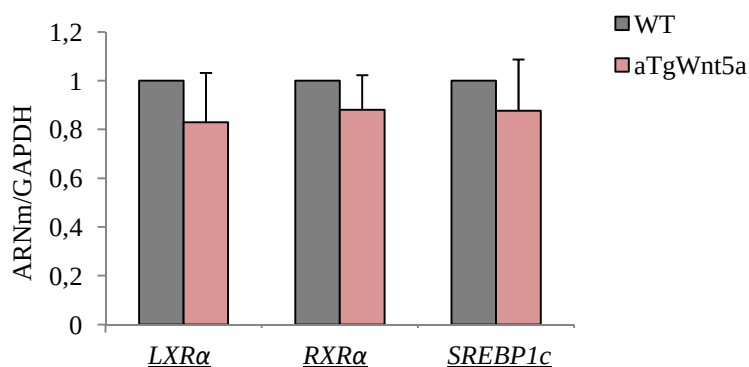


Figure 53 : L'augmentation de l'expression de ABCG1 est indépendante de l'activation des LXR. Mesure par RT-qPCR des quantités d'ARNm de *LXRα*, *RXRα* et *SREBP1c* dans le tissu adipeux blanc des souris sauvages (WT) et transgéniques (aTgWnt5a) ($n=5$).

Wnt5a ne perturbe pas la prise de poids des souris. La masse du tissu adipeux blanc est également similaire chez les deux lignées de souris (figure 49). L'analyse histologique de ce tissu et la quantification de la taille des adipocytes grâce au logiciel de traitement d'image ImageJ ne montrent pas de différences entre les souris sauvages et transgéniques (figure 50). De même, l'analyse histologique de la morphologie du tissu adipeux brun montre qu'elle est similaire chez les deux lignées de souris (figure 50). Ces données indiquent que la surexpression de Wnt5a dans le tissu adipeux n'a pas d'effet sur la morphologie des tissus adipeux blanc et brun ni sur la taille des adipocytes.

III.3 Caractérisation du phénotype moléculaire

III.3.1 Wnt5a augmente l'expression de ABCG1

Nos résultats et ceux du laboratoire ont montré dans deux types de fibroblastes (MEF et LMTK) que Wnt5a augmentait l'expression de ABCG1. Pour savoir si Wnt5a modifiait également l'expression des transporteurs du cholestérol *in vivo*, les niveaux de ABCG1 et ABCA1 dans le tissu adipeux blanc ont été quantifiés au laboratoire. Chez les souris transgéniques aTgWnt5a, l'ARNm de ABCG1 est 3 fois plus exprimé que chez les souris sauvages (figure 51.A) Cette augmentation est également retrouvée au niveau protéique (figure 51.B). L'ARNm de ABCA1 est quant à lui exprimé environ 1,5 fois plus chez les souris transgénique que chez les sauvages (figure 51.C). J'ai par ailleurs quantifié l'ARNm de ABCG1 dans les adipocytes purifiés issus des souris transgéniques. Les résultats montrent une augmentation d'expression 1,4 fois supérieure à celle dans les adipocytes purifiés issus des souris sauvages (figure 52).

o L'induction de ABCG1 est indépendante des LXR

Dans nos analyses *in vitro*, nous avons observé que l'augmentation de la quantité d'ARNm de ABCG1 était indépendante de l'activation des LXR. Pour déterminer si l'augmentation de l'expression de ABCG1 et ABCA1 est également indépendante des LXR chez les souris aTgWnt5a, l'expression de LXR α dans le tissu adipeux blanc des deux lignées de souris a été mesuré. La figure 53 montre que la quantité d'ARNm de LXR α est identique dans les deux lignées de souris. De plus, l'expression du partenaire de LXR, RXR α n'est pas modifiée par la surexpression de Wnt5a, tout comme celle de SREBP1c, un des gènes cible des LXR/RXR (figure 53). Ces données confirment les résultats *in vitro* et indiquent que

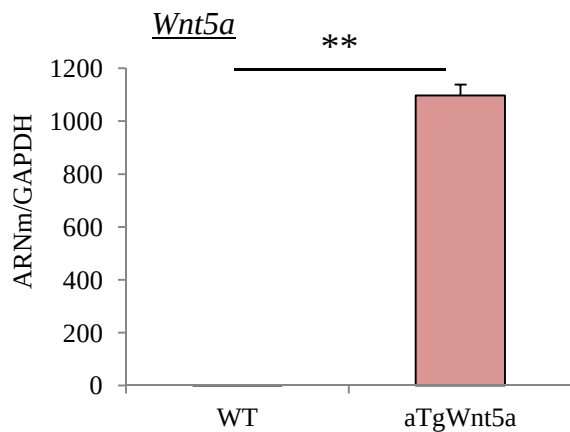


Figure 54 : Wnt5a est surexprimé dans les macrophages péritonéaux des souris transgéniques. Analyse par RT-qPCR de la quantité d'ARNm de Wnt5a dans les macrophages péritonéaux induits des souris WT et transgéniques ($p < 0,005$, $n = 4$).

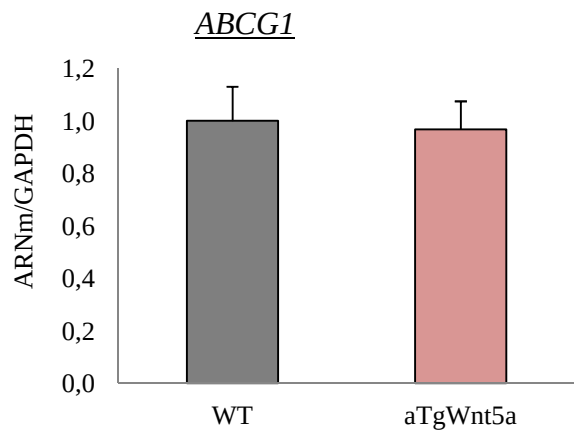


Figure 55 : L'expression de ABCG1 n'est pas modifiée dans les macrophages péritonéaux des souris. Analyse par RT-qPCR de la quantité d'ARNm de ABCG1 dans les macrophages ($n = 4$).

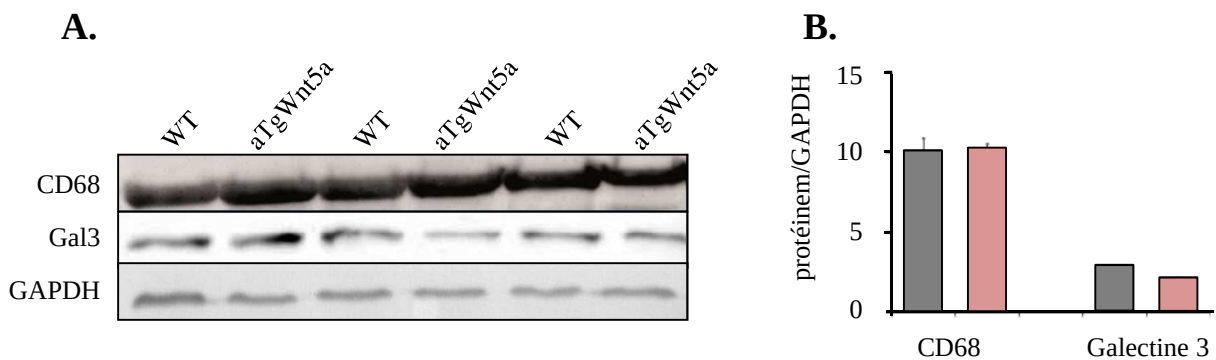


Figure 56 : La surexpression de Wnt5a n'entraîne pas d'infiltration macrophagique dans le tissu adipeux blanc. **A.** Analyse par western blot des quantités de protéines CD68 et Galectine 3 dans le tissu adipeux des souris sauvages et transgéniques. **B.** Quantification de l'intensité des signaux de western blot ($n = 3$).

l'induction de ABCG1 dans le tissu adipeux blanc des souris transgéniques est indépendante de l'activation des LXR.

O Implication des macrophages

L'augmentation de l'expression de ABCG1 dans les adipocytes issus des souris transgéniques (x 1,4) est inférieure à l'augmentation mesurée sur le tissu adipeux total (x 3). La différence pourrait être due à la contribution d'un type cellulaire autre que les adipocytes, qui serait présent dans le tissu blanc des souris et qui exprimerait ABCG1. Les macrophages sont des cellules également présentes au sein du tissu adipeux, où ils constituent les ATM (*Adipose Tissue Macrophages*) (Schipper et al., 2012). Ils expriment les transporteurs ABCA1 et ABCG1 ainsi que le promoteur FABP4/aP2 (Makowski et al., 2001). Pour déterminer si les macrophages contribuent à l'augmentation de l'expression de ABCG1 dans le tissu adipeux blanc total des souris aTgWnt5a, nous avons utilisé des macrophages péritonéaux qui avaient été induits par injection intrapéritonéale de thioglycolate dans les souris transgéniques aTgWnt5a et contrôles. Nous avons mesuré l'expression de Wnt5a et montré que dans les macrophages péritonéaux issus des souris transgéniques, l'expression de Wnt5a est 1000 fois supérieure à l'expression mesurée dans les macrophages des souris contrôles (figure 54).

Nous avons observé dans nos expériences *in vitro* et dans le tissu adipeux que Wnt5a augmente l'expression de ABCG1, par conséquent l'expression de ABCG1 devrait être stimulée dans ces macrophages péritonéaux. La quantité d'ARNm de ABCG1 dans ces macrophages n'est pas différente entre les souris aTgWnt5a et les sauvages (figure 55), ce qui infirme cette hypothèse. Le métabolisme des macrophages péritonéaux activés par inflammation n'est donc pas le reflet exact du métabolisme des ATM.

Wnt5a est connue pour avoir des effets pro-inflammatoires (Bhatt and Malgor, 2014; Fuster et al., 2014; Schulte et al., 2012), ce qui pourrait stimuler l'infiltration de macrophages au sein du tissu adipeux. On observerait alors une augmentation du nombre de macrophages qui entraînerait une augmentation de la quantité totale de ABCG1. Pour examiner si le tissu adipeux blanc des souris aTgWnt5a présente plus de macrophages infiltrés que le tissu blanc des souris sauvages, nous avons comparé l'expression de deux marqueurs spécifiques des macrophages, galectine 3 et CD68, dans le WAT des deux lignées. Les expressions protéiques de ces deux marqueurs sont identiques entre les souris transgéniques et les sauvages (figure 56), ce qui indique que les proportions d'ATM entre les deux lignées sont similaires et réfute l'hypothèse d'une infiltration macrophagique.

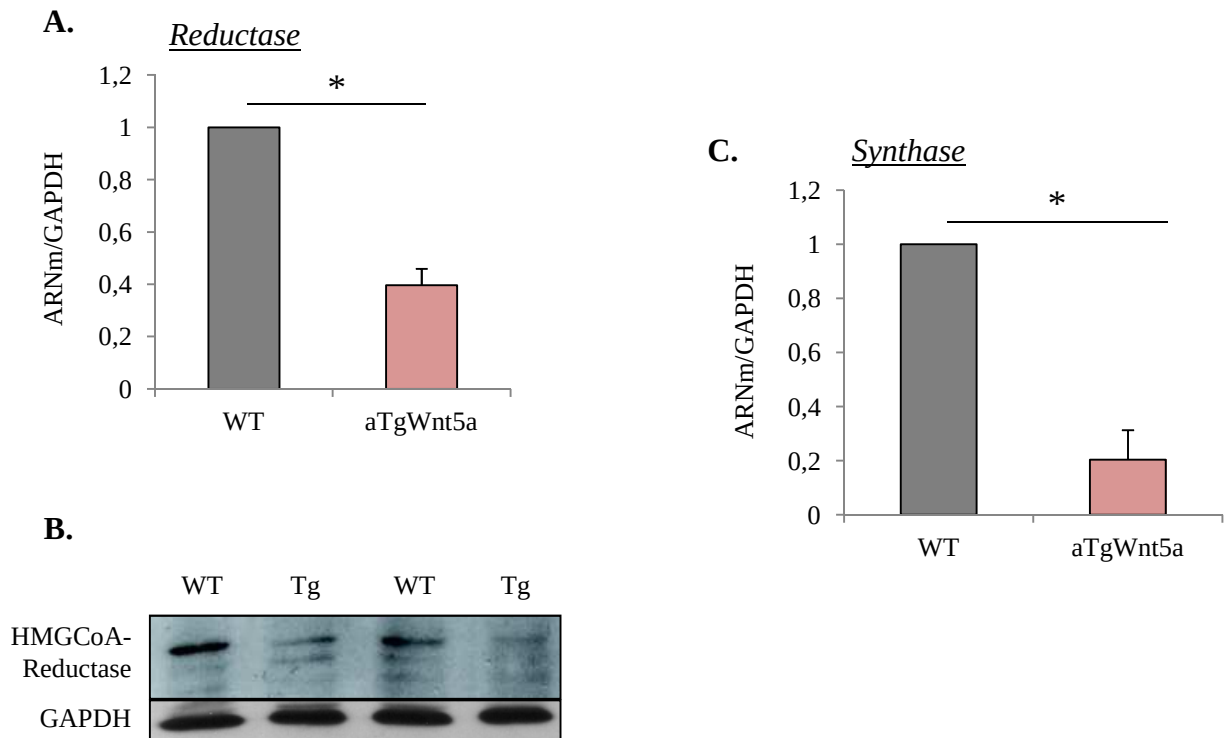


Figure 57 : Wnt5a diminue l'expression de l'HMGCoA-Reductase et l'HMGCoA-Synthase dans le tissu adipeux blanc des souris transgéniques. A. Analyse par RT-qPCR et B. par western blot du niveau d'expression de l'HMGCoA-Reductase dans le WAT des souris sauvages et transgéniques ($p < 0,05$, $n = 5$). C. Analyse par RT-qPCR de la quantité d'ARNm d'HMGCoA-Synthase dans le WAT des souris sauvages et transgéniques ($p < 0,05$, $n = 5$).

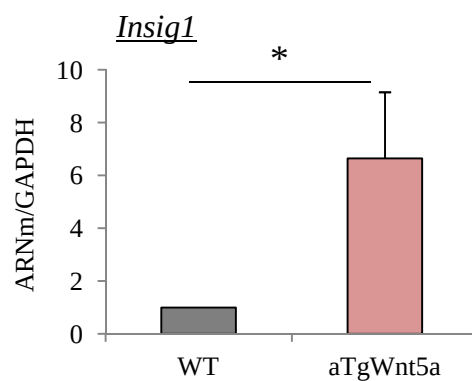


Figure 58 : L'expression de Insig1 est augmentée dans le tissu adipeux blanc des souris transgéniques. Analyse par RT-qPCR de la quantité d'ARNm de Insig1 dans le WAT des souris sauvages et transgéniques ($p < 0,05$, $n = 7$).

L'ensemble de ces données suggèrent que les macrophages du tissu adipeux blanc ne sont pas impliqués dans l'augmentation de l'expression de ABCG1 observée chez les souris aTgWnt5a. Pour confirmer cette conclusion, il conviendrait de purifier les ATM pour y mesurer l'expression de Wnt5a.

III.3.2 *Wnt5a inhibe l'expression de l'HMGCoA Reductase*

Nos résultats montrent que Wnt5a inhibe l'expression de l'HMGCoA-Reductase dans les MEF, très certainement en inhibant la translocation de SREBP2 comme observé dans les HEK-SREBP2. Pour déterminer si, de la même manière, la surexpression de Wnt5a chez les souris diminuait l'expression de l'HMGCoA-Reductase, les niveaux d'expression de l'enzyme dans le tissu adipeux blanc des souris sauvages et des transgéniques ont été comparés. Chez ces dernières, il a été observé une diminution de l'expression de l'HMGCoA-Reductase par rapport aux souris sauvages, au niveau de l'ARNm comme au niveau protéique (figure 57). Il a également été observé que l'expression de l'HMGCoA-Synthase, une autre enzyme de la voie du mévalonate, est diminuée dans le WAT des souris transgéniques par rapport aux sauvages (figure 57).

Les gènes codant l'HMGCoA-Reductase et l'HMGCoA-Synthase sont des gènes cibles de SREBP2. Leur expression étant diminuée dans le tissu adipeux transgénique, on peut imaginer que, comme dans les MEF LRP1-/- ; Wnt5a, la surexpression de Wnt5a entraîne une inhibition de la translocation de SREBP2. Pour explorer cette hypothèse, nous avons réalisé des mesures de la quantité de SREBP2 nucléaire et membranaire dans des adipocytes purifiés après fractionnement cellulaire. L'anticorps anti-SREBP2 à notre disposition ne nous a pour l'instant pas permis d'obtenir de résultats, contrairement à l'expérience *in vitro* qui permettait l'utilisation d'une protéine taguée plus facilement détectable par western blot.

Les expressions des autres protéines impliquées dans la régulation de la synthèse du cholestérol ont également été quantifiées au laboratoire. L'ARNm de Insig1 était fortement augmenté dans le tissu adipeux blanc surexprimant Wnt5a par rapport au tissu adipeux des souris sauvages (figure 58). Très récemment, une protéine nommée PAQR3 (*progestin and adipoQ receptor 3*) a été identifiée pour son rôle dans l'ancrage du complexe Scap/SREBP2 dans le Golgi. Une étude a montré qu'à la manière de Insig1 dans le RE, PAQR3 s'associe à Scap et stimule la formation du complexe avec SREBP2, la localisation de ce complexe au niveau du Golgi, la translocation de SREBP2 et la transcription de ses gènes cibles. A l'inverse, le silencing de PAQR3 diminue l'expression des gènes cibles de SREBP2 (Xu et al.,

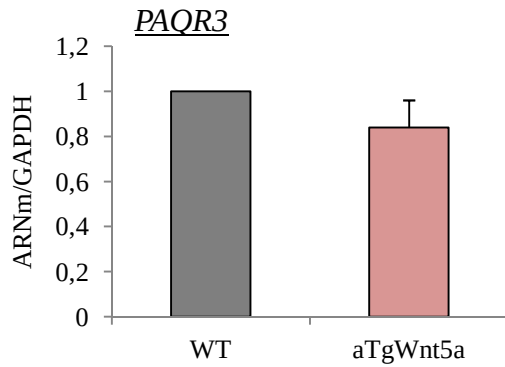


Figure 59 : L'expression de PAQR3 n'est pas perturbée par Wnt5a. Analyse par RT-qPCR de la quantité d'ARNm de PAQR3 dans le WAT des souris sauvages et transgéniques (n=5).

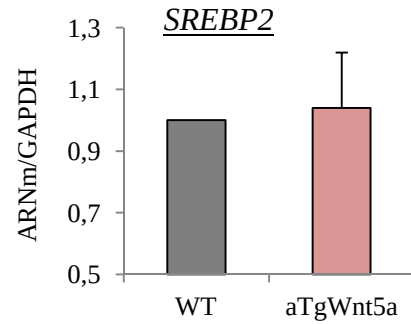


Figure 60 : L'expression de SREBP2 n'est pas modifiée par la surexpression de Wnt5a. Mesure de la quantité d'ARNm de SREBP2 dans le WAT des souris sauvages et transgéniques (n=7).

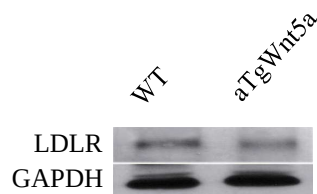


Figure 61 : L'expression du LDLR n'est pas modifiée par la surexpression de Wnt5a. Mesure de la quantité de protéine LDLR dans le WAT des souris sauvages et transgéniques (n=7).

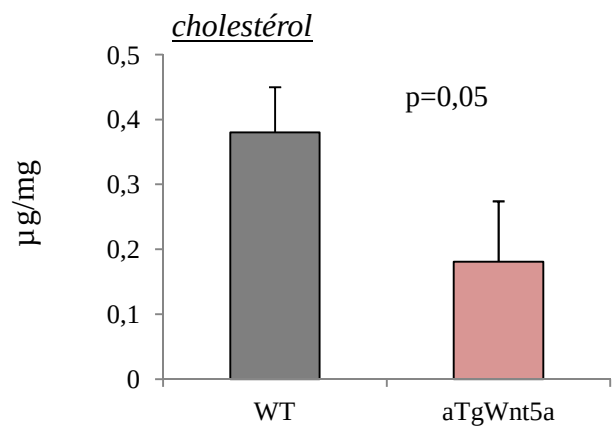


Figure 62 : La quantité de cholestérol dans le tissu adipeux blanc des souris transgéniques est diminuée. Dosage du cholestérol total dans le WAT des souris sauvages et transgéniques (n=5).

2015). PAQR3 est donc impliquée dans la localisation intracellulaire de SREBP2. Cette protéine pourrait donc être ciblée par Wnt5a et participer à la régulation par la signalisation Wnt5a de la synthèse endogène du cholestérol. En effet, une diminution de l'expression de PAQR3 en présence de Wnt5a pourrait signifier une inhibition de la translocation nucléaire de SREBP2 et contribuerait à expliquer la diminution de l'expression de l'HMGCoA-Reductase. Pour vérifier cette hypothèse, les ARNm de PAQR3 dans les tissus adipeux des souris ont été quantifiés au laboratoire. Aucune variation de la quantité d'ARNm n'a été observée entre les souris aTgWnt5a et les souris sauvages, ce qui suggère que PAQR3 n'est pas impliquée dans l'effet inhibiteur de Wnt5a sur la translocation de SREBP2 (figure 59).

La quantité d'ARNm de SREBP2 n'est pas modifiée entre les 2 lignées de souris (figure 60). Cependant, c'est la répartition entre les compartiments membranaire et nucléaire de la protéine SREBP2 qui renseigne sur l'activation de la transcription de ses gènes cibles ; plus que le niveau d'expression du gène codant SREBP2. L'absence de modification de l'expression du gène ne traduit donc pas obligatoirement l'absence de translocation de la fraction nucléaire de SREBP2.

Par ailleurs, la surexpression de Wnt5a n'affecte pas l'expression du LDLR (figure 61), ce qui indique que Wnt5a ne diminue pas l'import de cholestérol dans le tissu adipeux blanc des souris transgéniques.

Ces données indiquent que Wnt5a exerce *in vivo* un effet inhibiteur sur les expressions de l'HMGCoA-Reductase et Synthase, deux enzymes clés de la voie du mévalonate, ce qui suggère que de synthèse endogène de cholestérol est diminuée en présence de Wnt5a.

III.3.3 Wnt5a diminue la quantité totale de cholestérol dans le WAT

Wnt5a diminue l'expression des enzymes clés de la synthèse de cholestérol (l'HMGCoA-Reductase et l'HMGCoA-Synthase) et augmente celles des transporteurs responsables de son efflux (ABCA1 et ABCG1). Pour savoir si ces modifications d'expression se répercutaient par une diminution de la quantité de cholestérol chez les souris transgéniques, celle-ci a été mesurée au laboratoire dans le tissu blanc par spectrophotométrie. Les résultats montrent que la quantité de cholestérol totale était effectivement divisée par 2 chez les souris transgéniques par rapport aux sauvages (figure 62). Cette différence est à la limite de la significativité ($p = 0,05$), probablement à cause du faible effectif des groupes.

La quantité de triglycérides n'est pas différente entre les deux lignées, indiquant que Wnt5a n'influe pas sur leur métabolisme dans le tissu adipeux (figure 63). Cette observation

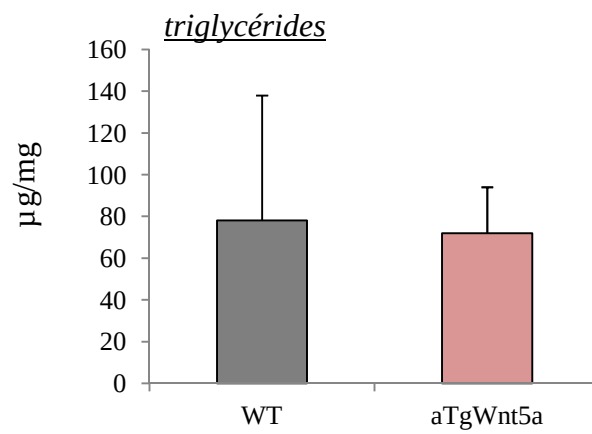


Figure 63 : Le métabolisme des triglycérides n'est pas affecté par Wnt5a. Dosage de la quantité de triglycérides dans les WAT des souris sauvages et transgéniques (n=5).

est cohérente avec celle de la figure 53 qui montre que l'expression de SREBP1c, le facteur de transcription qui stimule l'expression des gènes du métabolisme des triglycérides (Ferré and Foufelle, 2010; Li et al., 2014) n'est pas modifiée par la surexpression de Wnt5a dans le tissu adipeux.

Ces données obtenues chez la souris montrent que Wnt5a augmente l'expression des transporteurs et diminue celle des enzymes de la voie de synthèse du cholestérol, ce qui tend à diminuer la quantité totale de cholestérol dans le tissu adipeux.

Article

« Convergent signaling pathways controlled by LRP1 cytoplasmic and extracellular domains limit cellular cholesterol accumulation »

Journal of Biological Chemistry, 2016.

(Asmar et al., 2016)

Résumé :

L'article ci joint présente une grande partie des données concernant le rôle de la signalisation LRP1/Wnt5a dans le métabolisme du cholestérol détaillées précédemment.

L'article aborde également un aspect de la signalisation LRP1 qui limite l'accumulation de cholestérol mais qui est indépendante de Wnt5a. N'ayant pas personnellement collaboré à cette partie du projet, elle est brièvement décrite ci-après. L'équipe a observé que la retransfection du domaine cytoplasmique de LRP1 dans les MEF LRP1^{-/-} (LRP1^{-/-} ; β chain) était suffisant pour limiter l'accumulation intracellulaire de cholestérol induite par le cocktail de différenciation adipogénique. Il a été montré que dans ces MEF exprimant ce récepteur tronqué, l'expression de Wnt5a n'est pas induite. Nous avons d'ailleurs déjà observé que le traitement par TGF β 1 de ces cellules LRP1^{-/-} ; β chain ne stimulait pas l'expression de Wnt5a (*cf* figure 32). Nous pouvons conclure que cette inhibition de l'accumulation intracellulaire de cholestérol ne peut être attribuée qu'au domaine intracellulaire de LRP1, et qu'elle est indépendante de Wnt5a.

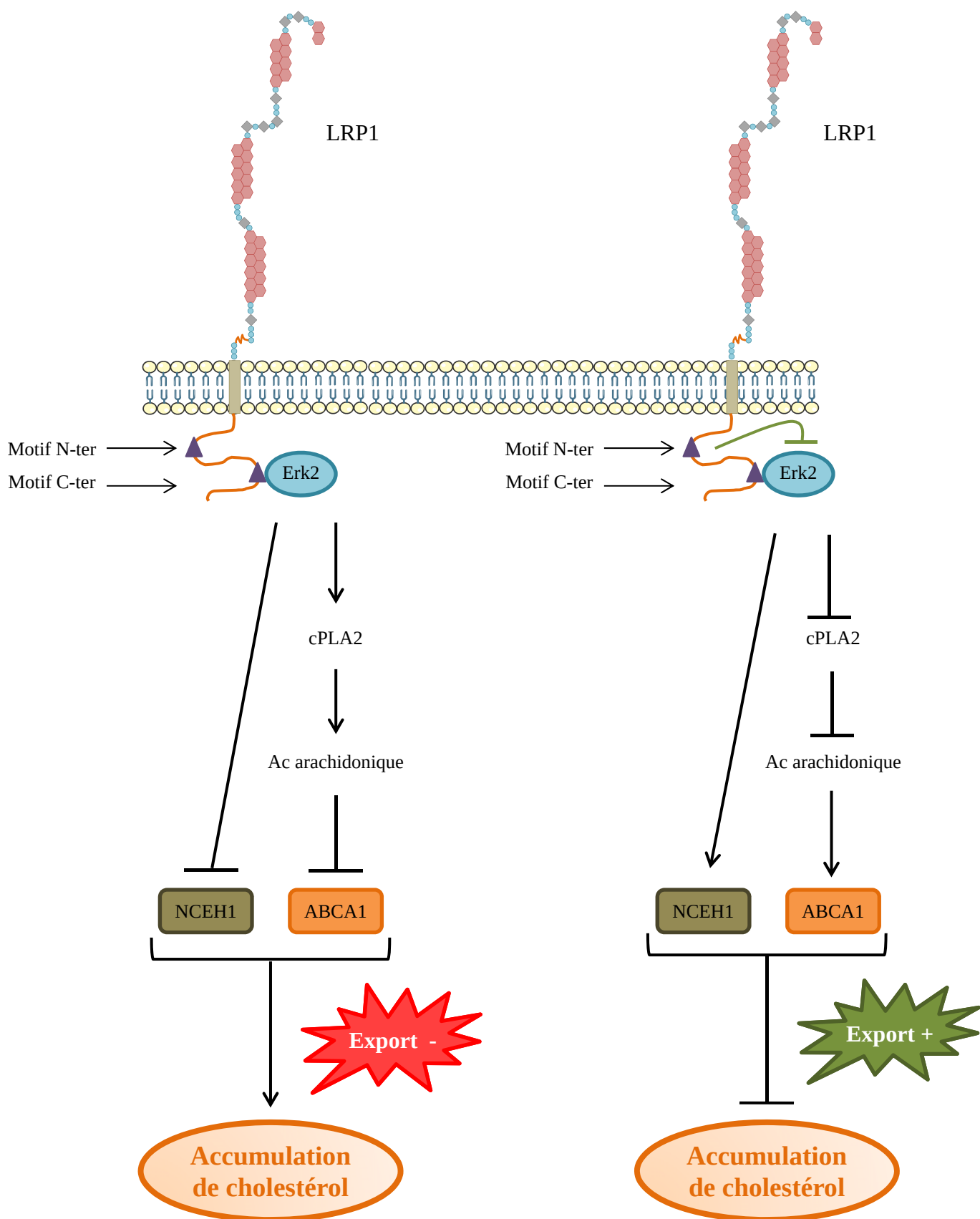
Nous avons observé qu'après traitement par le cocktail de différenciation adipocytaire, la quantité d'ARNm de ABCA1 est augmentée d'environ 50% dans les cellules LRP1^{-/-} ; β chain par rapport aux LRP1^{-/-} ; mock. Cette augmentation pourrait stimuler l'efflux de cholestérol et expliquer la diminution de sa quantité intracellulaire dans les cellules exprimant la β chain.

Le domaine cytoplasmique de LRP1 porte deux motifs phosphorylables NPXY qui interagissent avec des protéines adaptatrices et initient des voies de signalisation cellulaires. Pour discriminer les rôles de l'un et l'autre de ces motifs dans l'augmentation de l'expression de ABCA1, des lignées de MEF LRP1^{-/-} exprimant de façon stables la β chain portant soit une mutation de la tyrosine du site N-ter, soit une mutation de la tyrosine du site C-ter, soit une mutation des 2 tyrosines simultanément ont été utilisées. Nous avons coloré à l'huile rouge ces 3 lignées stables après traitement par cocktail de différenciation adipocytaire pour marquer les lipides. Les cellules traitées avec le cocktail de différenciation adipogénique

accumulent des lipides lorsqu'elles expriment le site N-ter muté et la double mutation mais n'en accumulent pas lorsque le site C-ter est muté. Ceci suggère que le site N-ter de la β chain de LRP1 a un effet inhibiteur sur l'accumulation de cholestérol, tandis que le site C-ter exercerait un effet activateur.

Dans les MEF LRP1^{-/-} ; β chain, l'expression de ABCA1 est augmentée par rapport aux contrôles. Nous avons donc quantifié l'expression de ce transporteur dans les lignées de MEF exprimant les mutants de LRP1 pour identifier quel site était responsable de cette stimulation de ABCA1. Dans les MEF LRP1^{-/-} exprimant la β chain mutée uniquement pour le site C-ter, l'expression de ABCA1 est augmentée par rapport aux MEF exprimant la mutation en N-ter et la double mutation. Nous avons également observé que l'expression de PLTP, une enzyme qui interagit avec ABCA1 et stimule son activité, est augmentée lorsque le site C-ter est muté. Ces données suggèrent que l'efflux de cholestérol pourrait être stimulé dans les MEF exprimant la mutation en C-ter. Cet efflux de cholestérol a été mesuré dans les MEF et il a été observé qu'il était stimulé dans celles exprimant le site C-ter muté par rapport à celles exprimant la mutation en N-ter et la double mutation. Pour conclure sur ces données, il semble que le site C-ter inhibe l'expression de ABCA1, PLTP et l'efflux de cholestérol, alors que le site N-ter permet d'induire l'expression de ces protéines et l'efflux de cholestérol dans les MEF LRP1^{-/-} ; β chain après traitement par le cocktail de différenciation adipocytaire.

Nous avons cherché à identifier la protéine ou le complexe protéique qui interagit avec les motifs NPXY de la β chain et permet de limiter l'accumulation intracellulaire de cholestérol. Nous avons donc réalisé une immunoprécipitation des récepteurs tronqués sauvages et mutés pour N-ter ou pour C-ter ou pour les deux sites avec un anticorps dirigé contre le tag c-Myc porté par ces récepteurs, suivie d'une électrophorèse en deux dimensions des protéines co-précipitées avec les récepteurs. Nous avons observé qu'une protéine était présente lorsque le site C-ter est sauvage mais absente lorsqu'il est muté. Par spectrométrie de masse, nous avons identifié cette protéine comme étant la kinase Erk, ce qui indique que Erk interagit avec le motif C-ter de la β chain de LRP1. Ces données sont corroborées par le fait que lorsque le site C-ter est muté la quantité de p-Erk est fortement diminuée par rapport aux MEF exprimant le site N-ter muté. Dans ces dernières, en plus de p-Erk, on trouve par ailleurs plus de cPLA2 phosphorylée, or il a été observé que l'activation par phosphorylation de cPLA2 permet la libération d'acide arachidonique, molécules qui inhibent l'activation des LXR et répriment l'expression de ABCA1 (Zhou et al., 2009a). Nos données suggèrent donc



La signalisation LRP1 indépendante de Wnt5a dans le métabolisme du cholestérol : effets opposées des motifs NPXY de LRP1. Le motif C-ter lie Erk et active cPLA2, entraînant la libération d'acide arachidonique et l'inhibition de l'expression de ABCA1. Le motif N-ter inhibe cette signalisation Erk/cPLA2 ce qui active l'expression de ABCA1. NCEH1 est également régulé négativement par C-ter et positivement par N-ter.

que le site C-ter active Erk et déclenche une voie de signalisation par cPLA2 et l'acide arachidonique qui conduit à l'inhibition de l'expression de ABCA1. A l'opposé, le site N-ter réprime l'activation de Erk1/2 et de cPLA2, empêchant la libération d'acide arachidonique, ce qui augmente l'expression de ABCA1.

Le cholestérol estérifié ne pouvant pas être exporté, son hydrolyse par l'enzyme NCEH1 est une étape préalable indispensable à son efflux par les transporteurs de la famille ABC (Igarashi et al., 2010). Nous avons quantifié l'expression de cette enzyme pour déterminer si elle pouvait être régulée par LRP1 dans les MEF. Effectivement, nous avons observé que dans les MEF LRP1^{-/-}, qui accumulent du cholestérol, l'expression de NCEH1 était diminuée par rapport aux MEF WT. En revanche, lorsque les MEF LRP1^{-/-} réexpriment la β chain avec le motif C-ter muté, l'expression de NCEH1 est augmentée par rapport aux MEF réexprimant le motif N-ter muté. Ce résultat est cohérent avec le fait que ces cellules mutées pour C-ter exportent plus de cholestérol que celles mutées pour N-ter. Ces données indiquent que l'expression de NCEH1, l'enzyme qui hydrolyse le cholestérol en vue de son export, est régulée positivement par le site N-ter et négativement par le site C-ter de LRP1.

Compte tenu de toutes ces données, nous proposons que les deux sites NPXY de LRP1 régulent de manière opposée l'expression de ABCA1 et NCEH1, et ceci indépendamment de Wnt5a : le motif C-ter, via la fixation de Erk, exerce un effet inhibiteur, tandis que le motif N-ter exerce un effet activateur sur l'expression de ces 2 régulateurs de l'efflux du cholestérol (schéma).

Manuscript Title: Convergent Signaling Pathways Controlled by LRP1 Cytoplasmic and Extracellular Domains Limit Cellular Cholesterol Accumulation

Manuscript No: JBC/2016/714485

Manuscript Type: Regular Paper

Date Submitted by the Author: 8 Jan 2016

Complete List of Authors: Zeina El Asmar, Jerome Terrand, Marion Jenty, Lionel Host, Mohamed Mlih, Aurelie Zerr, Helene Justiniano, Rachel L. Matz, Christian Boudier, Estelle Scholler, Jean-Marie Garnier, Diego Bertaccini, Daniele Thierse, Christine Schaeffer, Alain Van Dorsselaer, Joachim Herz, Veronique Bruban, and Philippe Boucher

Keywords: ABC transporter; atherosclerosis; cholesterol regulation; transgenic mice ; Wnt pathway; lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)

Convergent Signaling Pathways Controlled by LRP1 Cytoplasmic and Extracellular Domains Limit Cellular Cholesterol Accumulation

Zeina El Asmar[‡], Jérôme Terrand[‡], Marion Jenty[‡], Lionel Host[‡], Mohamed Mlih[‡], Aurélie Zerr[‡], Hélène Justiniano[‡], Rachel L. Matz[‡], Christian Boudier[‡], Estelle Scholler[‡], Jean-Marie Garnier[§], Diego Bertaccini[¶], Danièle Thiersé[¶], Christine Schaeffer[¶], Alain Van Dorsselaer[¶], Joachim Herz^{||}, Véronique Bruban[‡] and Philippe Boucher[‡]

From the [‡]CNRS, UMR 7213, University of Strasbourg, 67401 Illkirch, France,

[§]IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire), Inserm 964/CNRS UMR 7104, University of Strasbourg, Illkirch, France,

[¶]CNRS, UMR 7178, University of Strasbourg, 67087 Strasbourg, France,

^{||}Department of Molecular Genetics and Center for Translational Neurodegeneration Research, UT Southwestern Medical Center at Dallas, TX.

Running title: *An LRP1/Wnt5a pathway for cholesterol homeostasis*

To whom correspondence should be addressed: Philippe Boucher (philippe.boucher@unistra.fr) or Véronique Bruban (veronique.bruban@unistra.fr), CNRS, UMR 7213, University of Strasbourg, 74 route du Rhin, CS 60024, 67401 Illkirch, France. Tel: +33 (0)3 6885 4248, Fax: +33 (0)3 6885 4313.

Keywords: Cholesterol; lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1); Wnt pathway

The Low Density Lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) is a ubiquitously expressed cell surface receptor that protects from intracellular cholesterol accumulation. However, the underlying mechanisms are unknown. Here we show that the extracellular (α) chain of LRP1 mediates TGF β -induced enhancement of Wnt5a which limits intracellular cholesterol accumulation by inhibiting cholesterol biosynthesis and by promoting cholesterol export. We moreover demonstrate that the cytoplasmic (β) chain of LRP1 suffices to limit cholesterol accumulation in LRP1-/- cells. Through binding of Erk2 to the second of its carboxy-terminal NPxY motifs, LRP1 β -chain positively regulates the expression of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and of neutral cholesterol ester hydrolase (NCEH1). These results highlight unexpected functions of LRP1 and the canonical Wnt5a pathway, and new therapeutic potential in cholesterol-associated disorders, including cardiovascular diseases.

leading cause of death in industrialized societies (1,2). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), a cell surface receptor that belongs to the LDL receptor (LDLR) family, endocytoses multiple ligands (3). It consists of an 85-KDa membrane-bound carboxyl fragment (β chain) and a non-covalently attached 515-KDa (α chain) amino-terminal fragment (4). We previously demonstrated that LRP1 limits cholesterol accumulation in the arterial wall. Mice deficient for LRP1 in vascular smooth muscle cells (vSMCs) (smLRP1- mice) develop vSMCs proliferation, cholesterol accumulation (5), and massive foam cell formation when fed a cholesterol-rich diet (6-10). Whereas LRP1 integrates the platelet-derived growth factor (PDGF-BB) (8,9) and transforming growth factor- β (TGF- β) at the plasma membrane, two pathways known to regulate vSMCs proliferation (7), the physiological importance and function of LRP1 in regulating intracellular cholesterol homeostasis is still poorly understood. Several mechanisms have been proposed. LRP1 has been shown to promote cholesterol export in vSMCs through induction of ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) levels (5), and to induce a Wnt5a/ β -catenin pathway to limit cholesterol overload in mouse embryonic fibroblasts (11). Moreover, smLRP1-

Cholesterol is a major component of mammalian cell membranes that accumulates in the vascular wall during atherosclerosis, the

mice express very low levels of Wnt5a in vSMCs (12). TGF- β also stimulates a non-canonical Wnt5a pathway in airway smooth muscle cells (13). These data strongly suggest that a TGF- β /LRP1/Wnt5a pathway limits intracellular cholesterol accumulation.

How Wnt5a interferes with cholesterol homeostasis is unknown. It might increase cholesterol export and/or block cholesterol synthesis. ABCA1 and the ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) are two proteins that promote cholesterol efflux. Cholesterol synthesis is tightly regulated by a feedback system that senses the level of cholesterol, and modulates the transcription of genes encoding enzymes of cholesterol biosynthesis and uptake (14,15). For instance, when cholesterol levels rise in cells, the membrane-embedded protein of the endoplasmic reticulum (ER), Scap senses the increase and binds to Insigs, proteins located to the ER. Insigs then limit cleavage and nuclear translocation of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs), in particular SREBP-2, an activator of cholesterol synthesis in liver and adipose tissue of mice (16). This reduces 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase transcript levels and decreases cholesterol synthesis.

In the current study, we sought to determine how LRP1 regulates Wnt5a, and how Wnt5a prevents intracellular cholesterol accumulation. Our results show that a TGF β /LRP1 signaling pathway positively regulates Wnt5a mRNA and protein levels. We further demonstrate that Wnt5a protects against intracellular cholesterol accumulation by interfering with its biosynthesis, through down-regulation of HMG-CoA reductase, and by interfering with cholesterol export through up-regulation of ABCG1. Finally, we found that the proximal NPXY motif (N-Ter) within the LRP1 β chain is critical to activate the expression of ABCA1 and the neutral cholesterol ester hydrolase (NCEH), an enzyme that hydrolyses cholesterol esters, the initial step toward elimination of cholesterol (17).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and diets - All animal experimentations and procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of University of Strasbourg, France, and performed conform to the guidelines

from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes. The generation of Wnt5a transgenic animals was achieved by expressing Wnt5a from the Fatty Acid Binding Protein-4 (FABP4/aP2) promoter. The FABP4/aP2 protein is predominantly expressed in adipose tissue. The transgenic vector contains the FABP4/aP2 promoter, the mouse Wnt5a cDNA, a β -globin intron fragment for splicing, and a polyadenylation sequence. Genotyping of the wild type and Wnt5a mutant mice by polymerase chain reaction (PCR) was performed as described (6) using primers specific for Wnt5a (Primers available upon request). Animals were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle. For feeding studies, mutants and control mice were fed a caloric rich diet for 24 weeks as described previously (6). For the isolation of tissue for further analysis, the agents used for euthanasia were ketamine (750 mg/kg) and xylazine (50 mg/kg), intraperitoneally.

Cell culture - Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) and Human Embryonic Kidney cells (HEK) were grown in monolayer culture at 37°C in 5% CO₂, in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10% new born calf serum (NCS), and with 10% fetal bovine serum (FBS) respectively. Adipocyte differentiation was induced using a cocktail of insulin, dexamethasone, IBMX (Sigma-Aldrich) and rosiglitazone (Applied Biochemical Technology) (11). Medium was changed every two days and after 10 days, cells were fixed in 10% formaldehyde and neutrals lipids were stained with Oil Red O (Sigma-Aldrich). For experiments with conditioned medium from cells over expressing Wnt5a (L-MTK, CRL-2814; American Type Culture Collection, Manassas, VA), the medium was maintained during 3 days in contact with the confluent cells, and then removed and cleared by centrifugation. The medium was supplemented with 5% FBS before use. For TGF β treatment, MEF were set up at 60000 cells per well in DMEM 10% NCS. When they reached contact inhibition, they were starved in DMEM supplemented with 0.5% FBS for 18h. 5 ng/ml of TGF β were added in the medium during the indicated times. The cells were scrapped in RIPA lysis buffer for protein extraction, or in TRIzol reagent for RNA isolation. For cell fractionation, monolayers of human embryonic kidney (HEK)

293 cells were transfected with plasmids as described (18). The cells were incubated for 20h in medium containing 5% sterol-depleting serum with 50 μ M compactin and 50 μ M sodium mevalonate in the absence or the presence of sterols as indicated in the legends. Sterol mixtures contain 0.1-1 μ g/ml of 25 hydroxycholesterol plus 1-10 μ g/ml cholesterol as described previously (19). Thereafter, the cells received N-acetyl-leucinal-leucinal-norleucinal at a final concentration of 25 μ g/ml, and the cells were harvested 3h later as described (18). Cells were then fractionated as described (20). cPLA2 α inhibitor: N-[(2S,4R)-4-(Biphenyl-2-ylmethyl-isobutyl-amino)-1-[2-(2,4-difluorobenzoyl)-benzoyl]-pyrrolidin-2-ylmethyl]-3-[4-(2,4-dioxothiazolidin-5-ylidenemethyl)-phenyl]acrylamide, HCl, was from Calbiochem (Cat.No. 525143).

Protein and mRNA expression analysis - RNA was isolated using TRIzol reagent (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) according to the manufacturer's instructions. 50 μ g of RNA were converted to cDNA using the High-capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR amplification was performed using SYBRGreen PCR master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. Primers sequences are available upon request. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblot analysis were performed according to standard procedures. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and immunoblot analyses were carried out using antibodies directed against Wnt5a (R&D systems), HMG CoA reductase (Kind gift from Russell de Bose-Boyd, UTSWMC, Dallas, TX), ABCA1 (Santa Cruz, CA), ABCG1 (Santa Cruz, CA), p44/42 Erk (Cell Signaling Technology), c-myc (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo) p-AKT (Cell Signaling Technology) or GAPDH (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo). For mass spectrometry analysis, peptides were analyzed by nanoflow liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS). All MS/MS data was interpreted with 2 different search engines (Mascot and OMSSA) using several protein sequence databases (NCBI, SwissProt). For immunostaining and histology experiments, adipose tissue was fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline, embedded in paraffin, and cut in 5 μ m slices as

described (6). Sections were stained with hematoxylin and eosin. The ABCG1 promoter A which is located upstream exon1 (-670 to -10), or the ABCG1 promoter B which is located upstream exon 5 (-610 to -10)(21), or an empty vector linked to a luciferase reporter were transiently transfected in LRP1-/- MEFs stably transfected with an expression vector coding for Wnt5a (LRP1-/-, Wnt5a MEFs). At 48 h after the transfection, cells were collected and reporter gene assays were carried out using the Promega dual-luciferase reporter assay system (Promega, USA).

Plasmids and probes - HEK cells were transfected with a plasmid coding SREBP-2 under the control of a thymidine kinase promoter, and carrying the gene for geneticin resistance (kindly provided by Russel de Bose-Boyd). Transfections were performed with Eugene6 Reagent (Promega) according the manufacturer's protocol. Briefly, 60% confluent cell medium was switched with DMEM + 0.5% FBS and the Eugene6 mixed with the plasmid was added for 5 hours. Medium was replaced by DMEM with 10% FBS during 24 to 48 hours. For stable cell lines medium was then switched to DMEM + 10% FBS containing the selective antibiotic G418 at a concentration of 1,8 mg/ml for selection then 0,6 mg/ml.

Cholesterol measurement - Total cholesterol from white adipose tissue of Wnt5a transgenic mice was quantified using a cholesterol/cholesteryl ester quantitation kit (Clabiochem-EMD Biosciences, San Diego, CA) according to the manufacturer protocol. Briefly, 20mg of tissue were dissolve in chloroform 1% Triton-100x and centrifuge at 14000 rpm for 10 min at 20°C. The organic phase was transfer in a new Eppendorf tube and was air-dry at 55°C to remove chloroform. The dried lipids were dissolved in 200 μ l of Cholesterol Reaction Buffer by vortexing. Cellular cholesterol was measured by incubating MEF in media containing serum (10% FBS) or with [1,2(n)-3H] cholesterol (specific activity 50mCi/ml) (Perkin Elmer, final radioactivity Cholesterol, [1,2-3H(N)]-, 1mCi (37MBq)) for 36h in a CO₂ incubator. For equilibration of cellular free cholesterol pools, cells were starved for 18 hours in DMEM supplemented with 0.3% BSA. AcylCoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitor (TMP153 Sigma-Aldrich) was added to both the prelabeling and equilibration media to

prevent cholesterol esterification at a final concentration of 220nM. For cholesterol efflux, cells were washed and incubated for 3 h at 37°C in serum-free medium containing 6 µg/ml of lipid free apoA-I. The medium was collected, centrifuged for 15 min at 4°C at 10,000 g, and aliquots of supernatant were counted in a β -counter. Cells were washed with cold PBS, harvested, lysed in 0.3M NaOH for 3h in ice and cell-associated radioactivity was counted. Cholesterol efflux was expressed as the proportion of [^{3} H] cholesterol transferred from cells to medium.

Statistical analysis - Values are reported as mean $\pm$ SEM of at least triplicate determinations. Statistical significance ($P < 0.05$) was determined using an unpaired Student's *t* test or ANOVA (GraphPad Prism, Abacus Concepts, Berkeley, CA).

RESULTS

The extracellular domain of LRP1 mediates a TGF- β -induced Wnt5a pathway - To test whether TGF- β induces Wnt5a, we treated MEFs with TGF- β and found an induction of Wnt5a protein much more pronounced in LRP1 $^{+/+}$ MEFs than in LRP1 $^{-/-}$ MEFs (Fig. 1A). The induction occurs after 30 min of treatment (Fig. 1A). Similarly, Wnt5a transcript levels were increased 3-fold upon 30 min of TGF- β stimulation (Fig. 1B) and remained significantly higher than controls even after 24 hours of treatment. No induction was observed in LRP1 $^{-/-}$ MEFs (Fig. 1B), demonstrating that LRP1 is required for TGF- β -induced Wnt5a transcript levels. Interestingly, TGF- β did not increase mRNA levels of Wnt5a in cells that express only the cytoplasmic domain (β -chain) of LRP1 (Fig. 1B). These data indicate that the α -chain of LRP1 is required for TGF- β -mediated induction of Wnt5a.

Wnt5a enhances ABCG1 expression and promotes cholesterol efflux - To test whether Wnt5a stimulates cholesterol export, we treated LRP1 $^{-/-}$ MEFs stably re-transfected with a Wnt5a expression vector, and LRP1 $^{-/-}$ MEFs control that do not express Wnt5a with an adipogenic cocktail for 10 days. Wnt5a re-transfected LRP1 $^{-/-}$ MEFs exported about 2 times more cholesterol than LRP1 $^{-/-}$ MEFs transfected with an empty vector (Mock) (Fig. 2A). Over-expression of Wnt5a in

LRP1 $^{-/-}$ MEFs enhanced mRNA (Fig. 2B) and protein levels of ABCG1 (Fig. 2C-D), but not those of ABCA1 (Fig. 2C and data not shown), two proteins that promote cholesterol efflux (22-24). Similarly, murine L-MTK cells stably transfected with Wnt5a contained much higher amounts of ABCG1 transcripts (Fig. 2E) and proteins (Fig. 2F) than wild type cells. Conversely, ABCG1 protein expression is decreased in 3T3-L1 preadipocytes and in human vSMCs silenced for Wnt5a (Figure 2G). Thus, Wnt5a enhances ABCG1 expression.

Liver X receptors (LXRs) play a key role in cholesterol efflux. They form obligate heterodimers with retinoid X receptors (RXR). LXR/RXR heterodimers bind to lipogenic target gene promoters such as apoE, SREBP1c, ABCA1 and ABCG1. In LMTK-cells stably transfected with Wnt5a, mRNA levels of LXR β remained unchanged (Fig. 2H) and mRNA levels of LXR α are decreased (Fig. 2H). Transcript levels of LXR α also remained unchanged in LRP1 $^{-/-}$ MEFs and in LRP1 $^{-/-}$ MEFs stably transfected with Wnt5a (data not shown). Moreover, mRNA levels of SREBP1c (Fig. 2H) and ApoE (Fig. 2H) were not modified by Wnt5a overexpression in LMTK cells. These data indicate that Wnt5a induces ABCG1 expression independently of LXRs levels. In cells, mRNA levels are determined by the relative rates of RNA production and degradation. To determine whether Wnt5a modifies ABCG1 mRNA degradation, MEFs were stimulated with an adipogenic cocktail to induce cholesterol accumulation, and treated with actinomycin D for various time periods to block transcription. Whereas, ABCG1 mRNA levels in Wnt5a re-transfected MEFs were about 3 times higher than controls (Mock), Fig. 2I shows that upon 6 to 8 hours of actinomycin D, ABCG1 mRNA levels in these cells returned to levels of controls. The *ABCG1* gene has been shown to have two promoters which are located upstream of exon 1 and of exon 5 and have been designated as promoter A and promoter B, respectively (21). Fig. 2J shows that LRP1 $^{-/-}$ MEFs stably transfected with an expression vector coding for Wnt5a stimulated luciferase expression driven by the promoter B of *ABCG1* (21), but not by its promoter A. These data indicate that Wnt5a promotes cholesterol efflux through induction of transcription of ABCG1.

Wnt5a decreases SREBP-2 nuclear translocation and down regulates HMG-CoA reductase expression - Next, we determined whether Wnt5a interferes with cholesterol biosynthesis. Upon treatment with an adipogenic cocktail for 10 days, we observed in LRP1-/- MEFs stably transfected with Wnt5a a 70% decrease of the mRNA levels of the HMG-CoA reductase encoding the rate-limiting enzyme of the mevalonate pathway (Fig. 3A). SREBPs, in particular SREBP-2, activate the transcription of several genes that encode enzymes required for cholesterol synthesis, including HMG-CoA reductase (16). We thus postulated that Wnt5a might decrease HMG-CoA reductase expression through decreased SREBP-2 nuclear translocation. To test this, we transfected HEK 293 cells stably expressing tagged SREBP-2 cDNA under the control of a TK promoter (20) with a vector coding for Wnt5a. We found that over-expression of Wnt5a in HEK decreased SREBP-2 nuclear translocation (Fig. 3B, lane 6 and 8). In addition to cholesterol, the mevalonate pathway is also regulated by oxysterols (25). For instance, SREBP-2 nuclear translocation is inhibited when oxysterols are added to cultured cells (16). We thus postulated that Wnt5a might potentiate the effects of 25-hydroxycholesterol on SREBP-2 nuclear location. Fig. 3C and 3D show in HEK 293 cells over-expressing SREBP-2 the effect of various concentrations of 25 hydroxycholesterol on the amount of the mature nuclear form of SREBP-2. Whereas in cells non-transfected with Wnt5a, treatments with 0.3 µg/ml of sterols modestly decreased SREBP-2 levels in the nucleus, in cells that over-expressed Wnt5a, treatments with 0.3 µg/ml of sterols markedly decreased SREBP-2 in the nucleus (Fig. 3C, lane 8, and Fig. 3D). When treated with 0.3 µg/ml of sterols, the decrease was similar to that seen at 1µg/ml of sterols in Wnt5a non-transfected cells (Fig. 3C, lane 2 and 8). In a complementary approach, we treated the HEK 293 over-expressing SREBP-2 with a Wnt5a-enriched conditioned medium (11). Cell fractionation experiments revealed that SREBP-2 nuclear translocation was decreased after 6h (Fig. 3E, lanes 4-5) and 24h of treatment (Fig. 3E, lanes 6-7).

Insig-1 is an ER protein known to limit cleavage and nuclear translocation of membrane-

bound SREBP-2 in mice (16). Whereas, Insig-1 retains Scap/SREBP in the ER, a Golgi-localized membrane protein progestin and adipoQ receptors 3 (PAQR3) was recently identified as interacting with Scap/SREBP to tether them to the Golgi (26). To determine whether Wnt5a modifies Insig-1 levels, we used SDS-PAGE and immunoblotting to follow the disappearance of total Insig-1 after protein synthesis was blocked by cycloheximide (CHX). We also treated the cells with oxysterols because degradation of Insig-1 is inhibited when oxysterols are added to cultured cells (16). Fig. 3F shows that treatment with sterols stabilized Insig-1 expression in LRP1-/- MEFs transfected with Wnt5a (-/-, Wnt5a), but not in mock controls that do not express Wnt5a (-/-, Mock). This indicates that sterols and Wnt5a are both required to stabilize Insig-1 levels. It retains SREBP-2 in the ER and decreases HMG-CoA reductase levels.

Reduced cholesterol accumulation in adipocytes of mice overexpressing Wnt5a in adipose tissue - To show that Wnt5a limits intracellular cholesterol accumulation *in vivo*, we generated mice that over-express Wnt5a selectively in adipocytes (aTgWnt5a). In addition to its role in storage of excess energy in form of triglycerides, the adipose tissue contains the largest pool of cholesterol (27,28). Consistent with our previous observation in MEFs, ABCG1 mRNA (Fig. 4A) and protein levels (Fig. 4B) were increased in white adipose tissue from aTgWnt5a mice. ABCG1 mRNA levels were also significantly increased in purified white adipocytes (Fig. 4C). No difference in macrophage infiltration of adipose tissue was observed between aTgWnt5a mice and controls (Fig. 4D), excluding that increased ABCG1 mRNA levels resulted from an increased number of macrophages. As observed in MEFs, ABCA1 mRNA levels were only moderately increased by Wnt5a overexpression (Fig. 4E). SREBP-2, liver X receptor alpha (LXRα), retinoid X receptors (RXRα), as well as LXR target genes such as SREBP-1c were unchanged in aTgWnt5a mice (data not shown). We also tested whether HMG-CoA reductase expression was altered in aTgWnt5a mice. In agreement with our *in vitro* data, mRNA (Fig. 4E) and protein levels (Fig. 4B) of HMG-CoA reductase were 5-6 fold lower in white adipose tissue from aTgWnt5a mice compared to controls. Moreover, mRNA levels HMG-CoA synthase, the

enzyme upstream of the mevalonate pathway, were 80-90% decreased compared to controls (Fig. 4E). This was accompanied by a 6-8 fold increase of Insig-1 mRNA levels (Fig. 4F) in white adipose tissue of aTgWnt5a mice, whereas no difference in mRNA levels of PAQR3 was seen (Fig. 4F). Similarly, a 2-fold decrease of total cholesterol (Fig. 4G) in white adipose tissue of aTgWnt5a mice was observed without difference in the total amount of triglycerides (data not shown). Histological analysis did not reveal any difference in white adipocyte size (Fig. 4H) and no difference in body weight (data not shown) was observed between transgenic and control mice even after 24 weeks of a high fat diet. LDL receptor protein expressions were similar in white adipose tissue from aTgWnt5a and controls (Fig. 4I), suggesting that cholesterol uptake was not affected. Thus, over expression of Wnt5a in adipose tissue of mice decreases the expression of the rate-limiting enzymes for cholesterol biosynthesis, and increases the expression of proteins that promote cholesterol efflux resulting in decreased intracellular cholesterol levels.

The cytoplasmic tail of LRP1 prevents cholesterol intracellular accumulation independently of Wnt5a signaling - LRP1 is known to induce ABCA1 expression (5) and thus could also limit intracellular cholesterol accumulation through a Wnt5a-independent pathway. To test this, we transfected an expression vector coding for the LRP1 β -chain (Fig. 5A) in LRP1^{-/-} MEFs, and subjected these cells to an adipogenic cocktail for 10 days. In these conditions, TGF- β cannot bind to LRP1 and did not induce Wnt5a (Fig. 1A-B). We found that LRP1 β -chain sufficed to reduce intracellular cholesterol accumulation (Fig. 5B). Interestingly, transfection of the LRP1 β -chain in LRP1^{-/-} MEFs was sufficient to increase mRNA levels of ABCA1 by 50% (Fig. 5C). Because tyrosine phosphorylation of the LRP1 cytoplasmic domain increases its affinity for some adaptor proteins that are involved in signaling pathways, we replaced the Y of the NPXY motifs located within the cytoplasmic tail of LRP1 with an F residue (Fig. 6A). Expression vectors encoding these mutant forms of LRP1 were stably transfected in LRP1^{-/-} MEFs, and cells analyzed for their ability to accumulate cholesterol upon adipogenesis. Cholesterol accumulation was abolished when the

2nd NPXY (C-Ter) motif was mutated, whereas when the 1st NPXY (N-Ter) or both motifs (N-Ter/ C-Ter) were mutated, cells accumulated large amounts of cholesterol (Fig. 6B). MEFs bearing a mutation on the C-Ter motif behaved like LRP1 wild type cells, and expressed large amounts of ABCA1 mRNA (Fig. 6D) and of the phospholipoprotein transfer protein (PLTP) known to potentiate ABCA1 activity (29) (Fig. 6E). They also exported about two times more cholesterol than when the 1st NPXY (N-Ter) or both motifs (N-Ter/ C-Ter) were mutated (Figure 6F). On the other hand, because these cells do not express the external domain of LRP1, they cannot mediate TGF β signaling. As a consequence, ABCG1 mRNA (Fig. 6H), and protein levels (data not shown), and Wnt5a proteins levels (Fig. 6C) were not affected.

To identify the protein complex that binds to LRP1 β -chain and inhibits intracellular cholesterol accumulation, we stably transfected LRP1^{-/-} MEFs with a vector expressing a tagged LRP1 β -chain bearing the mutations in the C-Ter and N-Ter motifs described above. Proteins that bind to the tail of LRP1 were immunoprecipitated from lysates with antibodies against the tag, and identified using a comparative proteomic analysis. Upon adipogenesis, mass spectrometry analysis showed that the 2nd NPXY (C-Ter), but not the 1st NPXY motif is required for binding of Erk2. In agreement with this, unlike cells bearing the mutated C-Ter motif, MEFs bearing the mutated N-Ter motif expressed large amounts of p-Erk1/2 and p-cPLA2 (Fig. 6C), which are known to release arachidonic acid and antagonize ABCA1 expressions (30), and inhibition of p-cPLA2 activity blocked cholesterol accumulation in these cells (Fig. 6G). Interestingly, MEFs bearing both the N-Ter and C-Ter mutations accumulated large amounts of cholesterol (Fig. 6B) and had low ABCA1 (Fig. 6D) and PLTP (Fig. 6E) transcript levels.

Because hydrolysis of cholesterol esters is the initial step of cholesterol export, and only free cholesterol is available for its cellular efflux (31,32), we tested whether LRP1 modifies the expression of the neutral cholesterol ester hydrolase (NCEH) (17). Fig. 6I shows that LRP1^{-/-} MEFs contained lower NCEH1 transcript levels than LRP1^{+/+} MEFs. Moreover, MEFs bearing the mutated C-Ter motif expressed higher NCEH1

mRNA levels than MEFs bearing the mutated N-Ter mutation (Fig. 6I). Thus, the 1st (N-Ter) and the 2nd NPXY motif (C-Ter) within the LRP1 β -chain have opposed effects on ABCA1 and NCEH1 mRNA levels. The 1st motif activates, whereas the 2nd motif, through the binding of Erk2 decreases transcript levels of these two regulators of free cholesterol export.

DISCUSSION

We investigated in this study how the ubiquitously expressed transmembrane receptor LRP1 prevents intracellular cholesterol accumulation. We show that two pathways are involved. TGF β stimulates Wnt5a expression that down-regulates cholesterol biosynthesis and increases cholesterol efflux. This pathway requires the extracellular domain of LRP1. A second mechanism involves the C-terminal NPxY motif within the cytoplasmic domain of LRP1, which recruits Erk2. This is accompanied by an increase in the expression of NCEH1 and ABCA1 that allows cholesteryl-esters to be hydrolyzed and free cholesterol to be exported from cells. This dual role of LRP1 concurs to efficiently maintain cholesterol homeostasis in cells (Fig. 7).

Our data show that Wnt5a restricts the cholesterol biosynthetic pathway by preventing proteolytic activation of SREBP-2 and decreasing HMG-CoA synthase and reductase expressions. Furthermore, Wnt5a stabilizes Insig-1 expression and triggers the action of oxysterols on the regulatory pathway. However, how Wnt5a interferes with sterols is unknown. Since there is no sterol-sensing domain on Wnt ligands, it is unlikely that Wnt5a binds directly oxysterols. Similarly, in the Insig-1/Scap/sterol complex, oxysterols do not bind to Scap, and a separate (not-yet-identified) sterol-binding protein might mediate the effects of sterols on Scap. Wnt5a might activate a sterol-binding protein that binds to Scap and stabilizes the Insig-1/Scap/Cholesterol complex.

Wnt5a, which mediates a non-canonical Wnt signaling, is expressed at low levels in atherosclerotic plaques (33), and its expression increases in advanced lesions (34) and in lesions that undergo vascular calcification (12). Wnt5a is also associated with macrophage inflammatory responses (35) and plaque instability (36). Thus, the increase in Wnt5a levels in advanced lesions

could be an attempt to block intracellular cholesterol accumulation, and this might ultimately lead to the deleterious effect of calcifying the lesions.

ABCG1 is widely expressed in many tissues and cell types, including macrophages (37-40), adipose tissue (41), neurons (42), and vascular smooth muscle cells (5). As reported by Zhou et al., LRP1-/- primary cultured murine vSMCs with low levels of endogenous Wnt5a expressed very low levels of ABCG1 (5). Here we show that deletion of Wnt5a in cultured human vSMCs or in 3T3-L1 preadipocytes using siRNA technology also decreases ABCG1 expression (Fig. 2G). In agreement with these results, ABCG1 mRNA and protein levels are increased in L-MTK cells and in MEFs stably over expressing Wnt5a (Fig. 2B-F). On the other hand, in LRP1+/+ MEFs, we have not seen major differences in ABCG1 expressions compared to LRP1-/- MEFs. This indicates that Wnt5a induces ABCG1 expression in a cell specific manner. ABCG1 is induced and translocated from the ER to the plasma membrane by LXR/RXR heterodimers (43-45), and this promotes the efflux of cellular cholesterol to circulating HDL (42-44,46). Nonetheless, an earlier study reported that ABCG1 mRNA expression can be induced by LXR/RXR-independent mechanisms (47). Indeed, ABCG1 can show both intracellular and plasma membrane localizations, even in the absence of LXR/RXR activators (47). Our results are consistent with this observation, and show that Wnt5a stimulates ABCG1 mRNA and protein levels independently of LXRs. This stimulation, by increasing the level of protein in the cell might contribute to the redistribution of ABCG1 from the endoplasmic reticulum or another cellular compartment (48) into the plasma membrane. TGF β is known to increase the expression of ABCG1, ABCA1, and cholesterol efflux in macrophage derived foam cells, with a particularly strong effect on ABCG1 (49). Since TGF β participates in the inhibition of macrophage foam cell formation induced by very low-density lipoprotein remnants (50), these results suggest an antiatherogenic role for the TGF β /LRP1/Wnt5a pathway.

In the present study, we also show that, independently of the Wnt5a pathway, the cytoplasmic tail of LRP1 is sufficient to limit cholesterol accumulation. We identified the 2nd

NPxY motif within the cytoplasmic tail of LRP1 as being critically involved in the regulation of ABCA1 expression, another determinant protein for cholesterol export. We show that mutation of this domain blocks cholesterol accumulation in MEFs upon induction of adipogenesis. We also show that the 2nd NPxY motif within the cytoplasmic tail of LRP1 is required for the binding of Erk2, and that Erk1/2 is phosphorylated when cholesterol does not accumulate. Prior investigations have shown that p-Erk1/2 induces phosphorylation of the cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂). Activated cPLA₂ then releases arachidonic acid from the phospholipid pool, and suppresses ABCA1 expression (5). Here we show that the cytoplasmic tail of LRP1 not only recruits Erk2, but also mediates cPLA₂ phosphorylation in MEFs. Interestingly, MEFs bearing the N-Ter mutation or both the N-Ter and C-Ter mutations accumulate large amounts of cholesterol and behave like LRP1^{-/-} MEFs. They also exhibit low transcript levels of ABCA1, PLTP and NCEH1. This suggests that upon adipogenesis, a yet unidentified activator of ABCA1 binds to the N-Ter NPxY motif of the LRP1 β -chain. In conclusion, these regulatory events, which we have shown here in MEFs, could be modulated further in a cell type specific manner in vivo, depending on the presence and activity of interacting proteins and ancillary factors.

How LRP1 induces Wnt5a expression remains unclear. It might involve cleavage and nuclear translocation of the cytoplasmic domain of LRP1, a mechanism known to stimulate transcription. Likewise, upon LPS treatment intramembranous processing of LRP1 releases its cytoplasmic domain from the plasma membrane and promotes its translocation to the nucleus, where it binds to and represses IFN- γ transcription (51).

Collectively, the data presented in our study demonstrate that Wnt5a and LRP1 have a remarkable synergistic effect on the regulation of intracellular cholesterol homeostasis. When LRP1 is deleted, cells accumulate large amounts of cholesterol due to the loss of ABCA1, NCEH1 and Wnt5. TGF- β stimulated LRP1-mediated induction of Wnt5a is an event that requires the extracellular domain of LRP1 (Fig. 7). Wnt5a inhibits endogenous cholesterol biosynthesis and increases expression of ABCG1, one of the main proteins for cholesterol export (Fig. 7). In contrast,

the expression of ABCA1 and NCEH1 is under the control of the 1st and the 2nd NPXY motifs within the LRP1 β -chain (Fig. 7). Characterization of new factors interfering with the TGF β /LRP1/Wnt5a pathway is a prerequisite to develop suitable new treatment strategies that will complement lipid-lowering therapies and help to fight against cholesterol accumulation diseases such as atherosclerosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Jean Marc Bornert (IGBMC, University of Strasbourg) for technical advice and expertise, Christian Bronner (IGBMC, University of Strasbourg) for human vascular smooth muscle cells, Daniel Metzger (IGBMC, University of Strasbourg), Russell DeBose-Boyd and Jin Ye (Department of Molecular Genetics, UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX) for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from Fondation de France, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-Physio-032-01 and ANR-09-BLAN-0121-01). J.H. is supported by NIH grant HL63762.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Z.E.A. and J.T. contributed equally to this work. Z.E.A., J.T., M.J., L.H., H.J., R.L.M., M.M., E.S., A.Z., and V.B. performed immunofluorescence, cell fractionation, cholesterol measurements and immunoblot experiments. M.M., V.B., J.T., J.M.G. generated and analyzed the LRP1 mutant cells, Z.E.A., J.T., R.L.M., V.B., L.H., and H.J. characterized the aTgWnt5a mice. Z.E.A., J.T., V.B., E.S., and M.J. performed qRT-PCR experiments. J.M.G. and C.B. generated recombinant proteins. J.T. performed cholesterol efflux and Luciferase experiments. V.B., J.T., R.L.M., M.J., and Z.E.A. performed all statistical analysis. D.B., D.T., C.S., and A.V.D. performed the mass spectrometry analysis. All authors analyzed and discussed the data. P.B. coordinated the project. J.H., V.B., and P.B. supervised the project and wrote the manuscript.

REFERENCES

1. Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T. M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T. B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, P. M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M. M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Mussolino, M., Nichol, G., Roger, V. L., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N. D., and Wylie-Rosett, J. (2010) Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **121**, e46-e215
2. Williams, K. J., and Tabas, I. (1995) The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 551-561
3. Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H., and Stanley, K. K. (1988) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *The EMBO journal* **7**, 4119-4127
4. May, P., Woldt, E., Matz, R. L., and Boucher, P. (2007) The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Annals of medicine* **39**, 219-228
5. Zhou, L., Choi, H. Y., Li, W. P., Xu, F., and Herz, J. (2009) LRP1 controls cPLA2 phosphorylation, ABCA1 expression and cellular cholesterol export. *Plos One* **4**, e6853
6. Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W. P., Anderson, R. G., and Herz, J. (2003) LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* **300**, 329-332
7. Boucher, P., Li, W. P., Matz, R. L., Takayama, Y., Auwerx, J., Anderson, R. G., and Herz, J. (2007) LRP1 functions as an atheroprotective integrator of TGFbeta and PDGF signals in the vascular wall: implications for Marfan syndrome. *PLoS One* **2**, e448
8. Boucher, P., Liu, P., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Anderson, R. G., and Herz, J. (2002) Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of the low Density lipoprotein receptor-related protein in caveolae. *J Biol Chem* **277**, 15507-15513

9. Loukinova, E., Ranganathan, S., Kuznetsov, S., Gorlatova, N., Migliorini, M. M., Loukinov, D., Ulery, P. G., Mikhailenko, I., Lawrence, D. A., and Strickland, D. K. (2002) Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF. *J Biol Chem* **277**, 15499-15506
10. Zhou, L., Takayama, Y., Boucher, P., Tallquist, M. D., and Herz, J. (2009) LRP1 regulates architecture of the vascular wall by controlling PDGFRbeta-dependent phosphatidylinositol 3-kinase activation. *PLoS One* **4**, e6922
11. Terrand, J., Bruban, V., Zhou, L., Gong, W., El Asmar, Z., May, P., Zurhove, K., Haffner, P., Philippe, C., Woldt, E., Matz, R. L., Gracia, C., Metzger, D., Auwerx, J., Herz, J., and Boucher, P. (2009) LRP1 controls intracellular cholesterol storage and fatty acid synthesis through modulation of Wnt signaling. *J Biol Chem* **284**, 381-388
12. Woldt, E., Terrand, J., Mlih, M., Matz, R. L., Bruban, V., Coudane, F., Foppolo, S., El Asmar, Z., Chollet, M. E., Ninio, E., Bednarczyk, A., Thierse, D., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., Boudier, C., Wahli, W., Chambon, P., Metzger, D., Herz, J., and Boucher, P. (2012) The nuclear hormone receptor PPARgamma counteracts vascular calcification by inhibiting Wnt5a signalling in vascular smooth muscle cells. *Nat Commun* **3**, 1077
13. Kumawat, K., Menzen, M. H., Bos, I. S., Baarsma, H. A., Borger, P., Roth, M., Tamm, M., Halayko, A. J., Simoons, M., Prins, A., Postma, D. S., Schmidt, M., and Gosens, R. (2013) Noncanonical WNT-5A signaling regulates TGF-beta-induced extracellular matrix production by airway smooth muscle cells. *FASEB J* **27**, 1631-1643
14. Goldstein, J. L., DeBose-Boyd, R. A., and Brown, M. S. (2006) Protein sensors for membrane sterols. *Cell* **124**, 35-46
15. Horton, J. D., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2002) SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* **109**, 1125-1131
16. Horton, J. D., Shimomura, I., Brown, M. S., Hammer, R. E., Goldstein, J. L., and Shimano, H. (1998) Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest* **101**, 2331-2339
17. Sekiya, M., Osuga, J., Igarashi, M., Okazaki, H., and Ishibashi, S. (2011) The role of neutral cholesterol ester hydrolysis in macrophage foam cells. *J Atheroscler Thromb* **18**, 359-364
18. Hua, X., Sakai, J., Ho, Y. K., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1995) Hairpin orientation of sterol regulatory element-binding protein-2 in cell membranes as determined by protease protection. *J Biol Chem* **270**, 29422-29427
19. Sakai, J., Duncan, E. A., Rawson, R. B., Hua, X., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1996) Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell* **85**, 1037-1046
20. Hua, X., Sakai, J., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1996) Regulated cleavage of sterol regulatory element binding proteins requires sequences on both sides of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **271**, 10379-10384
21. Lorkowski, S., Kratz, M., Wenner, C., Schmidt, R., Weitkamp, B., Fobker, M., Reinhardt, J., Rauterberg, J., Galinski, E. A., and Cullen, P. (2001) Expression of the ATP-binding cassette transporter gene ABCG1 (ABC8) in Tangier disease. *Biochem Biophys Res Commun* **283**, 821-830
22. 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
23. Vedhachalam, C., Duong, P. T., Nickel, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Saito, H., Rothblat, G. H., Lund-Katz, S., and Phillips, M. C. (2007) Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* **282**, 25123-25130

24. Vedhachalam, C., Ghering, A. B., Davidson, W. S., Lund-Katz, S., Rothblat, G. H., and Phillips, M. C. (2007) ABCA1-induced cell surface binding sites for ApoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 1603-1609
25. Russell, D. W. (2000) Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochim Biophys Acta* **1529**, 126-135
26. Xu, D., Wang, Z., Zhang, Y., Jiang, W., Pan, Y., Song, B. L., and Chen, Y. (2015) PAQR3 modulates cholesterol homeostasis by anchoring Scap/SREBP complex to the Golgi apparatus. *Nat Commun* **6**, 8100
27. Krause, B. R., and Hartman, A. D. (1984) Adipose tissue and cholesterol metabolism. *J Lipid Res* **25**, 97-110
28. Kovanen, P. T., Nikkila, E. A., and Miettinen, T. A. (1975) Regulation of cholesterol synthesis and storage in fat cells. *J Lipid Res* **16**, 211-223
29. Oram, J. F., Wolfbauer, G., Vaughan, A. M., Tang, C., and Albers, J. J. (2003) Phospholipid transfer protein interacts with and stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and enhances cholesterol efflux from cells. *J Biol Chem* **278**, 52379-52385
30. Ou, J., Tu, H., Shan, B., Luk, A., DeBose-Boyd, R. A., Bashmakov, Y., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (2001) Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6027-6032
31. Ghosh, S., St Clair, R. W., and Rudel, L. L. (2003) Mobilization of cytoplasmic CE droplets by overexpression of human macrophage cholesteryl ester hydrolase. *J Lipid Res* **44**, 1833-1840
32. Soccio, R. E., and Breslow, J. L. (2004) Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1150-1160
33. Christman, M. A., 2nd, Goetz, D. J., Dickerson, E., McCall, K. D., Lewis, C. J., Benencia, F., Silver, M. J., Kohn, L. D., and Malgor, R. (2008) Wnt5a is expressed in murine and human atherosclerotic lesions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H2864-2870
34. Malgor, R., Bhatt, P. M., Connolly, B. A., Jacoby, D. L., Feldmann, K. J., Silver, M. J., Nakazawa, M., McCall, K. D., and Goetz, D. J. (2014) Wnt5a, TLR2 and TLR4 are elevated in advanced human atherosclerotic lesions. *Inflamm Res* **63**, 277-285
35. Pereira, C. P., Bachli, E. B., and Schoedon, G. (2009) The wnt pathway: a macrophage effector molecule that triggers inflammation. *Curr Atheroscler Rep* **11**, 236-242
36. Tsaousi, A., Mill, C., and George, S. J. (2011) The Wnt pathways in vascular disease: lessons from vascular development. *Curr Opin Lipidol* **22**, 350-357
37. Moore, K. J., Sheedy, F. J., and Fisher, E. A. (2013) Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* **13**, 709-721
38. Rosenson, R. S., Brewer, H. B., Jr., Davidson, W. S., Fayad, Z. A., Fuster, V., Goldstein, J., Hellerstein, M., Jiang, X. C., Phillips, M. C., Rader, D. J., Remaley, A. T., Rothblat, G. H., Tall, A. R., and Yvan-Charvet, L. (2012) Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation* **125**, 1905-1919
39. 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
40. Phillips, M. C. (2014) Molecular Mechanisms of Cellular Cholesterol Efflux. *J Biol Chem* **289**, 24020-24029
41. Buchmann, J., Meyer, C., Neschen, S., Augustin, R., Schmolz, K., Kluge, R., Al-Hasani, H., Jurgens, H., Eulenberg, K., Wehr, R., Dohrmann, C., Joost, H. G., and Schurmann, A. (2007) Ablation of the cholesterol transporter adenosine triphosphate-binding cassette transporter G1 reduces adipose cell size and protects against diet-induced obesity. *Endocrinology* **148**, 1561-1573
42. Tarr, P. T., and Edwards, P. A. (2008) ABCG1 and ABCG4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2. *J Lipid Res* **49**, 169-182

43. 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
44. 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
45. Tarling, E. J., and Edwards, P. A. (2012) Dancing with the sterols: critical roles for ABCG1, ABCA1, miRNAs, and nuclear and cell surface receptors in controlling cellular sterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 386-395
46. 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
47. Xie, Q., Engel, T., Schnoor, M., Niehaus, J., Hofnagel, O., Buers, I., Cullen, P., Seedorf, U., Assmann, G., and Lorkowski, S. (2006) Cell surface localization of ABCG1 does not require LXR activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, e143-144; author reply e145
48. Maxfield, F. R., and Tabas, I. (2005) Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* **438**, 612-621
49. Hu, Y. W., Wang, Q., Ma, X., Li, X. X., Liu, X. H., Xiao, J., Liao, D. F., Xiang, J., and Tang, C. K. (2010) TGF-beta1 up-regulates expression of ABCA1, ABCG1 and SR-BI through liver X receptor alpha signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells. *J Atheroscler Thromb* **17**, 493-502
50. Argmann, C. A., Van Den Diepstraten, C. H., Sawyez, C. G., Edwards, J. Y., Hegele, R. A., Wolfe, B. M., and Huff, M. W. (2001) Transforming growth factor-beta1 inhibits macrophage cholesteryl ester accumulation induced by native and oxidized VLDL remnants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 2011-2018
51. Zurhove, K., Nakajima, C., Herz, J., Bock, H. H., and May, P. (2008) Gamma-secretase limits the inflammatory response through the processing of LRP1. *Sci Signal* **1**, ra15

FIGURE LEGENDS

Figure 1: TGFβ stimulates Wnt5a expression via LRP1's extracellular domain. **A**, Western blot analysis of Wnt5a upon TGFβ treatments (5 ng/ml) in LRP1^{+/+} and LRP1^{-/-} MEFs (n=4). **B**, Quantitative RT-PCR analysis of Wnt5a upon TGFβ treatments in LRP1^{+/+} and LRP1^{-/-} MEFs, and in LRP1^{-/-} MEFs stably transfected with an expression vector coding for the cytoplasmic tail of LRP1 (β-chain), or the mock control (Mock) (n=4). Values are means ± SEM with *, p < 0.05.

Figure 2: Wnt5a stimulates cholesterol efflux and ABCG1 expression. Cells were untreated (T0) or treated with an adipogenic mixture for 10 days (T10) to stimulate cholesterol accumulation. **A**, Cholesterol efflux in LRP1^{-/-} MEFs stably transfected with an expression vector coding for Wnt5a (LRP1^{-/-}, Wnt5a) or the mock control (LRP1^{-/-}, Mock) (n=4). **B**, Quantitative RT-PCR analysis of ABCG1 in LRP1^{+/+} and LRP1^{-/-} MEFs, and LRP1^{-/-} MEFs stably transfected with an expression vector coding for Wnt5a (LRP1^{-/-}, Wnt5a) or the mock control (LRP1^{-/-}, Mock) (n=7). **C**, Western blot analysis of the indicated genes in LRP1^{+/+}, LRP1^{-/-} MEFs, and LRP1^{-/-} MEFs stably transfected with Wnt5a (LRP1^{-/-}, Wnt5a) or mock (LRP1^{-/-}, Mock) (n=3). **D**, immunostaining of ABCG1 (green) in LRP1^{-/-} MEFs stably transfected with Wnt5a (LRP1^{-/-}, Wnt5a) or mock (LRP1^{-/-}, Mock). Nucleus is stained with Dapi in blue (n=6). **E**, Quantitative RT-PCR and **F**, representative Western blot analysis of ABCG1 in wild type (Wt) or Wnt5a stably transfected (Wnt5a⁺) LMTK cells (n=3). **G**, representative Western blot analysis of ABCG1 in 3T3-L1 preadipocytes and cultured human vSMCs treated with siWnt5a vs control (n=3). **H**, Quantitative RT-PCR analysis of the indicated genes in LMTK stably transfected with a Wnt5a expression vector (Wnt5a⁺) and in wild type cells (Wt) (n = 4). **I**, Effects of 6 and 8 hours of actinomycin D treatments on ABCG1 transcripts in LRP1^{+/+} and LRP1^{-/-} MEFs, and LRP1^{-/-} MEFs stably transfected with an expression vector coding for Wnt5a (LRP1^{-/-}, Wnt5a) or with a mock control (LRP1^{-/-}, Mock) (n

= 4). **J**, LRP1^{-/-}, Wnt5a MEFs transiently transfected with luciferase reporter containing the *ABCG1* promoter A, B, or an empty vector in untreated cells (n=3). Values are means $\pm$ SEM with *, $p < 0.05$.

Figure 3: Wnt5a-mediated inhibition of SREBP-2 processing and cholesterol biosynthesis. **A**, Quantitative RT-PCR analysis of the HMG-CoA reductase in LRP1^{+/+} and LRP1^{-/-} MEFs, and LRP1^{-/-} MEFs stably transfected with an expression vector coding for Wnt5a (-/-, Wnt5a) or the mock control (Mock) upon adipogenesis (n=7). **B**, HEK 293 cells were stably transfected with an expression vector coding for SREBP-2 and transiently transfected with an expression vector coding for Wnt5a or with an empty vector (mock). Cell lysate, membrane (Mb) and nuclear (N) extracts were subjected to SDS-PAGE followed by immunoblot analysis. *Precursors* and *Nuclear forms* denote the uncleaved membrane precursor and cleaved nuclear forms of SREBP-2, respectively (n=5). **C**, HEK 293 cells stably transfected with an expression vector coding for SREBP-2 were incubated at 37 °C in standard medium. After transient transfection with an expression vector coding for Wnt5a or mock cells were incubated in medium containing 5% sterol-depleting serum and treated for 20 h with a mixture of sterols containing the indicated final concentration of 25-hydroxycholesterol as described in the “experimental procedures”. Nuclear extracts and membrane fractions were prepared and an aliquot of each fraction (60µg of protein) was subjected to SDS-PAGE and immunoblot analysis (n=3). **D**, Densitometric scanning of the nuclear extracts (n=3). **E**, HEK 293 cells stably transfected with an expression vector coding for SREBP-2 were incubated at 37 °C in standard medium. After incubation for the indicated time with Wnt5a or mock conditioned medium membrane (Mb) and nuclear (N) extracts were subjected to 10% SDS-PAGE followed by immunoblot analysis (n=5). **F**, LRP1^{+/+} (+/+), and LRP1^{-/-} MEFs stably transfected with an expression vector coding for Wnt5a (-/-, Wnt5a) or a mock control (-/-, Mock) were transfected with pTK-Insig1-Myc. On day 0, cells were set up at 5×10^5 cells per 100 mm dish in medium containing 5% sterol-depleting serum. Cells were then switched to fresh medium containing 50 mM CHX in the presence of 1 µg/ml 25-hydroxycholesterol (25-OH). At the indicated time after CHX addition, cells were harvested and fractionated, and aliquots of whole-cell lysates were subjected to 10% SDS-PAGE and immunoblot analysis with monoclonal anti-Myc IgG against Insig-1 (n=4). Values are means $\pm$ SEM with *, $p < 0.05$.

Figure 4: Adipose tissue in aTgWnt5a mice display inhibition of the mevalonate pathway and increased ABCG1 expression. **A**, Quantitative RT-PCR analysis of ABCG1 in white adipose tissue from mice transgenic for Wnt5a (aTgWnt5a) and controls (Ctrl). **B**, Western blot analysis of the indicated proteins in white adipose tissue from aTgWnt5a and control mice. **C**, Quantitative RT-PCR analysis of ABCG1 in purified white adipocytes. **D**, Densitometry of western blot analysis of macrophage markers in white adipose tissue. **E**, Quantitative RT-PCR analysis of the indicated genes in adipose tissue from aTgWnt5a and controls. **F**, Quantitative RT-PCR analysis of Insig-1 and PAQR3 in adipose tissue from aTgWnt5a and control mice. **G**, Cellular cholesterol in white adipose tissue from aTgWnt5a and controls. **H**, White adipocyte size in aTgWnt5a and controls. **I**, Western blot analysis of the LDLr in white adipose tissue from aTgWnt5a and controls. Data represent mean $\pm$ SEM from 5-7 mice in each group. *, $p < 0.05$.

Figure 5: The cytoplasmic tail of LRP1 blocks cholesterol accumulation. Cells were treated with the adipogenic mixture for 10 days to stimulate cholesterol accumulation. **A**, Schematic representation of LRP1's cytoplasmic tail (β -chain) with NPxY motifs. **B**, Plates of LRP1 ^{+/+}, LRP1 ^{-/-} MEFs, and MEFs expressing LRP1's β -chain, or mock. The extent of cellular lipid accumulation was determined by Oil Red O staining (n=5). **C**, Quantitative RT-PCR analysis of the indicated genes in LRP1 ^{+/+} and LRP1 ^{-/-} MEFs, and in MEFs expressing the β -chain of LRP1 or mock (n=5). Values are means $\pm$ SEM with *, $p < 0.05$.

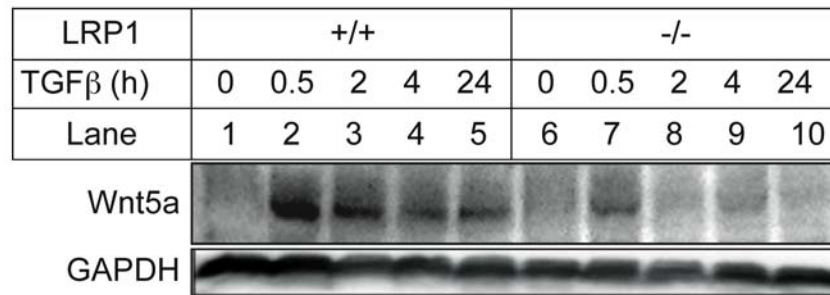
Figure 6: The 2nd NPxY motif within the cytoplasmic tail of LRP1 blocks cholesterol accumulation. Cells were treated with the adipogenic mixture for 10 days to stimulate cholesterol accumulation. **A**, Schematic representation of LRP1's cytoplasmic tail with the NPxY motif mutations. **B**, Plates of LRP1^{-/-}

MEFs stably transfected with an expression vector coding for the β -chain of LRP1 and bearing the proximal NPxY (N-Ter), the distal NPxY (C-Ter) or both NPxY motifs (N-Ter + C-Ter) mutated (n=8). The extent of cellular lipid accumulation was determined by Oil Red O staining. **C**, Western blot analysis of the indicated proteins (representative of n=3) and **D**, Quantitative RT-PCR analysis of ABCA1 and **E**, PLTP, in the N-Ter, the C-Ter, the N-Ter + C-Ter mutants, and the mock control (n=4). **F**, Cholesterol efflux in the N-Ter, the C-Ter, the N-Ter + C-Ter mutants, and the mock control (n=3). **G**, Treatments of the N-Ter and the C-Ter mutants with a p-cPLA2 α inhibitor (400 μ M). The extent of cellular lipid accumulation was determined by Oil Red O staining. A representative experiment is shown (n=3). **H**, Quantitative RT-PCR analysis of ABCG1 (n=7), and **I**, NCEH1 in the N-Ter, the C-Ter, the N-Ter + C-Ter mutants, and the mock control (n=4). Values are means $\pm$ SEM with *, $p < 0.05$. NS=Not significant.

Figure 7: A schematic diagram of LRP1/Wnt5a-dependent inhibition of intracellular cholesterol accumulation. TGF β through the LRP1 extracellular domain positively regulates a canonical Wnt5a signaling pathway. Wnt5a stimulates ABCG1-mediated cholesterol export. Wnt5a also inhibits SREBP-2 processing and cholesterol biosynthesis. Furthermore, the tail of LRP1 independently of Wnt5a, blocks cholesterol accumulation through the binding of Erk2 to the second NPxY motif, and the concomitant stimulation of ABCA1 and NCEH1 expressions. The synergy of the mechanisms that signal through both the extracellular domain and the cytoplasmic tail of LRP1 limits cholesterol intracellular accumulation. Conversely, in the absence of LRP1, Wnt5a is down regulated, and cells accumulate cholesterol.

FIGURE 1

A



B

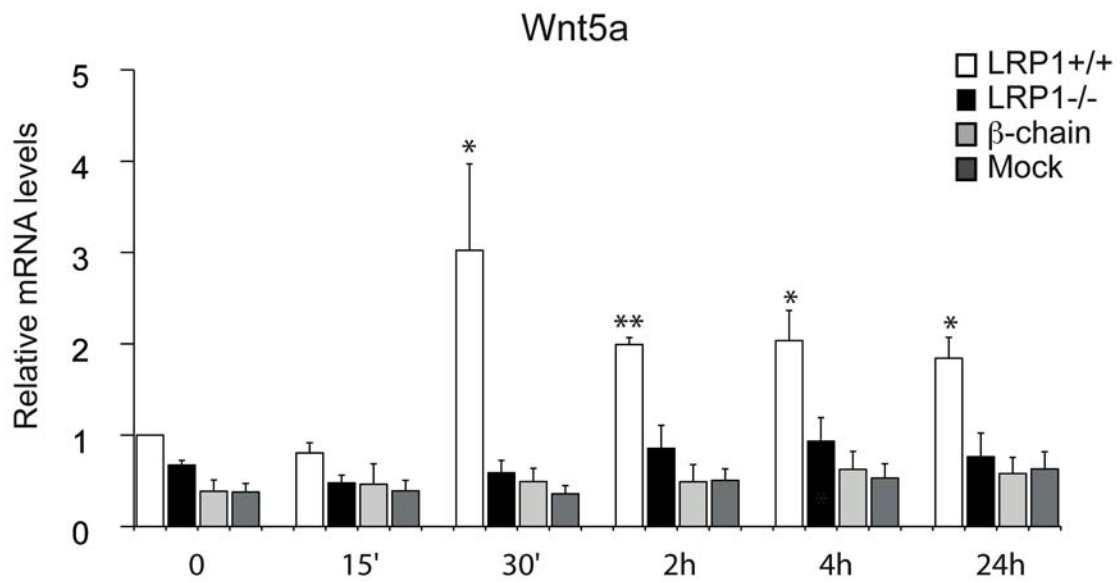


FIGURE 2

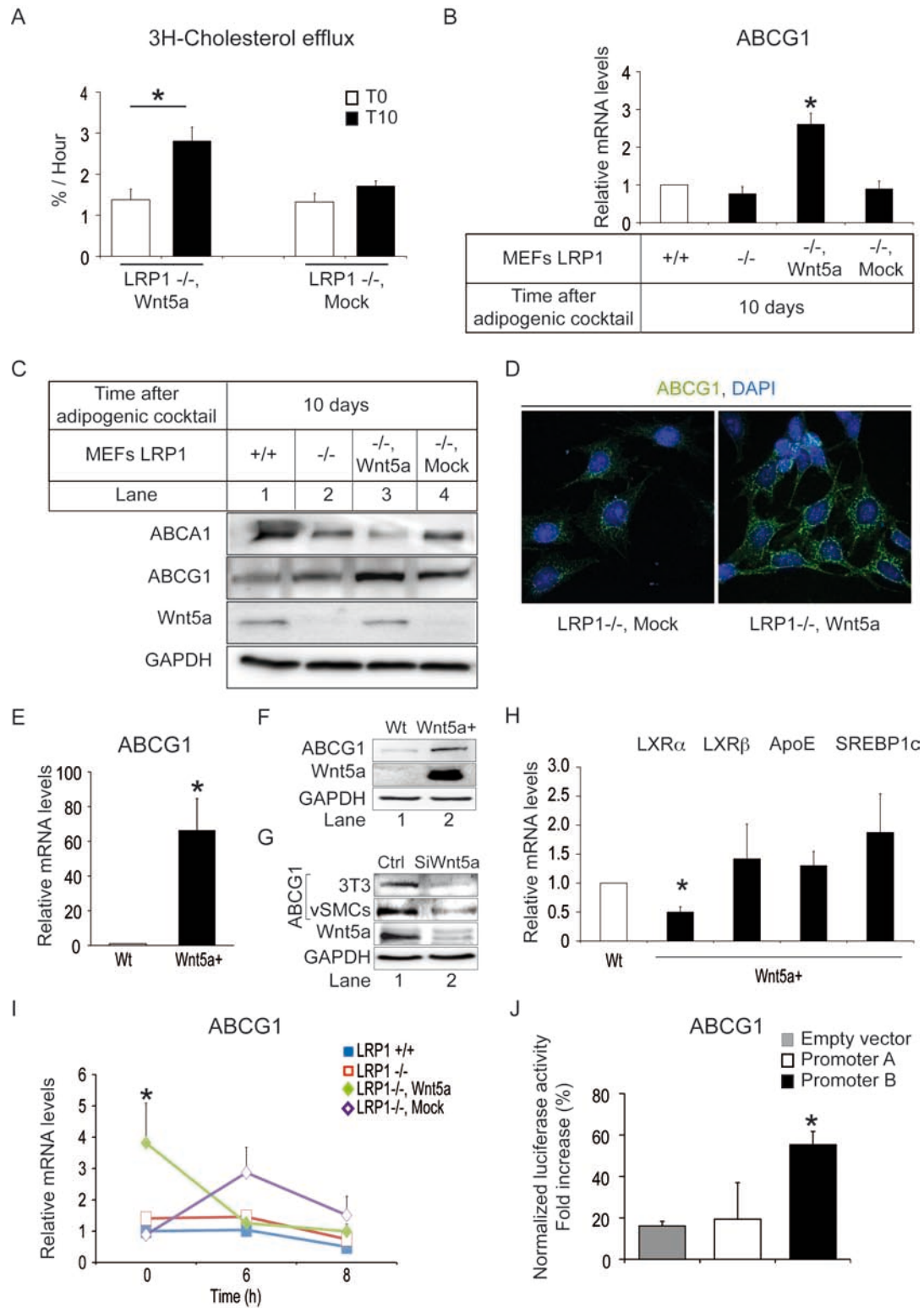


FIGURE 3

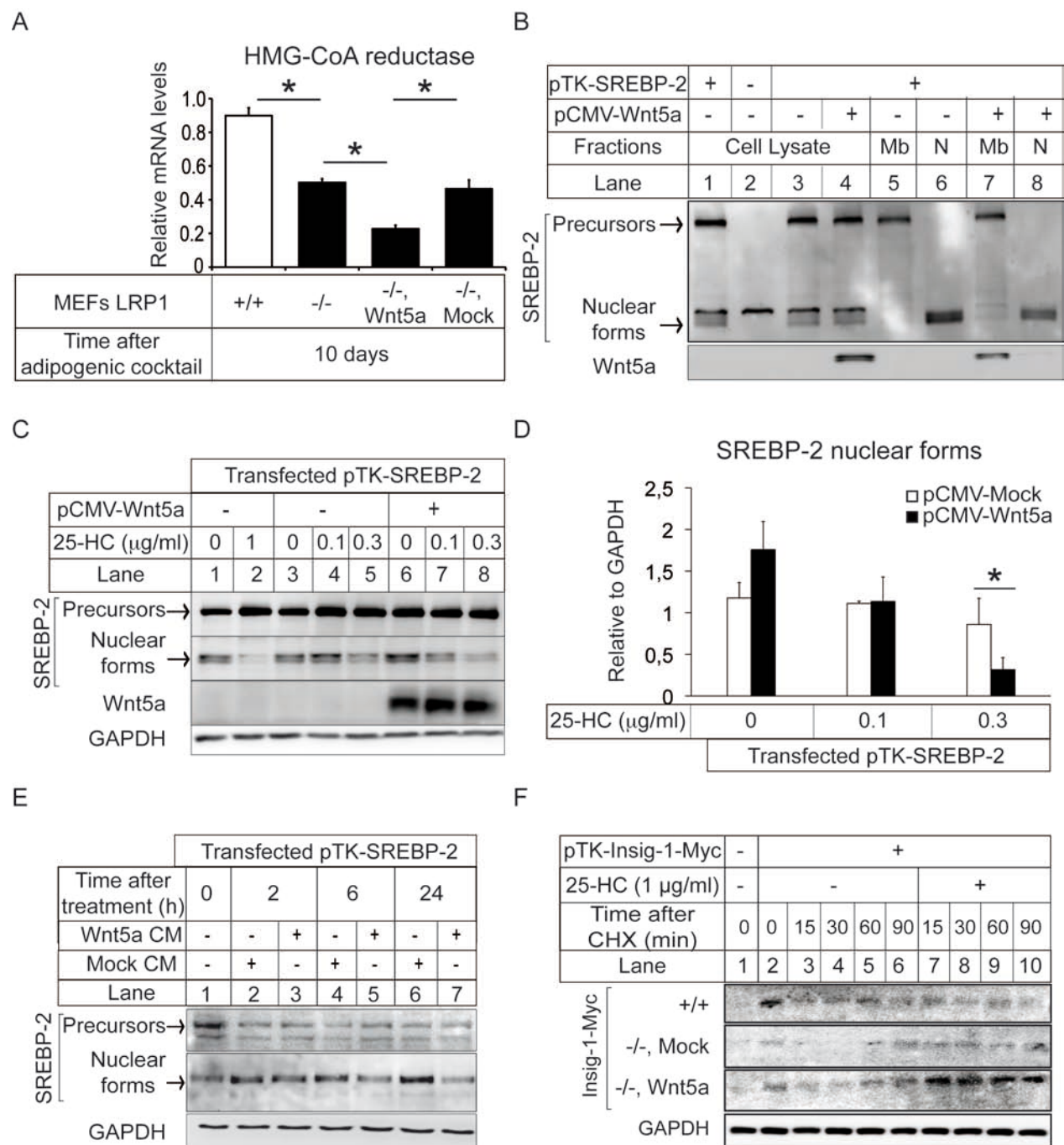


FIGURE 4

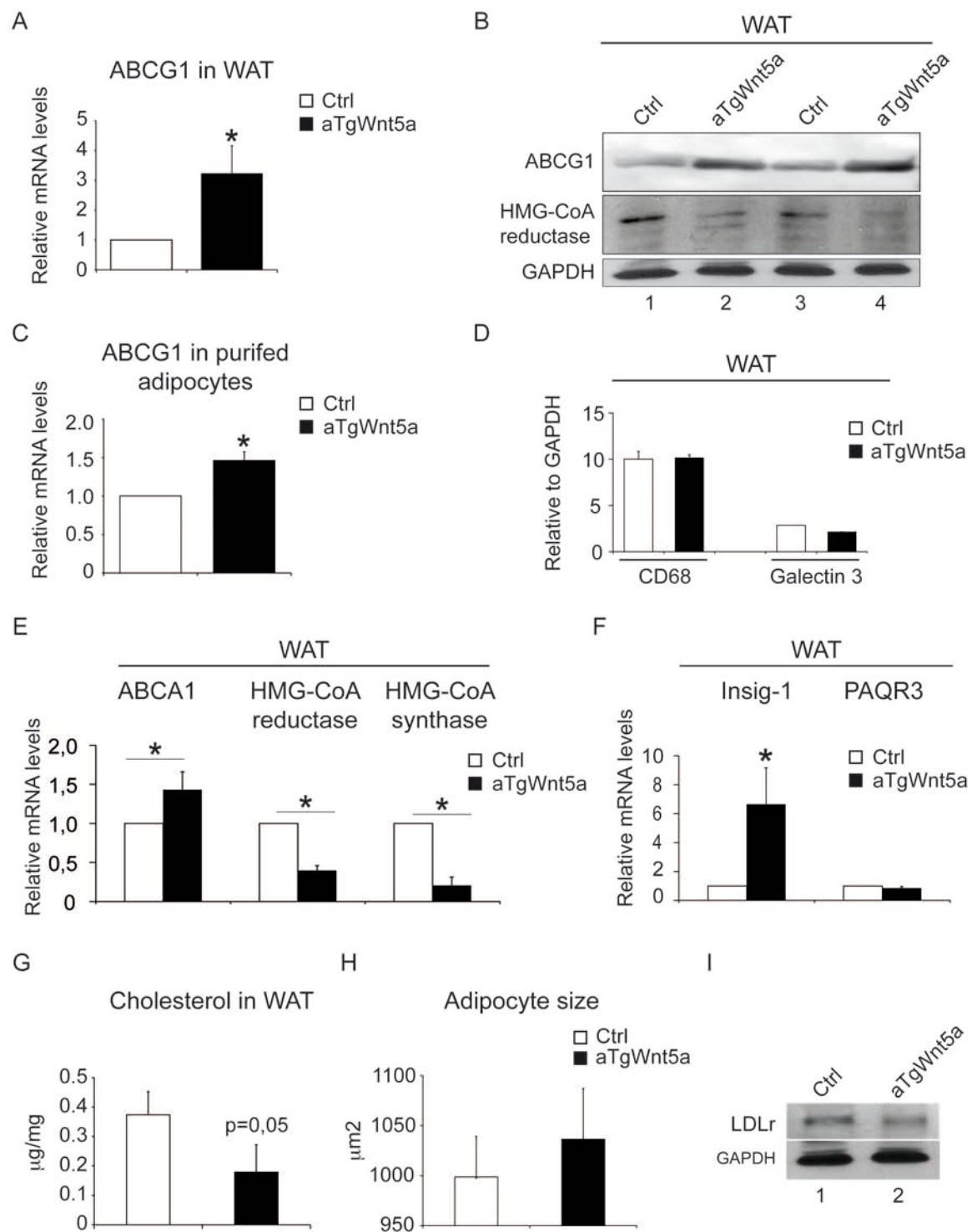


FIGURE 5

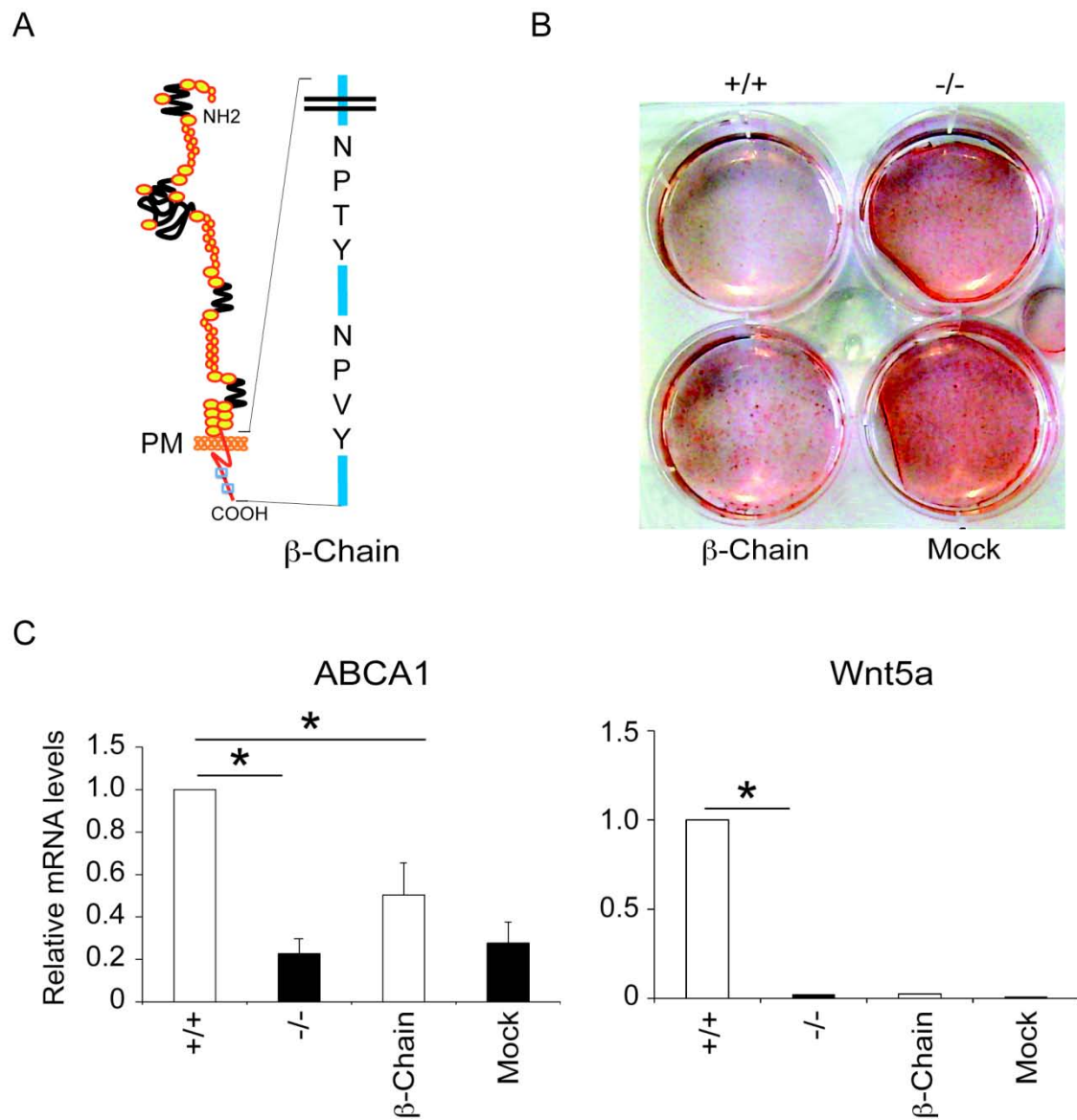


FIGURE 6

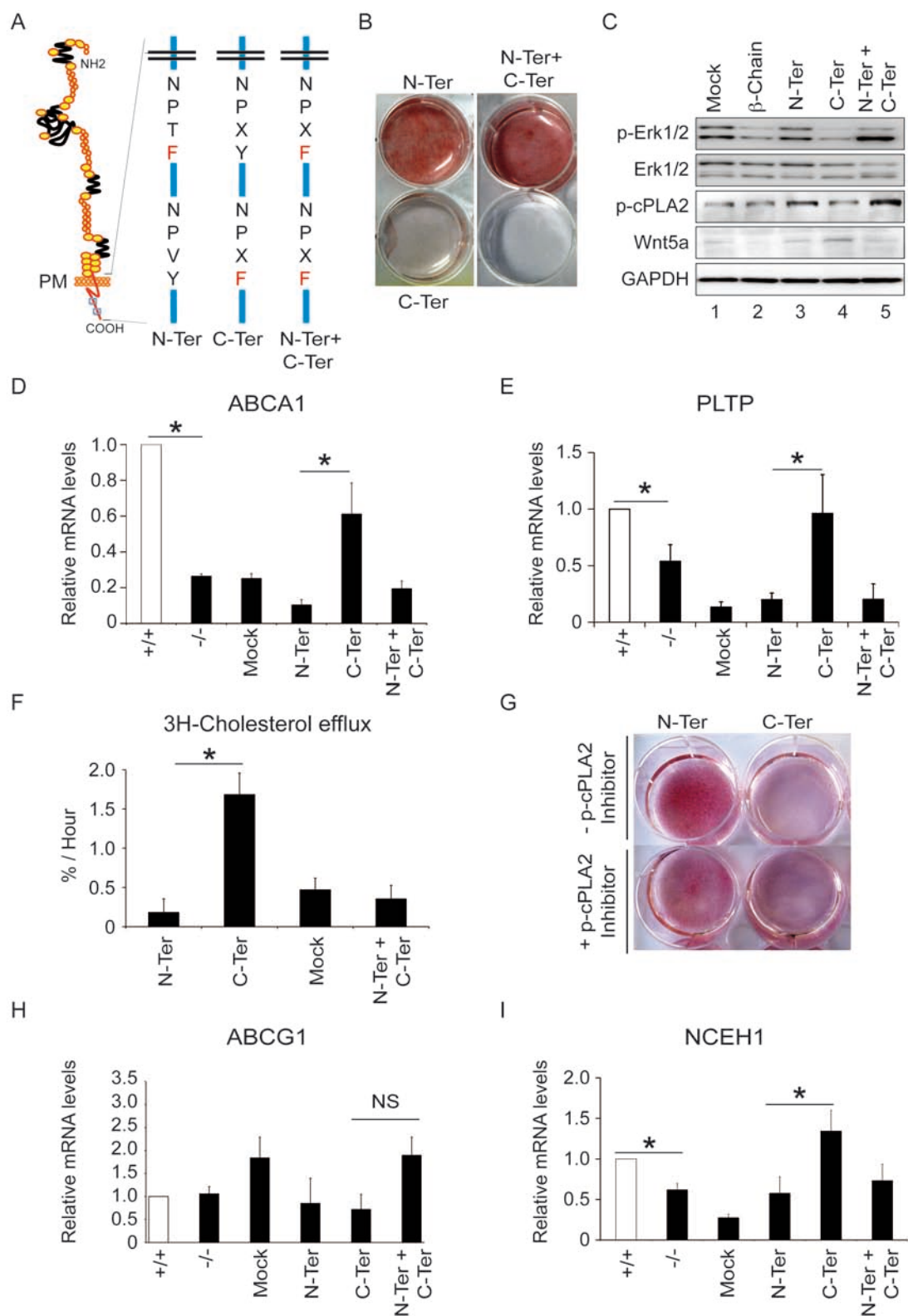
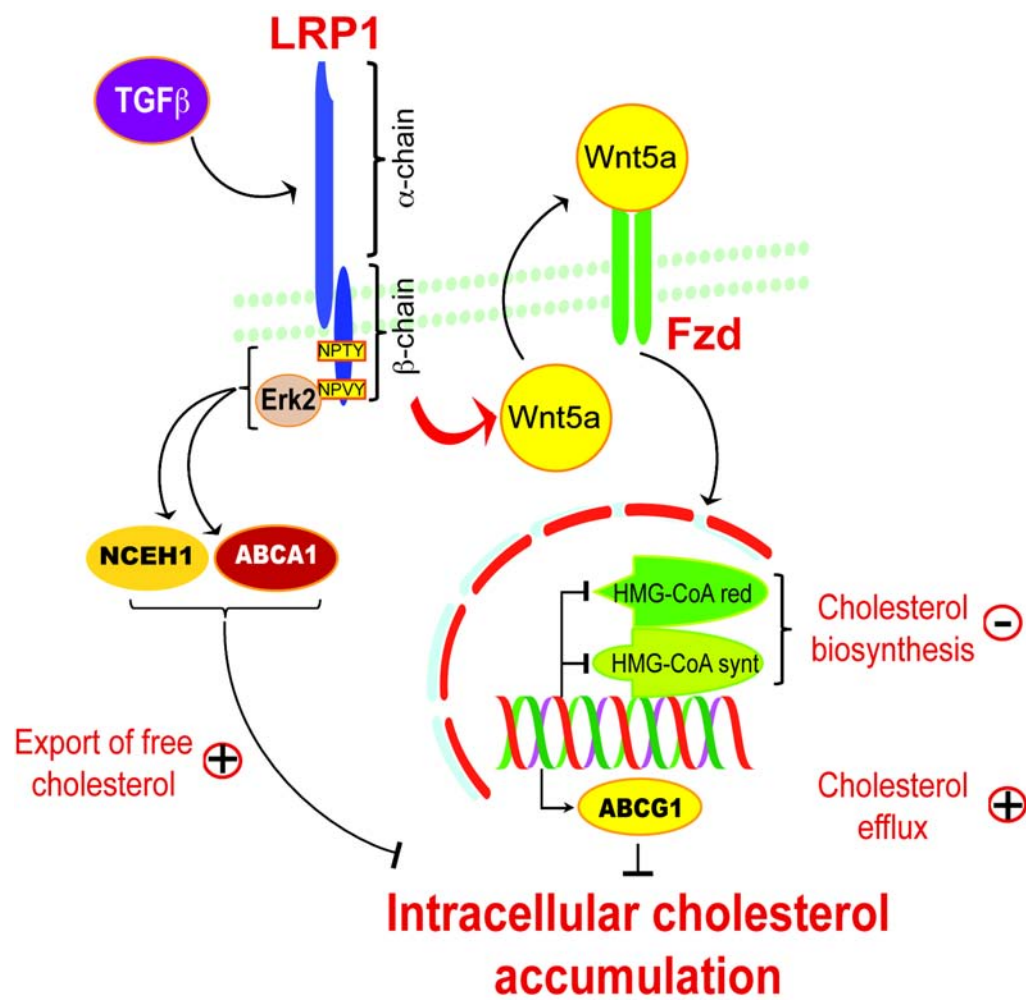


FIGURE 7



Conclusion // Partie I

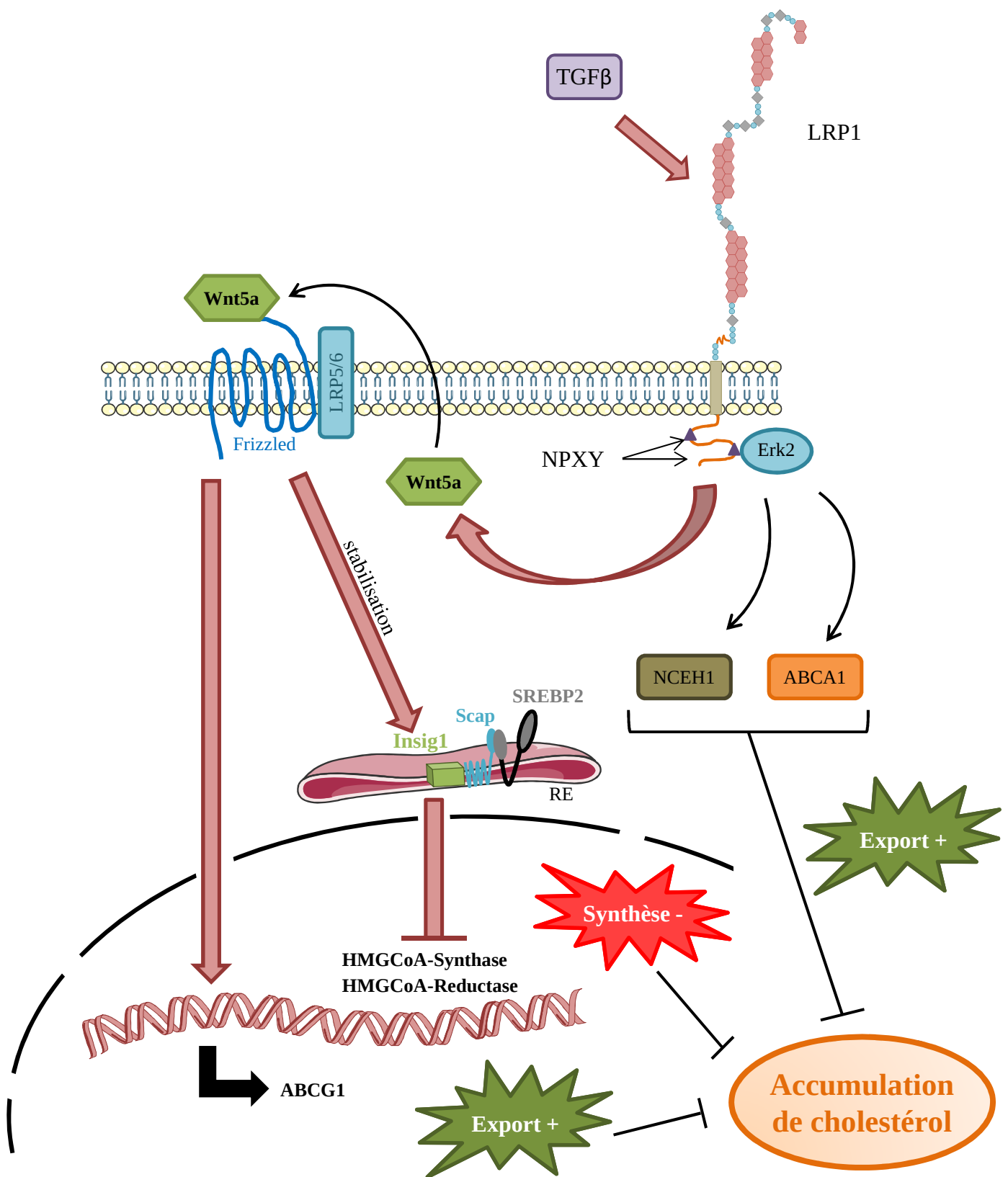


Figure 64 : Hypothèse mécanistique de l'effet de la signalisation LRP1/Wnt5a sur le métabolisme du cholestérol. TGFβ stimule l'expression de Wnt5a via le domaine extracellulaire de LRP1. Wnt5a active une signalisation qui conduit à l'augmentation de l'expression de ABCG1 et la diminution de l'expression de l'HMGCoA-Reductase. LRP1 contrôle également l'expression de ABCA1 et NCEH1 par une voie indépendante de Wnt5a.

L'objectif de cette première partie du projet de thèse était de caractériser les mécanismes par lesquels la voie de signalisation LRP1/Wnt5a limite l'accumulation intracellulaire de cholestérol.

Nos travaux ont montré que le domaine extracellulaire du récepteur LRP1 permet l'activation par TGF β d'une voie impliquant Wnt5a, qui agit alors sur deux paramètres du métabolisme du cholestérol pour limiter son accumulation dans les cellules :

- Wnt5a inhibe la synthèse endogène de cholestérol en interférant avec la translocation nucléaire de SREBP2, via la stabilisation de Insig1.
- Wnt5a active l'efflux de cholestérol en augmentant l'expression du transporteur ABCG1.

Par ailleurs, l'équipe a montré que les motifs NPXY du domaine intracellulaire de LRP1 contrôlent une voie de signalisation impliquant Erk2 qui régule l'expression de ABCA1 et NCEH, et ce indépendamment de Wnt5a.

Ainsi, LRP1, par deux mécanismes distincts et complémentaires, limite l'accumulation intracellulaire de cholestérol (figure 64).

Ces données apportent de nouvelles informations sur le rôle de LRP1 et de la signalisation Wnt5a dans le métabolisme du cholestérol et ouvrent de nouvelles perspectives quant à leurs rôles dans l'athérosclérose et son traitement.

Résultats // Partie II

Confirmation du rôle de Wnt5a dans la protection contre l'athérosclérose

L'athérosclérose est caractérisée par l'accumulation de cellules spumeuses, de cholestérol libre, de matrice extracellulaire et de dépôts calcaires dans l'espace sous-endothélial des parois artérielles. Les cellules spumeuses sont des macrophages et des CMLv qui accumulent de grandes quantités de cholestérol sous forme de gouttelettes cytoplasmiques. Le rôle protecteur de LRP1 contre l'accumulation de cholestérol dans les CMLv a déjà été établi (Boucher et al., 2003; Zhou et al., 2009b) et ce travail de thèse repose sur l'hypothèse selon laquelle cet effet protecteur de LRP1 passe par l'activation d'une voie de signalisation Wnt5a.

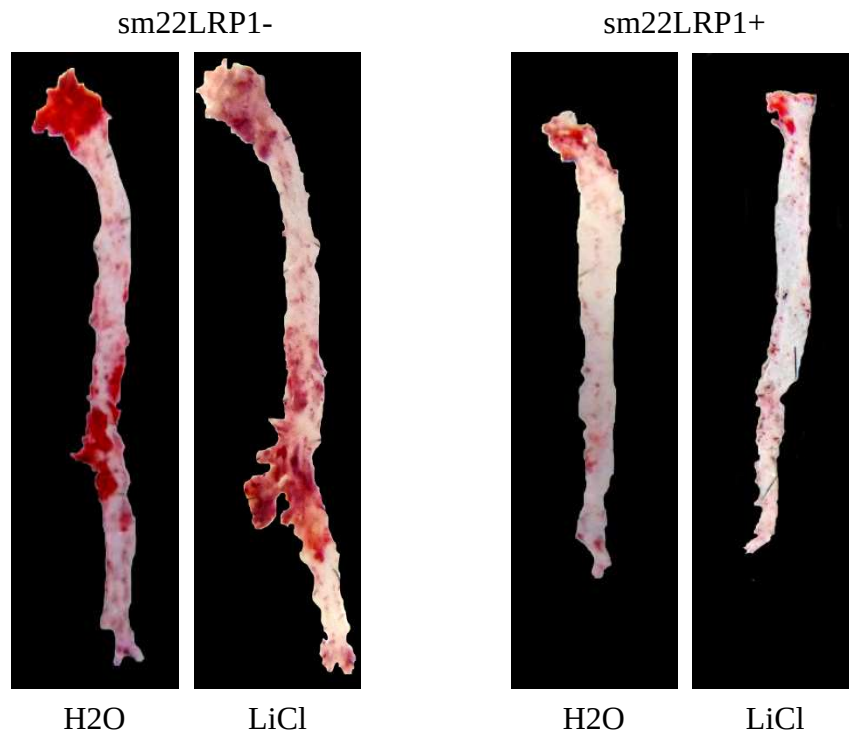
En partie I, nous avons décrit *in vitro* et dans le tissu adipeux des souris transgéniques aTgWnt5a une voie de signalisation TGF β /LRP1/Wnt5a qui met en place des mécanismes visant à faire baisser le taux de cholestérol intracellulaire : l'activation de l'efflux et l'inhibition de la synthèse. Pour déterminer si cette voie de signalisation pouvait limiter le développement de l'athérosclérose en inhibant la formation des cellules spumeuses et ainsi démontrer notre hypothèse, nous avons utilisé 3 stratégies : les 2 premières consistaient à activer pharmacologiquement la voie de signalisation Wnt dans les souris invalidées pour LRP1 dans les CMLv (sm22LRP1-) et leurs contrôles sm22LRP1+ ; la dernière stratégie consistait à invalider Wnt5a spécifiquement dans les CML de souris LDLR-/- (souris sm22Wnt5a- et leurs contrôles sm22Wnt5a+).

I. Traitement des sm22LRP1- avec du LiCl

Les souris sm22LRP1- développent rapidement des lésions athéromateuses lorsqu'elles sont soumises à régime Paigen et les artères de ces animaux expriment très peu de Wnt5a (Boucher et al., 2003; Woldt et al., 2012). Les MEF LRP1-/- expriment également très faiblement Wnt5a et accumulent du cholestérol après différenciation adipogénique. La perte d'expression de Wnt5a dans ces cellules se traduit notamment par une diminution de la quantité de β -caténine nucléaire, ce qui confirme que la signalisation Wnt est altérée dans les MEF LRP1-/- par rapport aux MEF LRP1+/+ (Terrand et al., 2009).

Le chlorure de lithium (LiCl) est un inhibiteur de la GSK3 β , l'enzyme qui phosphoryle et permet la dégradation de la β -caténine (Cohen and Goedert, 2004). Il agit donc comme un

A.



B.

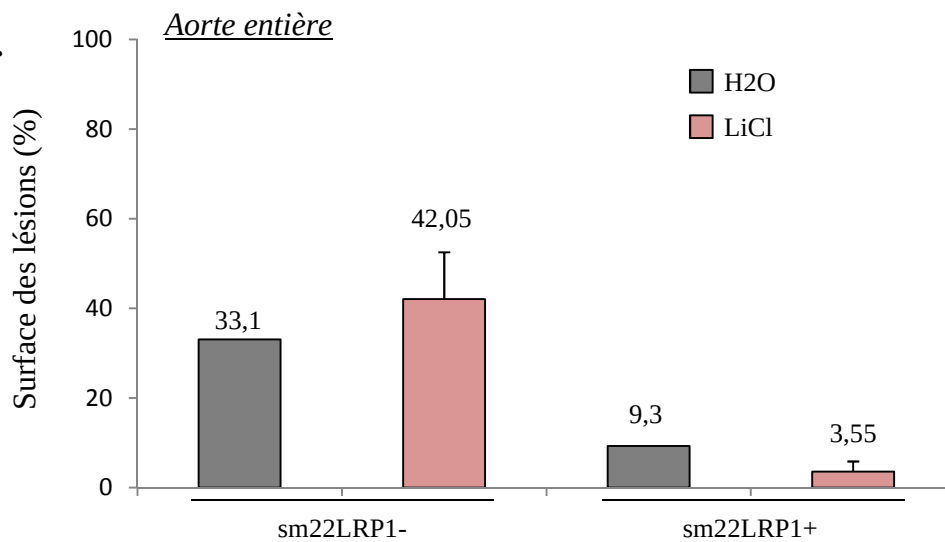


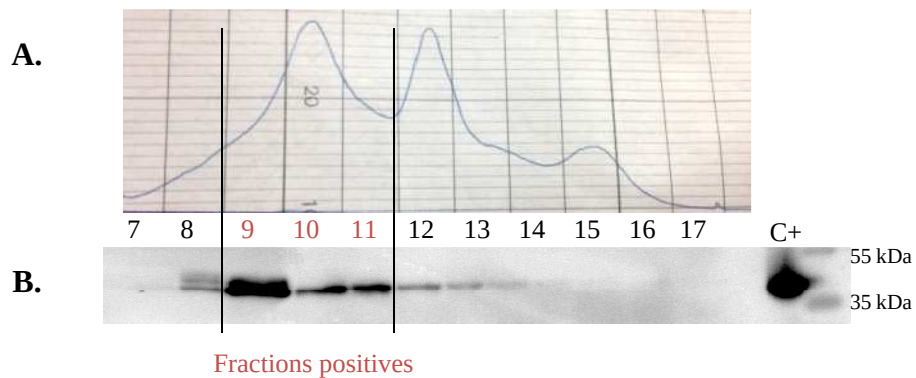
Figure 65 : Le traitement des souris *sm22LRP1-* par le chlorure de lithium n'atténue pas l'étendue des lésions athéromateuses. A. Coupes en face colorées au Sudan IV des aortes des souris *sm22LRP1-* et *sm22LRP1+* nourries 2 mois avec un régime Paigen et recevant 10mg/kg/jour de chlorure de lithium (LiCl) dilué dans l'eau de boisson. **B.** Quantification des aires des lésions avec le logiciel ImageJ (n = 4).

activateur de la signalisation Wnt/ β -caténine en permettant la stabilisation de la β -caténine et sa translocation dans le noyau. Notre équipe a montré que l'ajout de LiCl au milieu de culture des MEF LRP1^{-/-} en différenciation adipocytaire permet de limiter l'accumulation de cholestérol (Terrand et al., 2009). Par ailleurs, le LiCl diminue la formation de lésions athéromateuses chez les souris ApoE^{-/-} sous régime Paigen (Choi et al., 2010). Pour observer si le LiCl pouvait limiter l'accumulation de cholestérol *in vivo* et diminuer la formation de lésions athéromateuses chez les souris sm22LRP1⁻, nous avons reproduit le protocole décrit par Choi et son équipe : nous avons ajouté du LiCl dans l'eau de boisson des souris sm22LRP1⁻ et sm22LRP1⁺ (4 souris par groupe), de façon à apporter 10 mg/kg/jour de LiCl à chaque animal. Un groupe contrôle composé de 2 souris de chaque génotype a reçu de l'eau sans LiCl. Le traitement a débuté simultanément au régime Paigen de 2 mois. Après dissection, les coupes en face des aortes ont été colorées au Sudan IV pour colorer les lipides neutres et révéler les lésions athéromateuses. Le pourcentage de surface de l'aorte lésée a été quantifié grâce à un logiciel de traitement d'image.

Après quantification, nous n'avons pas observé de différence significative en termes d'étendue des lésions athéromateuses entre les souris sm22LRP1⁻ traitées par le LiCl et les non traitées (figure 65). Les lésions présentent chez les souris contrôles sm22LRP1⁺ étaient peu nombreuses et leur étendue était similaire entre les souris traitées avec le LiCl et les non traitées. Il semble que dans ces conditions expérimentales, le LiCl ne soit pas efficace pour diminuer le développement de l'athérosclérose chez les souris sm22LRP1⁻. Avant de conclure de façon définitive, nous devons répéter l'expérience en augmentant l'effectif ainsi que la concentration de LiCl et/ou la durée du traitement. Dans l'étude de référence, le traitement des souris ApoE^{-/-} dure jusqu'à 14 semaines (Choi et al., 2010). De plus, nos souris de fond génétique LDLR^{-/-}, présentent un taux basal de LDL moins élevé que les souris ApoE^{-/-} de l'étude. Ces dernières sont donc a priori plus susceptibles de développer des lésions que les sm22LRP1⁻, ce qui pourrait expliquer qu'en reproduisant le protocole exact de Choi et son équipe, nous n'observons pas de différences sur les lésions.

II. Injection de Wnt5a purifiée chez les souris sm22LRP1⁻

Wnt5a est faiblement exprimé dans les aortes des souris sm22LRP1⁻ (Woldt et al., 2012) qui développent plus de lésions que les souris sm22LRP1⁺. Puisque nous avons observé *in vitro* que Wnt5a protège de l'accumulation de cholestérol (Terrand et al., 2009), nous pensons qu'augmenter la quantité de Wnt5a dans la paroi artérielle chez les souris



- C.** Coefficient d'absorption à 280nm de Wnt5a :
 $\Sigma 280\text{nm} : 48370 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
- Densité optique de la solution des fractions positives mesurée à 280nm :
 $\text{DO}_{280} : 0,020$
- Concentration en Wnt5a :
 $0,020/48370 = 4,13.10^{-7} \text{ M}$
- Masse moléculaire de la Wnt5a active (sans peptide signal) : 35,6 kDa
 $35600 \times 4,13.10^{-7} = 0.0147 \text{ g/L} = 0.0147 \text{ mg/ml} = 14,7\mu\text{g/ml}$
- 3 ml de solution, donc la quantité est :
 $14,7 \times 3 = 44,1\mu\text{g}$
- 20% de glycosylation sur la séquence :
 $44,1 + 20\% = 53\mu\text{g}$
- Concentration finale : $53/3\text{ml} : 17,6\mu\text{g/ml}$

Figure 66 : Évaluation de la concentration de la protéine Wnt5a recombinante purifiée. **A.** Chromatogramme de la chromatographie échangeuse d'ions. Le pic encadré correspond à la protéine Wnt5a. **B.** Western blot des fractions montrant que les fractions 9, 10 et 11 sont les plus concentrées en rWnt5a. Les pics correspondant aux fractions 12 à 17 montrent qu'elles contiennent des protéines autres que la Wnt5a recombinante. **C.** Méthode utilisée pour estimer la concentration de rWnt5a (données fournies par Protparam tool, ExPASy). C+ : lysat de LMTK Wnt5a+.

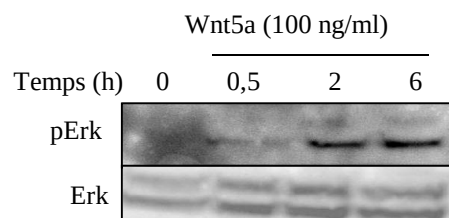


Figure 67 : La protéine Wnt5a recombinante purifiée active la signalisation Erk *in vitro*. Analyse par western blot de la quantité de protéine Erk phosphorylée par rapport à la quantité de Erk totale après traitement des MEF LRP1+/+ par 100 ng/ml de rWnt5a purifiée pendant les temps indiqués.

sm22LRP1- permettrait de limiter l'accumulation de cholestérol et donc le développement des lésions.

L'injection intrapéritonéale d'une autre protéine de la famille Wnt, Wnt3a recombinante a été réalisée chez des souris mutées pour LRP6, un co-récepteur de Fzd impliqué dans la signalisation Wnt. Ces animaux présentent notamment une hyperlipidémie et une stéatose hépatique et les auteurs montrent que l'injection de Wnt3a recombinante permet de diminuer la fraction de SREBP2 nucléaire et d'inhiber l'accumulation de cholestérol dans les hépatocytes (Go et al., 2014). Pour tester si Wnt5a pouvait, de la même manière que Wnt3a, limiter l'accumulation de cholestérol dans les cellules de la paroi artérielle et protéger les souris sm22LRP1- contre l'athérosclérose, nous avons injecté la protéine Wnt5a recombinante purifiée à ces souris et observé l'étendue des lésions athéromateuses.

II.1 Contrôle de l'activité de la Wnt5a purifiée

Nous avons purifiée la protéine Wnt5a recombinante (rWnt5a) par chromatographie à partir de milieu conditionné de LMTK Wnt5a+ (*cf* Matériel et Méthode) (Mikels and Nusse, 2006b; Willert et al., 2003) et évalué sa quantité à 53µg dans notre solution de 3ml, soit une concentration de 17,6µg/ml, à partir de la valeur de la DO à 280nm de la solution et du coefficient d'absorption molaire de Wnt5a (figure 66).

Avant d'injecter la protéine rWnt5a aux souris, nous avons vérifié *in vitro* si elle était toujours active après le processus de purification. Un des intermédiaires de la signalisation non canonique Wnt5a est la protéine Erk1/2 (Masckauchán et al., 2006; Su Jung et al., 2013) et nous avons vérifié par western blot que la rWnt5a était en mesure d'activer la phosphorylation de cette protéine. Nous avons traité des MEF LRP1+/+ par 100ng/ml de rWnt5a et nous avons pu observer la présence de Erk1/2 phosphorylée après 2h et 6h de traitement (figure 67). Ce résultat montre que la protéine rWnt5a est efficace pour activer sa signalisation non canonique, ce qui suggère que son activité est préservée.

II.2 Injection de Wnt5a purifiée chez les souris sm22LRP1-

Les souris sm22LRP1- expriment très peu de Wnt5a au niveau aortique (Woldt et al., 2012). Notre hypothèse est que des injections de rWnt5a purifiée chez ces souris pourraient atténuer le développement des lésions en inhibant l'accumulation de cholestérol au niveau de la paroi artérielle. Nous avons choisi d'injecter chez les souris sm22LRP1- et les contrôles sm22LRP1+ une dose de 25 µg/kg de rWnt5a, la même dose que celle de rWnt3a injectée

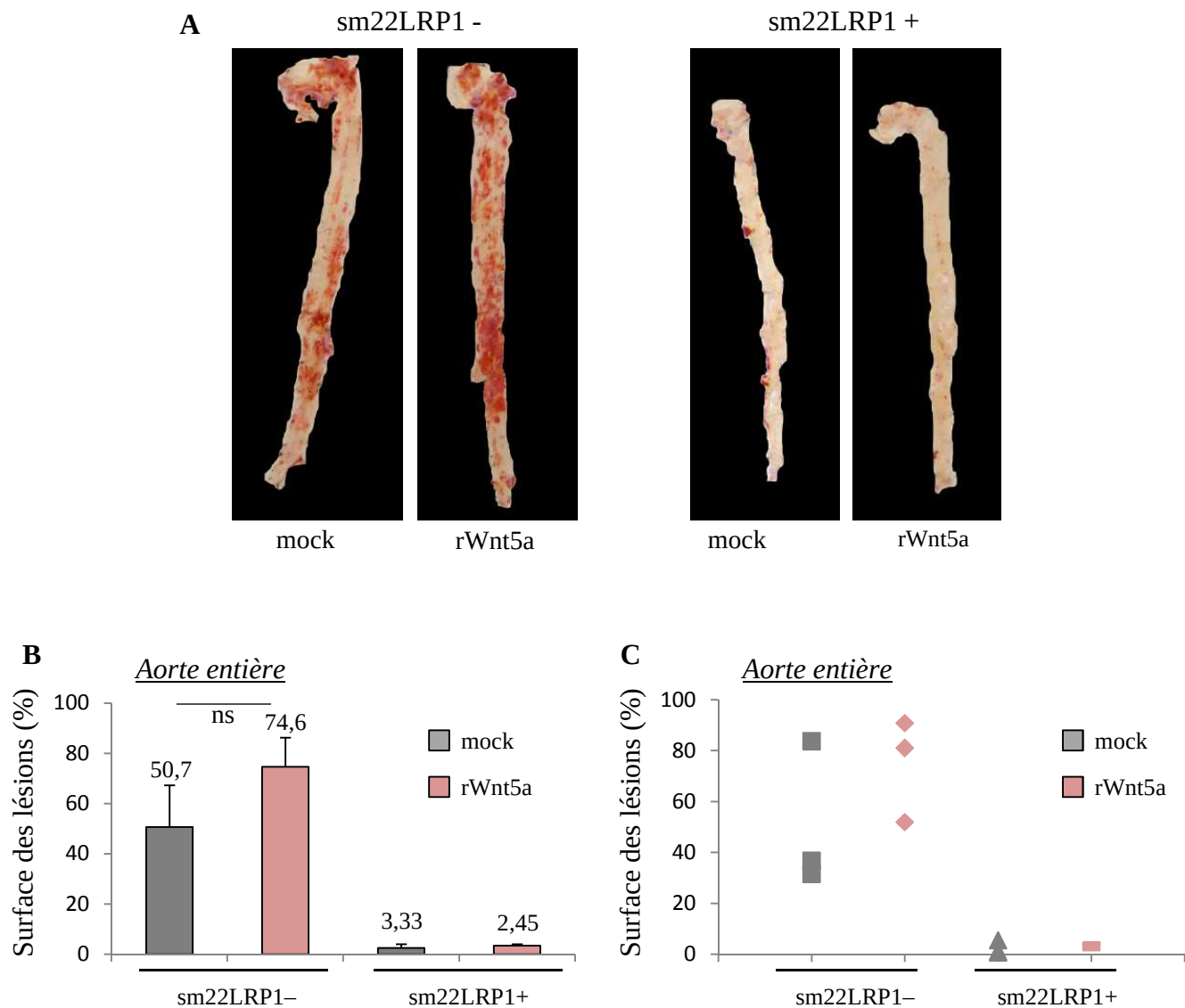


Figure 68 : L'injection de protéine Wnt5a recombinante purifiée ne diminue pas l'étendue des lésions athéromateuses chez les souris sm22LRP1 - . **A.** Coupes en face des aortes de souris sm22LRP1- et sm22LRP1+ traitées ou non par des injections intra-péritonéales de 25 µg/kg de Wnt5a recombinante (rWnt5a) après 2 mois de régime Paigen. Les lésions sont colorées au Sudan IV. **B.** Quantification avec ImageJ de la surface des aortes touchées par des lésions (n = 3). **C.** Valeurs de la surface des lésions pour chaque souris.

chez les souris dans l'étude de Go et son équipe (Go et al., 2014). Le groupe contrôle a reçu des injections d'un volume équivalent de solution contrôle (mock) stérile (3 souris par groupe). Tous les animaux ont été soumis à un régime Paigen de 2 mois et les injections ont été réalisées tous les 2 jours pendant la durée du régime. Excepté la durée du traitement, ce protocole est identique à celui utilisé pour les injections de Wnt3a recombinante (Go et al., 2014). Les souris ont ensuite été disséquées et les aortes prélevées pour réaliser des coupes en face puis colorées au Sudan IV pour marquer les lipides neutres (figure 68.A).

La quantification de la surface des lésions athéromateuses révèle qu'il n'y a pas d'effet significatif du traitement par rWnt5a sur les groupes de souris (figure 68.B). On observe par ailleurs une grande variabilité intragroupe que le petit nombre de souris ne peut atténuer. Chez l'une des souris sm22LRP1- traitée par la solution contrôle, 83,7% de sa surface aortique présente des lésions quand les aortes des 2 autres souris de ce groupe en présentent 30-35% (figure 68.C). La différence entre les souris sm22LRP1- traitées avec rWnt5a par rapport aux contrôles traitées avec la solution mock n'est donc pas significative. Il apparaît que l'injection de rWnt5a purifiée n'inhibe pas le développement de l'athérosclérose chez les souris sm22LRP1- dans les conditions expérimentales choisies.

Une hypothèse pour expliquer cette absence d'effet est que la rWnt5a a perdu une partie de son activité soit au cours de la purification soit durant le temps de l'expérience. Pour tester cette hypothèse, il a été vérifié a posteriori au laboratoire si la protéine rWnt5a était toujours active et pouvait assurer son effet inhibiteur sur l'accumulation de lipides *in vitro*. Des MEF LRP1-/- ont été traitées avec le cocktail de différenciation adipogénique auquel était additionné la protéine rWnt5a à une concentration finale de 100 ng/ml ou du sérum physiologique. Après 7 jours de traitement, les cellules ont été colorées à l'huile rouge pour marquer les lipides neutres tels que les esters de cholestérol. La coloration était identique dans les cellules différenciées traitées avec rWnt5a et dans les cellules traitées avec le sérum physiologique, indiquant que la protéine purifiée n'a pas inhibé l'accumulation de cholestérol et n'était donc plus active. Nous n'avons pas pu réitérer l'expérience en augmentant la concentration de rWnt5a car nous étions limités en quantité de protéine purifiée. Ainsi, même si la rWnt5a est efficace pour activer la signalisation Erk, on peut supposer qu'une partie de son activité ait été altérée et qu'elle ne peut stimuler la voie canonique qui limite l'accumulation de cholestérol. Cette altération de l'activité de la rWnt5a explique que les injections n'aient pas eu l'effet inhibiteur attendu sur le développement de l'athérosclérose.

Wnt5a est connue pour être une protéine fragile et peu soluble (Willert et al., 2003), ce qui rend sa purification plus difficile. De plus, elle présente des modifications post-

traductionnelles de type glycosylation et palmitoylation indispensables à son activité (Kurayoshi et al., 2007) qui peuvent être altérées lors de la purification. Notre protocole de purification, bien qu'efficace pour obtenir la protéine, nécessite d'être optimisé pour garantir l'intégrité de la protéine. Nous devons également améliorer la méthode de conservation de la protéine pour maintenir son activité tout au long de l'expérimentation.

Ces deux premières approches dans lesquelles nous avons tenté d'activer la signalisation Wnt5a dans les souris sm22LRP1- ne permettent pas de conclure quant au rôle de cette signalisation dans la prévention des lésions d'athérosclérose. De nombreuses mises au point sont nécessaires pour améliorer les conditions expérimentales, notamment dans l'utilisation de rWnt5a purifiée.

III. Invalidation de Wnt5a dans les CMLv des souris LDLR-/-

Les souris LDLR-/- invalidées pour LRP1 dans les CMLv (sm22LRP1-) développent plus de lésions athéromateuses que leur contrôle sm22LRP1+ et expriment peu de Wnt5a au niveau des artères (Boucher et al., 2003; Woldt et al., 2012). LRP1 a donc un rôle protecteur contre l'athérosclérose chez ces souris. Par ailleurs, nous avons montré *in vitro* que Wnt5a limite l'accumulation intracellulaire de cholestérol en activant son efflux et en inhibant sa synthèse endogène. Notre hypothèse est que Wnt5a participe à l'effet athéroprotecteur de LRP1 dans les CMLv, et pour le démontrer, nous avons utilisé des souris LDLR-/- invalidées pour Wnt5a dans les CMLv qui avaient été générées au laboratoire. Si notre hypothèse se confirme, ces souris sm22Wnt5a- devraient présenter un phénotype similaire à celui des sm22LRP1- et développer plus de lésions que les contrôles sm22Wnt5a+.

Lors de l'établissement de la lignée de souris sm22Wnt5a- (Cre+) (*cf* Matériel et Méthode), il a été observé que le nombre de souris de ce génotype était largement inférieur au nombre de souris du génotype contrôle sm22Wnt5a+ (Cre-). Nous avons dans un premier temps cherché à déterminer les origines de cette disparité dans le nombre d'animaux, et dans un second nous avons analysé l'effet de l'invalidation de Wnt5a sur les lésions athéromateuses chez les souris survivantes.

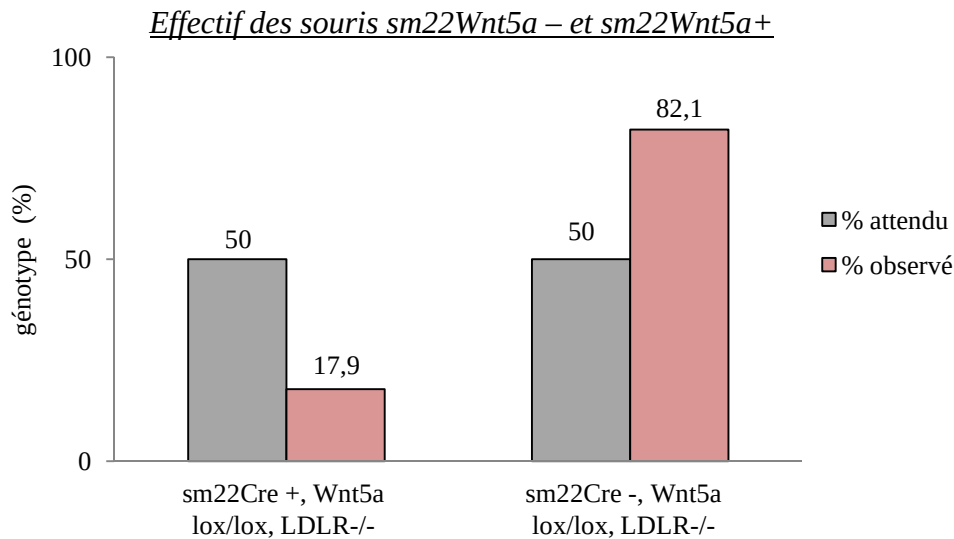


Figure 69 : L'inactivation de Wnt5a dans les CMLv entraîne une augmentation de la létalité chez les souris. Répartition non mendélienne des nouveaux nés sm22Wnt5a- et sm22Wnt5a+ issus de parents homozygotes pour Wnt5a floxé (Wnt5a lox/lox) et invalidées pour le LDLR. Nombre total de souris: 291.

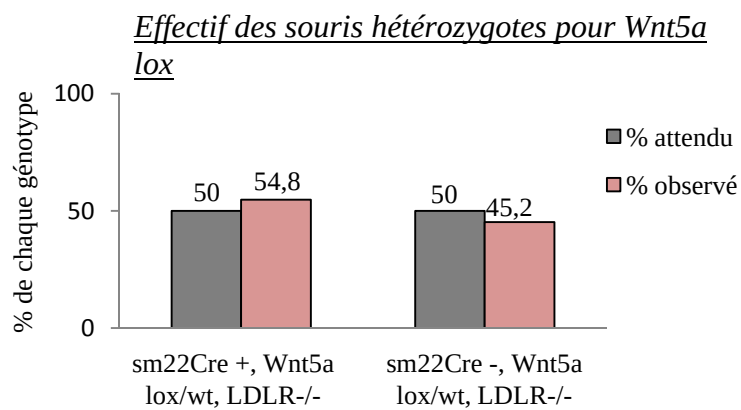


Figure 70 : L'expression de la Cre n'impacte pas la viabilité des souris. Répartition des nouveaux nés hétérozygotes pour Wnt5a floxé tous LDLR-/- . Nombre total de souris: 310.

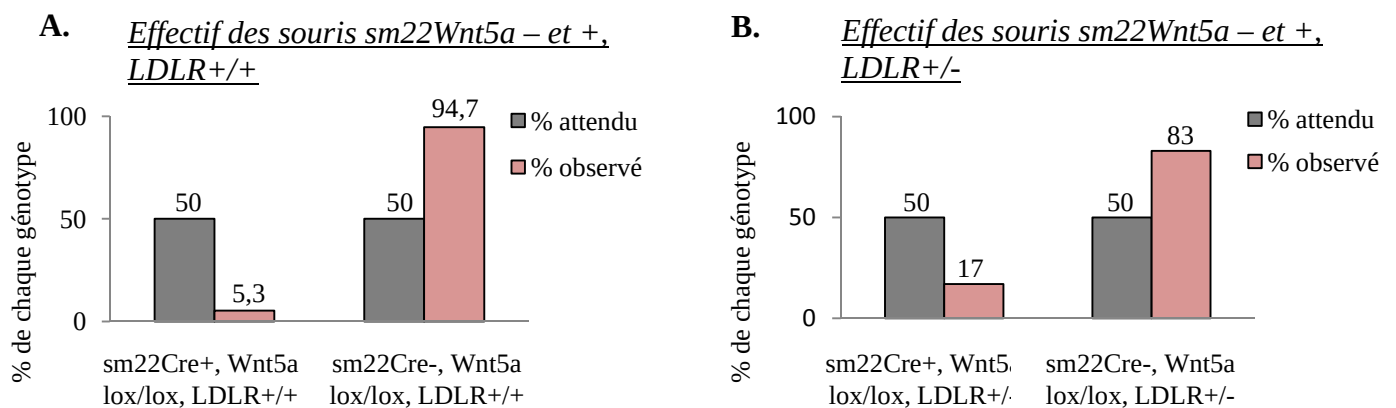


Figure 71 : Le fond génétique LDLR n'a pas d'impact sur la viabilité des souris. Répartition des nouveaux nés issus de mâles sm22Wnt5a-/- et de femelles sm22Wnt5a lox/lox ayant une fond génétique LDLR+/+ (A) ou LDLR+/- (B) . Nombre total de souris: 19 (A) et 47 (B).

III.1 L'invalidation de Wnt5a affecte la viabilité des souris

III.1.1 Répartition non mendélienne des souris sm22Wnt5a-

D'après les lois sur l'hérédité établies par Mendel, quel que soit le gène portant les sites loxP, le croisement d'une souris Cre + avec une souris Cre - devrait théoriquement donner naissance à 50% d'individus Cre + et 50% d'individus Cre -. Nous nous attendons donc à obtenir 50% de souris sm22Wnt5a- (Cre+) et 50% de souris sm22Wnt5a+ (Cre-), toutes LDLR-/-. Au cours de l'établissement de la lignée, il a rapidement été observé que la répartition mendélienne n'était pas respectée. Le génotypage des nouveau-nés est effectué entre 3 et 7 jours après la naissance, et à ce stade nous observons une répartition de 17,87% de souris Cre+ pour 82,13% de Cre-, sur un total de 291 souris (figure 69). L'invalidation de Wnt5a dans les CMLv entraîne donc une hausse de la mortalité chez les souris.

Pour confirmer que c'est bien cette invalidation qui est à l'origine de la mortalité des souris et exclure la responsabilité de l'expression la recombinaison Cre, la répartition des nouveau-nés sm22Cre+ et sm22Cre- hétérozygotes pour Wnt5a floxé (Wnt5a lox/wt) a été analysée. Lorsque les animaux Wnt5a lox/wt sont croisés avec les animaux sm22Cre+, seul un allèle du gène Wnt5a est excisé chez les nouveau-nés et les CMLv expriment donc toujours une copie du gène. Entre les nouveau-nés sm22Cre+, Wnt5a lox/wt et sm22Cre-, Wnt5a lox/wt, la distribution respecte les lois mendéliennes (figure 70). Ces données signifient d'une part que l'expression de la recombinaison Cre dans ce contexte génétique n'entraîne pas la hausse de mortalité observée chez les souris homozygotes pour Wnt5a floxé, et d'autre part que l'invalidation d'un seul allèle du gène Wnt5a ne suffit pas à causer cette hausse de mortalité.

Enfin, la répartition des nouveau-nés en fonction de l'expression du LDLR a été mesurée afin de vérifier si l'invalidation de ce récepteur pouvait impacter la survie des animaux. Lorsque l'on observe la répartition des souris sm22Wnt5a- et sm22Wnt5a+ qui expriment le LDLR (LDLR+/+), on retrouve la diminution du nombre de nouveau-nés chez les sm22Wnt5a- (figure 71.A). C'est également le cas lorsque les souris sont hétérozygotes pour le LDLR (LDLR+/-) (figure 71.B). Ces données générées récemment au laboratoire signifient que l'augmentation de la mortalité chez les souris sm22Wnt5a- est indépendante de l'expression ou de l'invalidation du LDLR.

On peut conclure de ces observations que l'invalidation de Wnt5a spécifiquement dans les cellules musculaires lisses vasculaires est partiellement létale pour les souris.

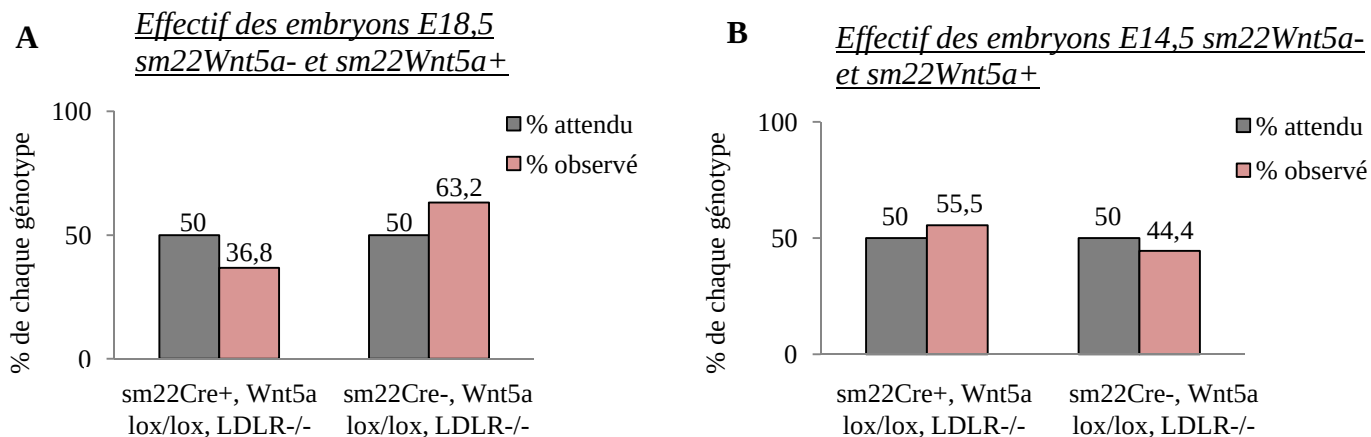


Figure 72 : L'invalidation de Wnt5a dans les CML n'entraîne pas de mort *in utero*. Répartition du nombre d'embryon de (A) 14,5 jours et (B) 18,5 jours issus de mâles sm22Wnt5a- et de femelles sm22Wnt5a lox tous LDLR-/. Nombre total d'embryons : 18 (A) et 19 (B).

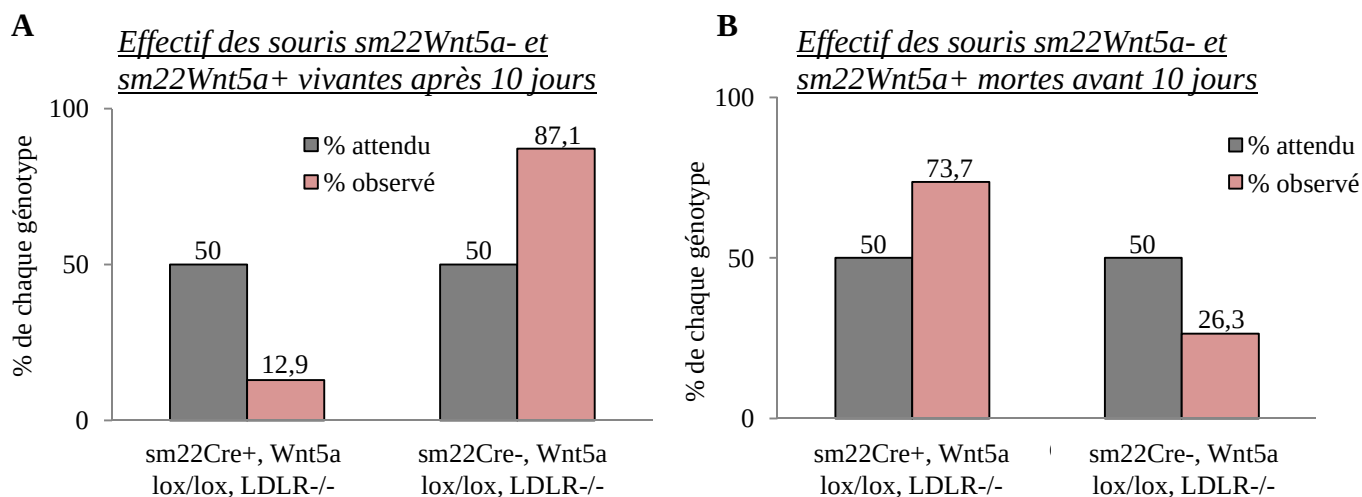


Figure 73 : L'invalidation de Wnt5a dans les CML provoque la mort peu de temps après la naissance. Répartition du nombre de nouveaux nés homozygotes pour Wnt5a floxé issus de parents sm22Wnt5a- et sm22Wnt5a lox/lox tous LDLR-/- (A) vivants 10 jours après la naissance ou (B) morts avant 10 jours. Nombre total de souris: 155 (A) et 19 (B).

III.1.2 Wnt5a n'affecte pas le développement embryonnaire

Wnt5a est impliqué dans les processus du développement embryonnaire tels que la migration et la prolifération des cellules et dans la mise en place de nombreuses structures comme le cerveau et la tête, les membres inférieurs et supérieurs, la queue... (Yamaguchi et al., 1999). Son invalidation totale est létale chez la souris, elle entraîne de nombreux défauts de morphologie (membres plus petits, face malformée, absence de queue) et les animaux meurent quelques heures après la naissance (Buttler et al., 2013; Schleiffarth et al., 2007; Yamaguchi et al., 1999). Le promoteur sm22 est exprimé dans les CMLv à 9,5 jours de développement embryonnaire (E9,5), dans le cœur entre E8,5 et E12,5 et dans les muscles squelettiques entre E9,5 et E12,5. A l'âge adulte, son expression n'est maintenue que dans les CML (Li et al., 1996a). Chez nos souris sm22Wnt5a-, l'invalidation spécifique de Wnt5a dans ces différents types cellulaires, à l'origine de la létalité des animaux, a donc lieu entre 8,5 et 12,5 jours de développement embryonnaire.

Pour déterminer si cette invalidation de Wnt5a pouvait entraîner un défaut de développement embryonnaire des souris et expliquer la diminution du nombre de nouveau-nés sm22Wnt5a-, nous avons disséqué des femelles gestantes à E14,5 et à E18,5 et mesuré la répartition entre les embryons Cre+ et les embryons Cre-. La figure 72 montre qu'aux stades embryonnaires E14,5 et E18,5 la répartition mendélienne est respectée entre les deux génotypes. La taille et la morphologie des embryons apparaissaient normales et aucun critère macroscopique ne permettait de différencier visuellement les embryons Cre+ des Cre-. Nous n'avons pas non plus noté la présence d'embryons résorbés, indicateurs d'un arrêt précoce du développement. Le nombre d'individus analysés est faible à ce stade de l'étude (19 embryons de chaque génotype), cependant il semble que l'invalidation de Wnt5a dans les CML, le cœur et les muscles squelettiques n'affecte pas le développement des structures embryonnaires des souris. Il semble donc que les femelles donnent naissance à 50% de nouveau-nés de chaque génotype et que la mort des animaux sm22Wnt5a- survienne peu de temps après la mise-bas.

III.1.3 La mort des souris est périnatale

Pour déterminer à quel moment survient la mort des animaux, nous avons choisi arbitrairement de mesurer la répartition des souris de chaque génotype à l'âge de 10 jours. On observe qu'à 10 jours, seul 12,9% de l'effectif de 155 souris est constitué de sm22Wnt5a- tandis que 87,1% sont des sm22Wnt5a+. La mort des nouveau-nés sm22Wnt5a- survient donc avant l'âge de 10 jours (figure 73.A).

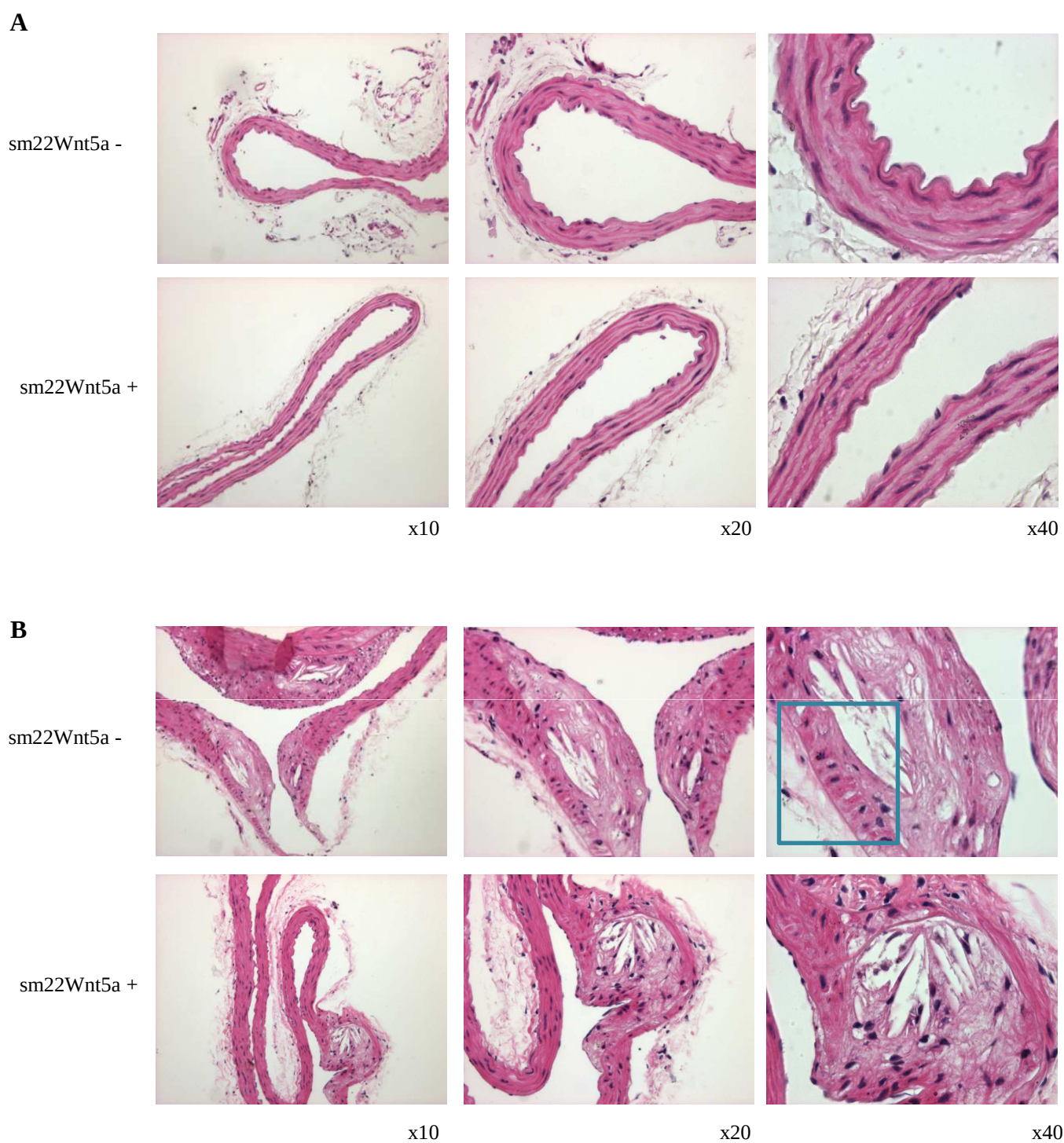


Figure 74 : Histologie des aortes des souris sm22Wnt5a + et sm22Wnt5a-. Coloration H&E de coupes d'aortes thoraciques de souris âgées de 15 mois nourries avec un régime standard **A.** Zone Saines **B.** Lésions athéromateuses.

Pour affiner ce laps de temps, les portées ont été surveillées dans les heures suivant la mise-bas, ce qui a permis de retrouver 19 nouveau-nés morts. L'analyse de leur génotype a montré que 73,7% de ces souris mortes sont sm22Wnt5a⁻ et seulement 26,3% sont des contrôles sm22Wnt5a⁺ (figure 73.B). Le nombre de souris est limité mais ces données suggèrent que la mort des animaux sm22Wnt5a⁻ a lieu très peu de temps après la naissance.

L'invalidation de Wnt5a spécifiquement dans les CMLv entraîne une augmentation de la mortalité chez les souris, ce qui signifie que Wnt5a a un rôle protecteur pour le système cardiovasculaire. Cette létalité a rendu difficile l'établissement d'une lignée, faute d'un nombre d'animaux suffisant pour permettre à la fois la reproduction pour l'expansion de la lignée et la constitution de groupes à mettre sous régime. D'autres expériences sont nécessaires pour déterminer les causes de cette mort périnatale et ainsi mieux comprendre le rôle protecteur de Wnt5a dans le système cardiovasculaire des souris.

III.2 Analyses des aortes des souris sous régime standard

Sur les souris survivantes, nous avons commencé par évaluer un éventuel effet de l'invalidation de Wnt5a sur la structure des vaisseaux et sur l'apparition des lésions dans l'aorte des souris recevant un régime standard. Une souris sm22Wnt5a⁻ et une contrôle ont été disséquées à l'âge de 15 mois et les coupes histologiques des aortes ont été colorées à l'hématoxyline/éosine.

Au niveau des parties saines des aortes, nous n'observons pas de différences de structure évidentes entre les deux lignées de souris. L'épaisseur de la média et l'adventice de chaque aorte sont identiques (figure 74 A) ce qui suggère que l'invalidation de Wnt5a dans les CMLv ne perturbe pas la structure des vaisseaux des souris.

Les deux souris ayant un fond génétique LDLR^{-/-}, à l'âge de 15 mois leurs aortes présentent des lésions athéromateuses. Dans les 2 aortes, on observe une augmentation du nombre de noyaux traduisant une prolifération des CMLv qui aboutit à un épaississement de la média. On remarque également au niveau du cœur des lésions, des cellules spumeuses et des espaces vides laissés par la dissolution des cristaux de cholestérol lors du processus de coloration (Grebe and Latz, 2013) (figure 74 B). Chez la souris sm22Wnt5a⁻, on remarque, au niveau de la média située sous les lésions, que les cellules musculaires lisses présentent une

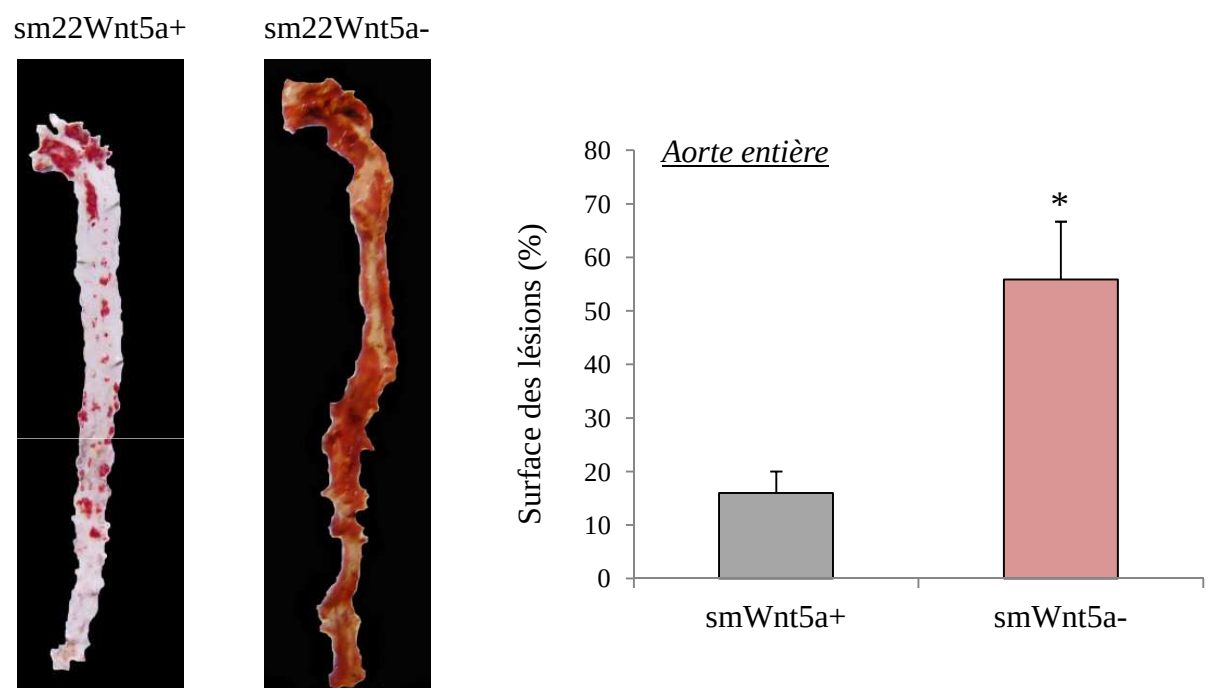


Figure 75 : L'invalidation de Wnt5a dans les CMLv augmente l'athérosclérose. Coloration au Sudan IV de coupes en face d'aortes de souris sm22Wnt5a- et sm22Wnt5a+ âgées de 2 mois et mises sous régime Paigen pendant 6 mois (n=3, p<0,05) .

morphologie cubique, différente de la morphologie fusiforme normale de ce type cellulaire (figure 74.B, encadré).

Chez ces deux souris sous régime standard, nous n'avons pas observé de différences de structure ou de morphologie des cellules entre les zones saines des aortes. La morphologie anormale des CMLv suggère que l'invalidation de Wnt5a altère leur phénotype lors du développement des lésions athéromateuses provoquées par le vieillissement.

III.3 Analyse des aortes des souris sous régime Paigen

Les souris sm22LRP1- développent plus de lésions d'athérosclérose que les souris témoins lorsqu'elles sont nourries avec un régime riche en cholestérol (Boucher et al., 2003). La présence de LRP1 prévient donc l'accumulation de cholestérol dans les cellules et l'hypothèse de cette thèse est que Wnt5a est impliquée dans cet effet protecteur.

Pour le vérifier, des souris sm22Wnt5a- ont été mise sous régime Paigen afin d'observer si les artères des animaux présentaient plus de lésions que les souris sm22Wnt5a+. Après 6 mois de régime, les souris ont été disséquées et les coupes en face de l'aorte ont été colorées au Sudan IV. Les aortes des souris sm22Wnt5a- présentent en moyenne 56% de lésions alors que les aortes des souris contrôle n'en présentent que 16% (figure 75). L'effectif des souris doit être étendu mais ce résultat laisse penser que Wnt5a protège contre la formation des lésions, ce qui conforte notre hypothèse et est très encourageant pour la suite des analyses.

Conclusion // Partie II

Nous avons montré dans la première partie de cette thèse que Wnt5a, activée par LRP1, prévient l'accumulation intracellulaire de cholestérol. L'objectif de cette deuxième partie était de vérifier si cet effet préventif de Wnt5a pouvait limiter le développement de l'athérosclérose chez la souris. Nous avons tenté d'activer la signalisation Wnt et d'injecter la protéine purifiée à des souris sm22LRP1⁻. Ces expériences n'ont pas permis de conclure et nécessitent des mises au point supplémentaires.

Nous avons également utilisé une lignée de souris sm22Wnt5a⁻ afin d'observer si l'absence de Wnt5a dans les CMLv de souris LDLR^{-/-} accentuait la maladie. Nous avons observé chez ces souris un phénotype de mort périnatale qui a ralenti l'avancement de cette partie du projet de thèse. Nous avons cependant observé que l'inactivation de Wnt5a dans les CMLv des souris LDLR^{-/-} semble accentuer le développement de l'athérosclérose. Nos observations préliminaires semblent aller dans le sens de l'hypothèse de départ, c'est-à-dire un effet protecteur de Wnt5a.

Discussion et Perspectives

Contexte bibliographique

L'athérosclérose est la 1^{ère} cause de mortalité et de morbidité dans les pays développés. Cette pathologie débute avec l'infiltration de LDL riches en cholestérol dans la paroi artérielle, préalablement fragilisée par des facteurs tels que l'âge, le tabagisme ou l'hypertension. L'inflammation qui en découle attire dans l'espace sous-endothélial des macrophages qui captent ces LDL jusqu'à devenir des macrophages spumeux. L'accumulation de ces cellules spumeuses déstructure la paroi artérielle et conduit à la formation d'un cœur lipidique, qui obstrue progressivement la lumière de l'artère. Les conséquences cliniques de l'athérosclérose se manifestent par de l'insuffisance cardiaque, des infarctus du myocarde ou des accidents vasculaires cérébraux. C'est une pathologie complexe et multifactorielle, cependant l'implication du LDL-cholestérol dans son initiation et son développement est clairement établie.

Une étude a montré que le récepteur LRP1, un membre de la famille du LDLR, joue un rôle protecteur contre l'athérosclérose puisque son invalidation dans les CMLv conduit à une augmentation des lésions athéromateuses chez les souris LDLR^{-/-} (Boucher et al., 2003). Ce phénotype est du d'une part à la perte de contrôle de voies de signalisation TGF β et PDGF β impliquées dans la prolifération et la migration des CMLv de la paroi artérielle, et d'autre part à une accumulation de cholestérol dans ces cellules. Cette dernière observation suggérait que LRP1 était impliqué dans la régulation du métabolisme du cholestérol mais les mécanismes moléculaires de cette régulation restaient à identifier. Notre équipe a alors utilisé un modèle *in vitro* de MEF invalidée pour LRP1 et nous avons pu identifier la protéine sécrétée Wnt5a comme étant un intermédiaire de LRP1 dans son effet protecteur contre l'accumulation intracellulaire de cholestérol (Terrand et al., 2009). En effet, les MEF LRP1^{-/-} n'expriment plus Wnt5a et la réexpression de cette protéine prévient l'accumulation intracellulaire de cholestérol.

A partir de ces données, le but du projet de thèse consistait à identifier les mécanismes moléculaires mis en place par la signalisation LRP1/Wnt5a pour limiter l'accumulation intracellulaire de cholestérol.

Résumé des résultats obtenus

Nous avons utilisé plusieurs modèles cellulaires et animaux permettant d'observer l'effet de Wnt5a sur les paramètres que sont la synthèse endogène, l'import et l'efflux du cholestérol.

L'utilisation des lignées de MEF LRP1+/+, LRP1-/-, LRP1-/- ; Wnt5a et LRP1-/- ; mock et des lignées de LMTK Wnt5a+ et WT, a permis de montrer que l'expression de Wnt5a est stimulée par le TGFβ1 via le domaine extracellulaire de LRP1, et que Wnt5a diminue la quantité de cholestérol intracellulaire 1) en stimulant l'expression de ABCG1, ce qui s'accompagne d'une stimulation de l'efflux de cholestérol ; 2) en inhibant l'expression de l'HMGCoA-Reductase, enzyme clé de la synthèse endogène du cholestérol.

Nous avons ensuite confirmé ces résultats chez des souris transgéniques qui surexpriment Wnt5a dans le tissu adipeux. On retrouve dans le tissu adipeux blanc des souris transgéniques une augmentation de l'expression de ABCG1, une diminution de l'expression de l'HMGCoA-Reductase et de l'HMGCoA-Synthase ainsi qu'une baisse de la quantité totale de cholestérol par rapport aux tissu adipeux des souris sauvages.

La deuxième partie du projet consistait à observer si les effets inhibiteurs de Wnt5a sur l'accumulation de cholestérol pouvaient se traduire au niveau artériel par une diminution de l'étendue des lésions athéromateuses. Nous avons pour cela tenté d'activer la signalisation Wnt chez des souris invalidées pour LRP1 dans les CMLv, qui expriment peu de Wnt5a au niveau des parois vasculaires. Ces expériences de traitement par du chlorure de lithium et par injection de Wnt5a recombinante purifiée n'ont pas permis d'obtenir des résultats concluants. Nous avons également utilisé un modèle de souris invalidée pour Wnt5a dans les CMLv afin d'observer si l'absence de Wnt5a augmente l'étendue des lésions athéromateuses provoquées par un régime Paigen. Ces souris présentent une mortalité périnatale importante, qui ouvre de nouvelles perspectives quant au rôle de Wnt5a dans le développement du système cardiovasculaire et qui a ralenti la progression de notre étude. Les données préliminaires semblent cependant conforter notre hypothèse d'un effet protecteur de Wnt5a dans le développement de l'athérosclérose.

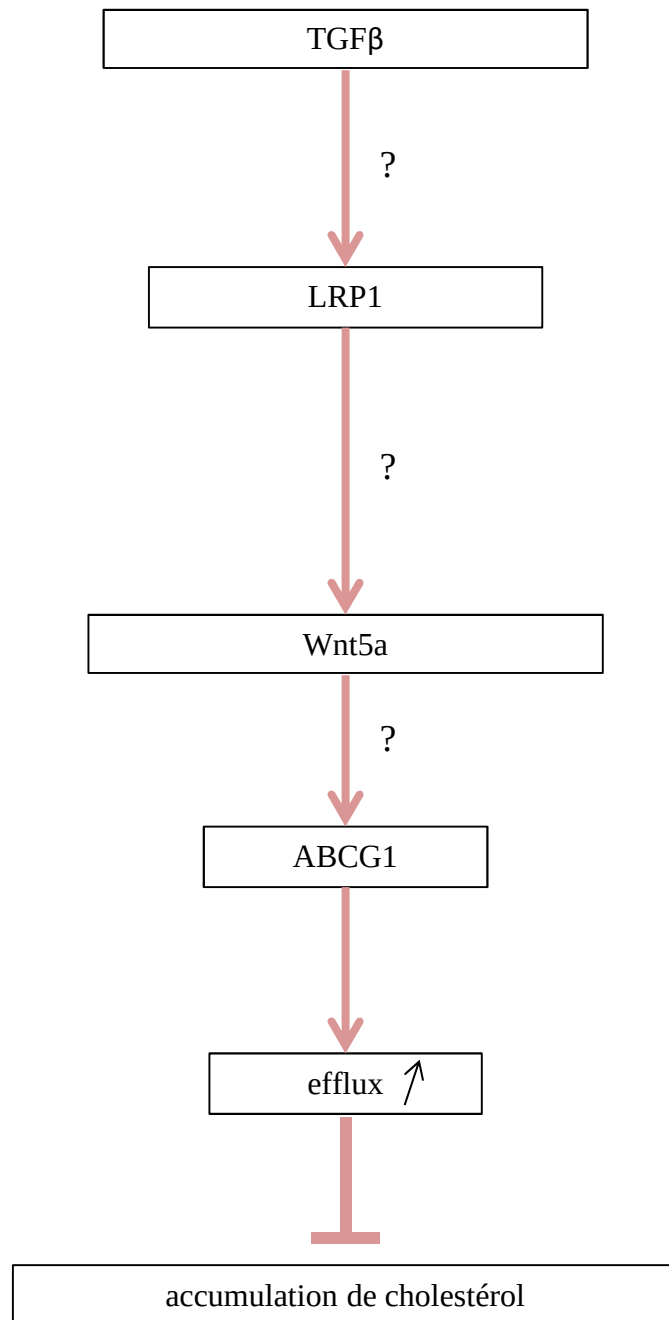


Figure 76 : Représentation schématique de la voie de signalisation TGFβ/LRP1/Wnt5a qui stimule l'efflux de cholestérol via l'induction de l'expression de ABCG1. Le TGFβ stimule l'expression de Wnt5a via son interaction avec LRP1. Wnt5a augmente l'expression de ABCG1 ce qui entraîne une stimulation de l'efflux et prévient l'accumulation de cholestérol. Les mécanismes d'action du TGFβ1 sur LRP1 et les mécanismes par lesquels Wnt5a active l'expression de ABCG1 restent à identifier.

Discussion des résultats, perspectives à court terme

Les résultats présentés dans ce manuscrit apportent de nouveaux éléments sur les rôles de LRP1 et de Wnt5a dans le métabolisme du cholestérol. Ils soulèvent également un certain nombre d'interrogations pour lesquelles nous proposons ici des hypothèses, ainsi que des méthodes expérimentales permettant de confirmer ces hypothèses.

I. La signalisation TGFβ1/LRP1/Wnt5a et l'efflux de cholestérol

Une voie de signalisation TGFβ1/LRP1/Wnt5a qui active l'efflux de cholestérol ?

Nous avons montré dans les MEF que le TGFβ1 stimule le domaine extracellulaire de LRP1 et induit l'expression de Wnt5a. Cette induction de Wnt5a par le TGFβ avait été observé dans des CML des voies aériennes (Kumawat et al., 2013), ainsi que dans plusieurs autres types cellulaires (Kato, 2009; Miyoshi et al., 2012; Roarty and Serra, 2007).

Il a par ailleurs été montré que le traitement de macrophages en culture par du TGFβ1 stimule l'efflux de cholestérol en induisant l'expression de ABCA1 et ABCG1 (Argmann et al., 2001; Panousis et al., 2001). Ces effets, associés à une diminution de l'import de cholestérol, conduisent à une diminution de la formation des cellules spumeuses. Dans ce projet, nous avons montré que Wnt5a stimule l'expression de ABCG1 *in vitro* et *in vivo*, ce qui s'accompagne d'une augmentation de l'efflux *in vitro*. Il se dessine alors l'hypothèse d'une voie de signalisation TGFβ1/Wnt5a qui active l'efflux de cholestérol via ABCG1.

Nous savons par ailleurs que 1) LRP1 est nécessaire au contrôle de la signalisation TGFβ (Boucher et al., 2007), 2) LRP1 est nécessaire à l'expression de Wnt5a dans les MEF (Terrand et al., 2009) et les CML des aortes (Woldt et al., 2012) 3) LRP1 contrôle positivement l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1 (Zhou et al., 2009b). LRP1 apparaît donc comme le récepteur par l'intermédiaire duquel TGFβ1 active la signalisation Wnt5a qui stimule l'expression de ABCG1.

L'ensemble de ces données suggèrent l'existence d'une voie de signalisation cellulaire TGFβ/LRP1/Wnt5a qui stimule l'efflux de cholestérol en augmentant l'expression du transporteur ABCG1 (figure 76).

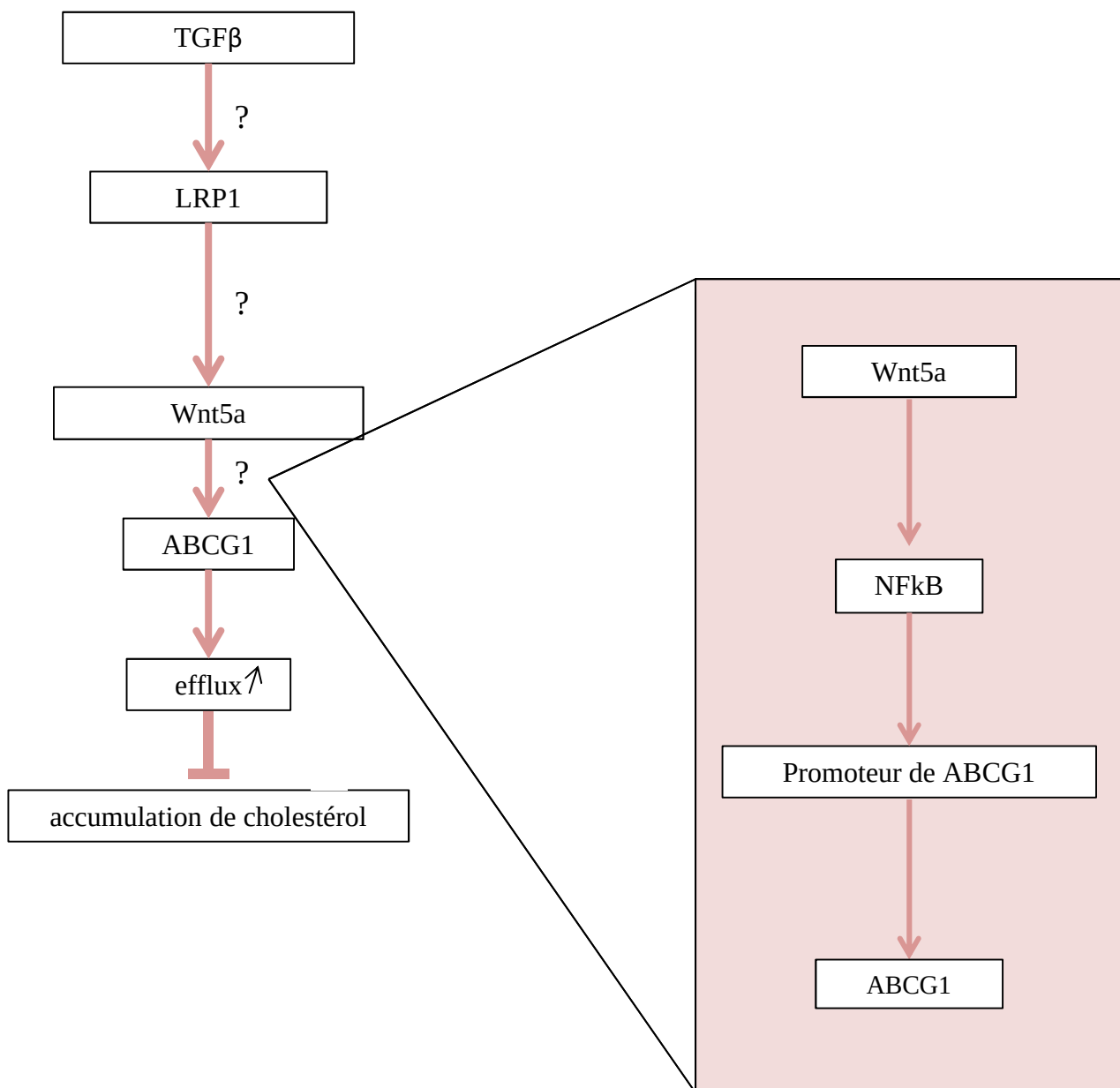


Figure 77 : Hypothèse de mécanisme d'activation de l'expression de ABCG1 par Wnt5a. Wnt5a active une voie de signalisation qui aboutit à l'activation nucléaire de NFκB, qui se fixe au promoteur de ABCG1 et induit sa transcription.

Par quel(s) mécanisme(s) Wnt5a active-t-elle l'expression de ABCG1 ?

Nous avons montré que la transfection de Wnt5a dans les MEF LRP1^{-/-} et sa surexpression dans les LMTK et le tissu adipeux des souris augmentent l'expression de ABCG1.

a) un mécanisme indépendant des LXR ?

Les données dont nous disposons semblent indiquer que l'augmentation de l'expression de ABCG1 induite par Wnt5a *in vitro* et *in vivo* n'implique pas ses facteurs de transcription les LXR. En effet, ni l'expression de ces facteurs ni celles de leurs autres gènes cibles SREBP1c et ApoE ne sont augmentées (figure 35).

Si de nombreuses études montrent que l'activation des LXR par des agonistes synthétiques stimule l'expression de ABCG1 et l'efflux de cholestérol (Neufeld et al., 2014; Vaughan and Oram, 2005; Wang et al., 2006), d'autres études confortent nos observations en montrant que l'induction de l'efflux de cholestérol par ABCG1 peut être observable sans activation des LXR, notamment suite à la transfection d'un plasmide codant pour ABCG1 (Nakamura et al., 2004b; Wang et al., 2004; Xie et al., 2006). Ainsi, une augmentation de l'expression de ABCG1 qui ne résulte pas de l'activation des LXR peut conduire à une activation de l'efflux de cholestérol vers les accepteurs lipoprotéiques.

Nos résultats sont par ailleurs cohérents avec le mécanisme d'activation des récepteurs LXR. En effet, les LXR sont activés par la fixation de leur ligand les oxystérols, qui s'accumulent au fur et à mesure que la quantité intracellulaire de cholestérol augmente (Wong et al., 2007). Or, dans notre modèle de MEF LRP1^{-/-} retransfectées par Wnt5a et dans le tissu adipeux des souris transgéniques, le cholestérol ne s'accumule pas, ce qui suggère que les oxystérols ne s'accumulent pas non plus. Ainsi, en absence de leur ligand, il n'est pas surprenant que les LXR ne soient pas activés.

Nous avons observé que l'activation de l'expression de ABCG1 passe par le promoteur B de son gène, qui possède une séquence cible des LXR (LXRE). Ainsi, pour confirmer par une approche complémentaire l'absence d'implication des LXR dans l'augmentation de l'expression de ABCG1 par Wnt5a, il serait pertinent de reproduire l'expérience de gène rapporteur luciférase sous contrôle du promoteur B dans lequel la séquence LXRE aurait été mutée. Si l'activation de la luciférase est toujours observée malgré la mutation, cela signifiera que la séquence LXRE n'est pas requise pour l'expression du gène et exclura un rôle des LXR dans l'activation de ce promoteur B par Wnt5a.

b) par quel(s) autre(s) facteur(s) de transcription ?

Nous avons éliminé l'hypothèse d'une stabilisation de l'ARNm de ABCG1 par Wnt5a (figure 36) et confirmé qu'il s'agissait d'une activation de la transcription du gène du transporteur par l'activation du promoteur B (figure 37). L'absence d'activation des LXR nous oriente vers l'implication d'autres facteurs de transcription. Les LXR ne sont en effet pas les seuls facteurs possédant des séquences cibles sur les promoteurs de ABCG1. Les promoteurs A et B contiennent par exemple plusieurs séquences cibles de NFκB (Lorkowski et al., 2001). Dans plusieurs types cellulaires, il a été montré que la signalisation Wnt5a passe par l'activation de NFκB (Bradley and Drissi, 2010; Kim et al., 2012). Par exemple, dans un modèle de cellules HAEC (*human aortic endothelial cells*), l'effet direct de Wnt5a sur la fixation de NFκB sur l'ADN a été montré par immunomarquage (Kim et al., 2010). Si le contexte de cette dernière étude est l'effet de Wnt5a sur la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation, l'existence d'un lien entre le traitement de cellules par Wnt5a et la fixation de NFκB sur l'ADN est établi clairement. On peut alors envisager que dans nos modèles, Wnt5a permette également la fixation de NFκB sur un des promoteurs de ABCG1 et active la transcription du gène. La figure 77 présente une version schématisée de cette hypothèse qui peut être vérifiée par quantification des niveaux de NFκB nucléaire et cytoplasmique dans les MEF fractionnées après différenciation adipogénique.

L'étude de l'activation de la transcription de ABCG1 en est à un stade préliminaire et nécessite des expériences supplémentaires sur les promoteurs de son gène pour résoudre les mécanismes de cette activation. En plus des promoteurs A et B, d'autres promoteurs ont été identifiés sur le gène de ABCG1, en amont de l'exon 2 et de l'exon 8 notamment (Kennedy et al., 2001). Il serait intéressant de déterminer l'implication de ces autres promoteurs par des expériences de gène rapporteur luciférase, et d'étudier la possibilité d'une coopération entre ces différents promoteurs dans l'activation de la transcription de ABCG1 par Wnt5a.

Comment ABCG1 stimule l'efflux de cholestérol ? Quel rôle pour ABCA1 ?

Si la fonction du transporteur ABCA1 dans le mécanisme d'efflux de cholestérol vers les lipoprotéines pauvres en lipides est relativement bien décrit (Vedhachalam et al., 2007b; Wang et al., 2001), les rôles de ABCG1 restent en partie à élucider. Il est admis que ABCG1 permet l'efflux de cholestérol vers les HDL, et un certain nombre d'études l'associent également au trafic intracellulaire du cholestérol (Tarling and Edwards, 2011). Les

interrogations qui demeurent quant à cette dernière fonction résultent notamment du fait que la communauté scientifique ne s'accorde pas clairement sur la localisation du transporteur au sein de la cellule. Si il est toujours retrouvé dans les compartiments cytoplasmiques (membranes du RE et du l'appareil de Golgi, endosomes), il n'est retrouvé à la membrane plasmique que dans certaines études (Kennedy et al., 2001; Neufeld et al., 2014; Sturek et al., 2010; Tarling and Edwards, 2011; Vaughan and Oram, 2005). Son rôle dans l'efflux direct est donc questionné et l'hypothèse d'une coopération entre ABCA1 au niveau membranaire et ABCG1 au niveau cytoplasmique est formulée.

L'Apo-A1 que l'on a utilisé dans l'expérience de mesure d'efflux *in vitro* est un accepteur de cholestérol qui ne peut être chargé que par ABCA1 (Gelissen et al., 2006; Vaughan and Oram, 2006), or dans notre modèle c'est l'expression de ABCG1 qui est augmentée, celle de ABCA1 restant stable. Ce résultat étaye un peu plus l'hypothèse de la coopération entre ABCA1 et ABCG1. Elle pourra être vérifiée en évaluant la contribution respective de chacun de ces deux transporteurs dans le phénomène d'efflux activé en présence de Wnt5a. Réitérer cette expérience de mesure de l'efflux en inhibant l'expression de ABCA1 par transfection de siRNA permettrait de savoir si ce transporteur, même faiblement exprimé, participe au mécanisme d'efflux direct aux ApoA-I observé lorsque ABCG1 est surexprimé. Inhiber l'expression de ABCG1 par silencing ou utiliser des HDL2, accepteurs préférentiels de ABCG1 (Wang et al., 2006 ; Whetzel et al., 2010), dans l'expérience permettrait de confirmer si ABCG1 joue effectivement le rôle majeur dans cet efflux.

Compte tenu de données de la littérature citées plus haut et des résultats de l'expérience de mesure d'efflux, nous proposons que l'augmentation de l'expression de ABCG1 par Wnt5a pourrait modifier sa distribution entre les différents compartiments cytoplasmiques et faciliter le transport intracellulaire du cholestérol en vue de son export à travers la membrane via ABCA1. Pour explorer cette piste, nous avons débuté des analyses de la localisation de ABCG1 par immunomarquage dans les lignées de MEF différenciées. Les résultats préliminaires montrent que ABCG1 est retrouvé à la membrane plasmique dans les MEF WT mais sa localisation est restreinte aux compartiments intracellulaires dans les LRP1^{-/-}. Ces cellules n'expriment pas LRP1 et donc pas Wnt5a, suggérant que LRP1 et/ou Wnt5a sont nécessaires à la localisation membranaire de ABCG1. La retransfection de Wnt5a dans les MEF LRP1^{-/-} induit une augmentation de l'expression de ABCG1 (figure 34) mais l'immunomarquage montre que cela ne permet pas de restaurer sa localisation membranaire. Cette augmentation d'expression est cependant suffisante pour stimuler l'efflux de cholestérol

(figure 33). Ces données suggèrent d'une part que la localisation de ABCG1 au niveau de la membrane plasmique est dépendante de l'expression de LRP1, et d'autre part que ABCG1 peut stimuler l'efflux de cholestérol en étant localisé uniquement dans le compartiment cytoplasmique. Cette dernière observation renforce encore l'hypothèse selon laquelle ABCG1 favorise le transport du cholestérol entre les compartiments cytoplasmiques pour faciliter son efflux par ABCA1.

II. Wnt5a et l'inhibition de la synthèse de cholestérol

Le deuxième mécanisme de la régulation du métabolisme que nous avons identifié comme étant impliqué dans la prévention de l'accumulation de cholestérol par Wnt5a est la diminution de la synthèse endogène. En effet, nos données montrent que l'expression de l'HMGCoA-Reductase est diminuée par la retransfection de Wnt5a dans les cellules déficientes en LRP1 ainsi que par la surexpression de Wnt5a dans le tissu adipeux blanc des souris. Cette diminution est due à une inhibition de la translocation de SREBP2 dans le noyau des cellules. Wnt5a semble d'ailleurs potentialiser l'effet inhibiteur du 25-hydroxycholestérol sur la translocation de SREBP2. Afin de compléter ces données, il conviendrait de mesurer *in vitro* l'effet de Wnt5a sur l'activité enzymatique de l'HMGCoA-Reductase et de quantifier la synthèse endogène par mesure de l'incorporation de cholestérol radioactif.

Par quels mécanismes Wnt5a peut inhiber la translocation nucléaire de SREBP2 ?

La translocation nucléaire de SREBP2 est contrôlée par la protéine Scap qui assure son transport entre le RE et le Golgi, et la protéine Insig1 qui séquestre ou libère le complexe Scap/SREBP2 selon le taux de cholestérol intracellulaire. Ces mécanismes sont régulés par les stérols eux même et Wnt5a pourrait intervenir dans plusieurs étapes de cette régulation.

a) Wnt5a stabilise la protéine Insig1

Nous avons observé que l'inhibition de la translocation de SREBP2 par le 25-HC est accentuée par Wnt5a. Une des pistes que nous avons explorées pour identifier les mécanismes de cette inhibition est la stabilisation de Insig1 par Wnt5a. Nous avons observé que cette stabilisation, assurée par les oxystérols (le 25-HC), est renforcée en présence de Wnt5a (figure 46). Wnt5a étant une protéine de signalisation extracellulaire et ne possédant pas domaine sensible aux stérols, l'hypothèse d'une interaction directe entre Wnt5a et les oxystérols ou

Wnt5a et Insig1 est peu plausible. Il apparaît plus convainquant d'envisager que Wnt5a initie une signalisation cellulaire permettant la rétention du complexe SREBP2/Scap/Insig1 au niveau du RE, qui soit cible directement Insig1, soit active une protéine intermédiaire.

o Un effet de la signalisation Wnt5a directement sur Insig1 ?

Nous avons observé que la translocation de SREBP2 et la dégradation de Insig1 sont inhibées en présence de Wnt5a par les oxystérols, en l'occurrence le 25-HC. L'interaction oxystérols/Insig1 n'a pas pu être démontrée expérimentalement, mais elle l'a été avec Insig2 (Radhakrishnan et al., 2007). La conséquence de cette interaction oxystérols/Insig2 est la liaison de Insig2 à Scap et la rétention du complexe Scap/SREBP2 à la membrane du RE. Compte tenu de la forte identité de séquence entre les deux Insig, il est admis que les oxystérols se lient à Insig1 et favorisent sa fixation à Scap (Brown and Goldstein, 2009).

Nous pensons que Wnt5a accentue la stabilisation de Insig1 par le 25-HC en favorisant ou en renforçant l'interaction entre Insig1 et les oxystérols. Si Wnt5a renforce effectivement l'interaction entre Insig1 et le 25-HC, en conséquence, l'interaction entre Scap et Insig1 devrait également être renforcée. Pour vérifier cette hypothèse, nous disposons d'un plasmide codant pour la protéine Scap auquel j'ai ajouté par PCR un tag polyhistidine. Des expériences préliminaires de cotransfection des plasmides codant Insig1-cmyc et Scap-his suivie d'immunoprécipitation de Insig1 avec un anticorps dirigée contre son tag ont été réalisées dans les MEF LRP1-/- ; Wnt5a et LRP1-/- ; mock. Le but était d'observer ensuite par western blot la quantité de protéine Scap avec un anticorps anti-histidine pour savoir si l'on détecte plus de signal lorsque Wnt5a est présent. Cela confirmerait qu'une plus grande quantité de protéine Scap est fixé à Insig1 lorsque Wnt5a est exprimée. Ces expériences ne sont pas concluantes à ce stade et des mises au point expérimentales sont encore nécessaires.

Les cellules d'insecte n'expriment pas Insig1 et ne régulent pas la synthèse de cholestérol en fonction de son taux intracellulaire. Une étude réalisée dans ces cellules montre que la transfection de Scap, Insig1 et SREBP2 est suffisante pour instaurer une régulation sensible aux stérols (Dobrosotskaya et al., 2003). Même si cette étude concerne les cellules d'insecte, on peut imaginer que le mécanisme décrit soit similaire dans les cellules de mammifères et que ces 3 seules protéines soient suffisantes pour réguler la synthèse du cholestérol. A la lumière de ces données, l'hypothèse d'un effet direct de la signalisation Wnt5a sur Insig1 est confortée.

o Un effet de la signalisation Wnt5a sur une protéine intermédiaire ?

L'hypothèse d'une intervention de protéines intermédiaires dans la régulation de la synthèse du cholestérol par les oxystérols a conduit à l'identification de la protéine OSBP1 (*Oxysterols Binding Protein 1*) (Taylor and Kandutsch, 1985). En présence de 25-HC, OSBP1 transloque du cytoplasme au Golgi et il a été proposé que cette protéine participe à la régulation du métabolisme du cholestérol (Ridgway et al., 1992). Cependant la démonstration directe du lien entre la fixation du 25-HC sur OSBP1 et l'inhibition de la synthèse endogène n'a à ce jour pas pu être réalisée (Brown and Goldstein, 2009; Goldstein et al., 2006). Il a d'ailleurs été montré que l'inhibition de la translocation de SREBP2 sous l'effet du 25-HC était toujours effective après silencing de OSBP1 (Nishimura et al., 2005). Ces données appuient les conclusions des travaux réalisés dans les cellules d'insecte, c'est-à-dire une régulation de l'activation des gènes cibles de SREBP2 par le cholestérol et les oxystérols via les deux seules protéines du RE Scap et Insig1 (Brown and Goldstein, 2009) et sont cohérents avec notre proposition d'un rôle stabilisateur de Wnt5a sur Insig1. Néanmoins, depuis l'identification de OSBP1, de nombreuses autres protéines présentant de fortes homologies de séquence avec celle-ci ont été découvertes (Lehto and Olkkonen, 2003). Chez les mammifères, on dénombre une quinzaine de ces ORP (*OSBP-related proteins*) et on ne peut pas exclure que l'une ou plusieurs d'entre elles pourraient être une cible de Wnt5a dans son action inhibitrice sur la translocation nucléaire de SREBP2.

b) Comment Wnt5a diminue la translocation de SREBP2 ?

Si Wnt5a peut activer une signalisation qui aurait un effet stabilisateur sur Insig1, on peut également envisager une action inhibitrice de Wnt5a sur une des autres étapes du processus d'activation de SREBP2 : le transport de SREBP2 jusqu'à l'appareil de Golgi, son clivage ou bien son transport dans le noyau. Ces processus font intervenir un certain nombre de protéines, comme les enzymes S1P et S2P qui assurent le clivage de SREBP2, PAQR3 qui ancre le complexe Scap/SREBP2 dans le Golgi ou l'importin β qui conduit la fraction clivée au noyau.

Il a été montré que l'inhibition de l'expression de PAQR3 entraîne une diminution de la quantité de SREBP2 nucléaire (Xu et al., 2015), c'est pourquoi le niveau d'expression de PAQR3 a été mesuré chez les souris sauvages et transgéniques aTgWnt5a. Il n'a pas observé de différence entre les tissus adipeux, ce qui suggère que Wnt5a n'agit pas sur PAQR3 pour inhiber la translocation de SREBP2. Cependant, l'équipe de Xu a montré que l'inhibition de

l'interaction PAQR3/Scap par un peptide synthétique, sans modifier l'expression de PAQR3, conduisait également à inhiber la translocation de SREBP2 et l'expression de ses gènes cible. Nous avons émis plus haut dans ce chapitre l'hypothèse que Wnt5a puisse favoriser l'interaction entre Insig1 et Scap. Puisque PAQR3 se comporte avec Scap dans le Golgi de la même manière que Insig1 se comporte avec Scap dans le RE, nous pouvons transposer notre hypothèse et imaginer que Wnt5a puisse défavoriser l'interaction PAQR3/Scap, et ce sans modifier son expression. Ainsi, Wnt5a pourrait de façon simultanée retenir, via Insig1, SREBP2 dans le RE et empêcher, via PAQR3, sa localisation dans le Golgi. L'analyse dans les MEF différenciées des niveaux de PAQR3, de Scap et de Insig1 dans leurs compartiments cytoplasmiques respectifs isolés par centrifugation sur gradient pourrait valider l'implication de PAQR3 dans l'effet inhibiteur de Wnt5a.

Enfin, pour répondre à cette question d'un effet de Wnt5a sur les étapes de l'activation de la translocation de SREBP2, des analyses complémentaires restent à réaliser sur les expressions des autres protéines (S1P, S2P, importin β).

Wnt5a stimule-t-elle la dégradation de l'HMGC α -Reductase ?

En plus de l'inhibition de la translocation de SREBP2 qui diminue la transcription de l'HMGC α -Reductase, Insig1 est impliquée dans la dégradation de cette enzyme par le protéasome (Sever et al., 2003; Song et al., 2005a). En effet, la fixation des stérols sur Insig1 entraîne sa liaison à l'HMGC α -Reductase, l'ubiquitinylation de celle-ci et son adressage au protéasome. Insig1 étant stabilisée par Wnt5a, on peut présumer que le taux d'HMGC α -Reductase mesuré dans les MEF LRP1 $^{-/-}$, Wnt5a et dans le WAT des souris transgéniques est diminué par la combinaison de l'inhibition de sa transcription et de la stimulation de sa dégradation. Pour démontrer cette hypothèse, nous souhaitons analyser l'activité des enzymes du protéasome en absence et en présence de Wnt5a.

III. Wnt5a dans la protection contre l'athérosclérose

La deuxième partie du projet de thèse consistait à étudier le rôle de Wnt5a dans l'athérosclérose pour vérifier si ses effets sur le métabolisme du cholestérol observés dans la 1^{ère} partie des travaux pouvaient protéger les aortes de l'apparition des lésions. Pour cela nous avons utilisé 3 approches différentes. Les deux premières consistaient à activer la signalisation Wnt5a chez les souris sm22LRP1- et la dernière consistait à invalider Wnt5a spécifiquement dans les CMLv des souris LDLR-/.

Pourquoi l'activation de la signalisation Wnt5a chez les souris smLRP1- n'a pas abouti à des résultats concluants ?

Nous n'avons pas pu observer d'effet de Wnt5a sur l'étendue des lésions lors de nos tentatives pour activer la signalisation Wnt chez les souris sm22LRP1-.

Nous avons montré que dans les MEF LRP1-/-, l'absence de Wnt5a coïncide avec une diminution de la quantité de β -caténine nucléaire, indiquant que dans les MEF Wnt5a active la voie canonique (Terrand et al., 2009). Il avait été observé par notre équipe que le traitement des MEF LRP1-/ par du LiCl, un inhibiteur de la GSK3 β qui mime donc une activation de la voie Wnt canonique, inhibe l'accumulation de cholestérol (Terrand et al., 2009). Par ailleurs, une diminution des lésions athéromateuses suite au traitement de souris ApoE-/ par du LiCl avait été rapportée (Choi et al., 2010). Nous nous sommes basé sur ces données pour reproduire le protocole de Choi et son équipe avec les souris sm22LRP1-, cependant, nous ne savons pas si dans les CMLv des aortes des souris sm22LRP1-, l'absence de Wnt5a se traduit également par une diminution de la β -caténine nucléaire. Une explication à l'absence d'effet du LiCl chez les souris sm22LRP1- pourrait être que la signalisation canonique n'est pas impliquée dans leur phénotype. Cette hypothèse est cohérente avec les données de la littérature qui montrent que l'activité de Wnt5a est dépendante du contexte cellulaire, et que Wnt5a est fréquemment associée à l'activation des voies non canoniques (Cheng et al., 2008; Masckauchán et al., 2006; Mikels and Nusse, 2006b; Topol et al., 2003).

Du fait de l'activité de Wnt5a dépendante du contexte cellulaire, il est également difficile d'anticiper les effets des injections de Wnt5a purifiée chez les souris sm22LRP1- puisque ceux-ci peuvent varier d'un type cellulaire à l'autre. Nous nous attendons à une diminution de l'étendu des lésions compte tenu de l'effet préventif de Wnt5a canonique sur l'accumulation intracellulaire de cholestérol *in vitro*, et de son effet protecteur contre les lésions dans les CMLv des souris LDLR-/.

Les conséquences de l'invalidation de Wnt5a dans les CMLv des souris LDLR^{-/-} ?

a) sur l'étendue des lésions athéromateuses

Nous n'avons pu analyser l'étendue des lésions sur une seule souris sm22Wnt5a⁻ sous régime Paigen, dont l'aorte présentait deux fois plus de lésions que l'aorte de la souris contrôle sm22Wnt5a⁺. A ce stade, nous ne pouvons qu'être encouragés dans notre hypothèse selon laquelle Wnt5a pourrait effectivement être impliquée dans la protection contre l'athérosclérose, sans toutefois pouvoir conclure.

Il est évidemment capital de valider le modèle en vérifiant que l'expression de Wnt5a est bien invalidée dans les CML des 20% de souris sm22Wnt5a⁻ survivantes. Il est en effet possible que ces souris survivent parce que la pénétrance du KO n'est pas complète. L'anticorps anti-Wnt5a n'a pour l'instant pas permis de détecter la protéine sur des échantillons d'aortes entières prélevées sur les souris contrôles. Il apparaît donc nécessaire de mettre au point puis réaliser la mise en culture des CMLv pour mesurer l'expression de Wnt5a par qPCR. Nous pourrions également comparer les profils d'expression des autres protéines étudiées (les transporteurs ABCA1 et ABCG1, l'HMGCoA-Reductase, Insig1, LDLR) avec leurs profils observés dans ce travail.

Sur les animaux qui survivent après 10 jours, il est nécessaire de constituer des groupes à mettre sous régime Paigen pour poursuivre l'analyse des lésions athéromateuses par coloration au Sudan IV. La caractérisation des lésions se fera aussi par colorations histologiques marquant les lames élastiques. Ces structures sont impliquées dans l'organisation de la paroi des vaisseaux et leur rupture est fréquente dans les lésions athéromateuses. C'est le cas dans les aortes des souris sm22LRP1⁻ dont les lames élastiques présentent des ruptures plus nombreuses que chez les souris contrôles. Le collagène, protéine impliquée dans le maintien de l'intégrité des vaisseaux et dans la migration des CMLv des lésions (Plenz et al., 2003) pourra également être analysé, tout comme les profils d'expression des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et dans l'inflammation.

Nous nous attendons à retrouver une augmentation des lésions comme observée chez les souris sm22LRP1⁻, mais plusieurs éléments laissent penser que le phénotype des souris sm22Wnt5a pourrait ne pas être strictement identique à celui des sm22LRP1⁻. Premièrement, l'accentuation des lésions chez les souris sm22Wnt5a⁻ pourrait ne pas être aussi prononcée puisque l'expression de LRP1 n'est pas invalidée. Le contrôle des signalisations PDGF et TGFβ ne devrait donc pas être perturbé et la prolifération et la migration des CMLv devraient donc être moindre.

Souris de 6 mois sous régime standard

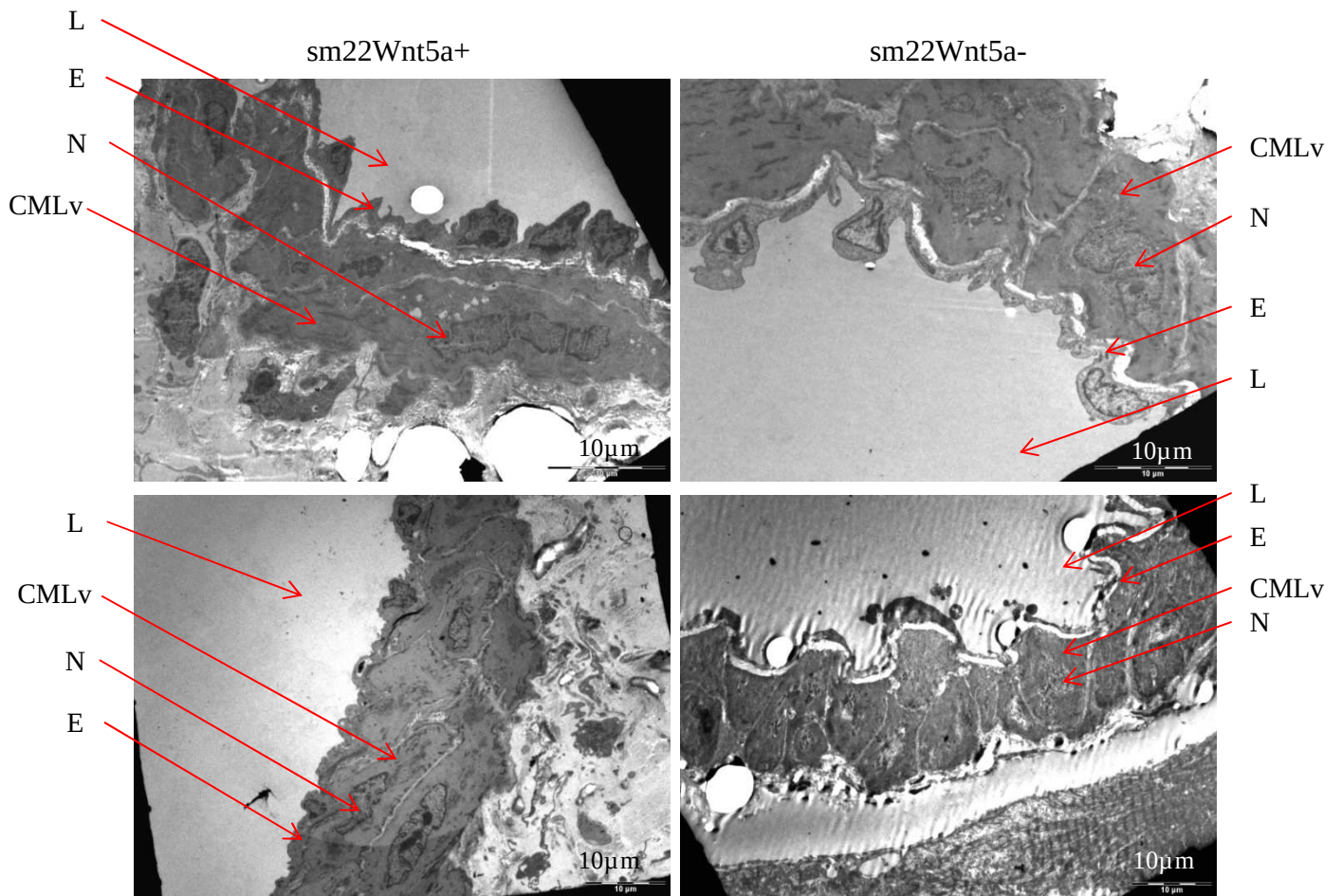


Figure 78 : La morphologie des CMLv est altérée chez les souris *sm22Wnt5a-*. Microscopie électronique à transmission de coupes de vaisseaux de souris *sm22Wnt5a+* et *sm22Wnt5a-*, âgées de 6 mois et nourries avec un régime standard (n=3). E : endothélium, N : noyau, L : lumière de l'aorte.

b) sur le développement du système cardiovasculaire ?

L'invalidation de Wnt5a spécifiquement dans les CML entraîne l'apparition d'un phénotype de mort périnatal chez les souris sm22Wnt5a⁻. A ce jour, les causes de cette mortalité périnatale ne sont pas connues. L'invalidation de Wnt5a ayant lieu dans les cellules musculaires lisses, tous les tissus qui en contiennent pourraient potentiellement être atteints par des défauts structurels ou fonctionnels. Cela inclut les tissus des systèmes cardiovasculaires, digestifs, pulmonaires et urinaires. Nous avons cependant choisi de poursuivre l'analyse du phénotype chez les embryons en nous focalisant sur le cœur et le système vasculaire. En effet, un nombre croissant d'études associent la signalisation non canonique Wnt5a au développement embryonnaire du cœur (Tian et al., 2010). Wnt5a est par exemple impliquée dans la migration des cellules de la crête neurale cardiaque pour former le septum séparant l'aorte et l'artère pulmonaire et sa mutation fonctionnelle chez la souris entraîne un défaut de septation au niveau de cette voie (Schleifarth et al., 2007). Wnt5a est également impliqué dans la migration des cellules donnant naissance au ventricule droit (Bisson et al., 2015).

Nous avons réalisé sur des embryons de 18,5 jours entiers des colorations H&E qui ne révèlent a priori pas de défauts anatomiques évidents (données non présentées), c'est pourquoi nous souhaitons orienter nos recherches vers des défauts structurels des tissus au niveau microscopique. En ce sens, le Docteur Bruban-Schann a récemment débuté au laboratoire des analyses par microscopie électronique à transmission sur les vaisseaux de souris âgées de 6 mois et sous régime standard afin de rechercher des anomalies dans leur structure.

Cette analyse a permis de confirmer le défaut de morphologie des CMLv suspecté lors de l'analyse histologique des aortes. En effet, on remarque que si les CMLv des aortes de souris sm22Wnt5a⁺ sont de morphologie fusiforme et organisées en couche concentrique, les CMLv des aortes des souris sm22Wnt5a⁻ sont désorganisées et présentent une forme plutôt cubique (figure 78). Nous souhaitons poursuivre l'exploration de la structure de la média sur d'autres vaisseaux, et, pour déceler si ces altérations de la couche de l'aorte responsable du tonus vasculaire se répercutent en une anomalie de tension, la réactivité vasculaire des souris sera mesurée.

Ces perturbations de structure peuvent être responsables de la mort périnatale des animaux, et il est possible que le phénotype soit moins marqué chez certaines souris, ce qui explique qu'elles survivent plusieurs mois. Cependant, la différence de phénotype entre les

souris sm22Wnt5a- et les contrôles suggère que l'invalidation de Wnt5a, qui n'a pas pu être vérifiée par western blot, est tout de même effective chez ces souris survivantes.

Perspectives à long terme

Quelles perspectives dans l'étude de l'effet de Wnt5a sur le métabolisme du cholestérol *in vivo* ?

Chez les souris transgéniques surexprimant Wnt5a, nous nous sommes focalisés sur le tissu adipeux blanc, cependant les macrophages de ces souris expriment également plus de Wnt5a que ceux des souris sauvages. Il a été montré que l'inactivation de LRP1 spécifiquement dans les macrophages augmente l'athérosclérose chez les souris LDLR^{-/-} (Overton et al., 2007). On peut supposer que dans les macrophages de ces souris, l'expression de Wnt5a est diminuée, comme dans les MEF LRP1^{-/-} et les aortes des souris sm22LRP1^{-/-}, et que l'augmentation des lésions puisse être en partie attribuée à cette perte de Wnt5a. Il serait intéressant de croiser nos souris transgéniques aTgWnt5a avec des souris LDLR^{-/-} afin de générer des souris LDLR^{-/-} qui surexpriment Wnt5a dans les macrophages. Nous pourrions alors mettre ces animaux sous régime Paigen et observer si la surexpression de Wnt5a dans les macrophages permet de limiter l'étendue des lésions. Une autre approche serait de transplanter la moelle osseuse des souris transgéniques dans des souris LDLR^{-/-} irradiées afin que Wnt5a soit surexprimée spécifiquement dans les macrophages. On s'attend dans les deux cas à observer une diminution de l'expression de l'HMGCoA-Reductase et une augmentation de l'expression de ABCG1 qui stimulerait l'efflux de cholestérol et limiterait leur transformation en macrophages spumeux. L'étendue des lésions devrait être diminuée par rapport aux souris LDLR^{-/-}. Ce modèle permettrait d'étudier le rôle de Wnt5a sur le métabolisme du cholestérol *in vivo* dans un autre type cellulaire, tout en apportant des éléments nouveaux sur l'implication de la protéine Wnt5a dans l'athérosclérose.

Identifier une molécule « Wnt5a-like » à potentiel thérapeutique ?

L'injection de Wnt5a purifiée chez les souris sm22LRP1^{-/-} n'a pas permis d'observer d'effet protecteur de Wnt5a contre l'athérosclérose. Le fait que la protéine purifiée n'ait pas inhibé l'accumulation de cholestérol lors de la différenciation adipogénique des MEF suggérerait que la purification avait perdu son activité. Comme la protéine Wnt5a purifiée est fragile (Willert et al., 2003), l'objectif pour la poursuite du projet est de s'affranchir de cette instabilité de Wnt5a en passant par le criblage d'une ou plusieurs molécules ayant des propriétés « Wnt5a-like ». Deux types de criblage sont envisagés par le laboratoire : un criblage *in silico* et un criblage à haut débit.

Le criblage *in silico* nécessite a priori de connaître la structure 3D de Wnt5a, or celle-ci n'a pas encore été cristallisée. A ce jour, les seules informations sur la structure de Wnt ont été obtenues par la cristallisation du complexe Wnt8/Fz8 (Janda et al., 2012b). Deux domaines impliqués dans l'interaction de Wnt8 avec son ligand Fz8 ont été identifiés : la sérine 187 et le domaine situé entre les cystéines 315 et 325. Ces deux domaines sont très conservés entre les Wnt et on les retrouve sur la séquence de Wnt5a en position 229 et 342-352 respectivement. C'est donc à partir de la structure de Wnt8 que sera réalisé le criblage de molécules dans des bases de données pour identifier celles dont la structure permettrait de mimer l'interaction de Wnt5a à Fzl. L'efficacité des molécules identifiées pour inhiber l'accumulation de cholestérol au cours de la différenciation adipogénique sera ensuite testée *in vitro*. L'approche par criblage à haut débit consiste à réaliser le même test sur très grand nombre de molécules, grâce à un système robotisé et miniaturisé permettant de réaliser la différenciation adipogénique en plaque 96 puits.

Si une ou plusieurs molécules répondent positivement au test d'inhibition de l'accumulation cholestérol *in vitro*, et après vérification de leur absence de toxicité, elles pourront être administrées aux souris sm22LRP1-. Si les molécules sont efficaces pour diminuer l'athérosclérose chez les souris, cela pourrait ouvrir des pistes vers de nouvelles thérapies destinées à traiter l'athérosclérose.

Pour conclure

Les études réalisées sur les souris invalidées pour LRP1 dans les CMLv avaient mis en évidence son rôle dans la protection contre l'athérosclérose, notamment via la modulation des voies de signalisation TGF β et PDGF qui régulent la prolifération de ces cellules (Boucher et al., 2003, 2007). Plusieurs éléments soutenaient également l'hypothèse d'un rôle de LRP1 dans le métabolisme du cholestérol et donc dans la formation des cellules spumeuses (Zhou et al., 2009b). Le laboratoire avait renforcé cette hypothèse en montrant que LRP1 était nécessaire à l'expression de Wnt5a, et que cette expression permettait de limiter l'accumulation intracellulaire de cholestérol induite *in vitro* par un cocktail de différenciation (Terrand et al., 2009). Les mécanismes moléculaires sous-jacents développés par ces cellules LRP1^{-/-}, Wnt5a n'avaient pas été décrits. Les travaux de thèse présentés ici montrent pour la première fois que la signalisation LRP1/Wnt5a active des mécanismes d'efflux et d'inhibition de synthèse visant à limiter l'accumulation de cholestérol dans la cellule. Si de nombreux aspects de la régulation du métabolisme du cholestérol par cette signalisation restent à élucider *in vitro*, ces résultats nous ont permis de consolider l'hypothèse de la participation de Wnt5a dans l'effet protecteur de LRP1 contre l'athérosclérose. La poursuite de l'étude des souris sm22Wnt5a⁻ permettra de vérifier cette hypothèse et d'établir le potentiel de Wnt5a en tant que cible thérapeutique dans le traitement de la maladie.

Références bibliographiques

Abela, G.S. (2010). Cholesterol crystals piercing the arterial plaque and intima trigger local and systemic inflammation. *J. Clin. Lipidol.* 4, 156–164.

Abela, G.S., Aziz, K., Vedre, A., Pathak, D.R., Talbott, J.D., and Dejong, J. (2009). Effect of cholesterol crystals on plaques and intima in arteries of patients with acute coronary and cerebrovascular syndromes. *Am. J. Cardiol.* 103, 959–968.

Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M. (1996). Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science* 271, 518–520.

Ahmadian, M., Wang, Y., and Sul, H.S. (2010). Medicine in Focus: Lipolysis in Adipocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 555–559.

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.

Allahverdian, S., Pannu, P.S., and Francis, G.A. (2012). Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation. *Cardiovasc. Res.* 95, 165–172.

Allahverdian, S., Chehroudi, A.C., McManus, B.M., Abraham, T., and Francis, G.A. (2014). Contribution of Intimal Smooth Muscle Cells to Cholesterol Accumulation and Macrophage-Like Cells in Human Atherosclerosis. *Circulation* 129, 1551–1559.

Alphonsus, C.S., and Rodseth, R.N. (2014). The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia* 69, 777–784.

Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350–355.

Amit, S., Hatzubai, A., Birman, Y., Andersen, J.S., Ben-Shushan, E., Mann, M., Ben-Neriah, Y., and Alkalay, I. (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of β -catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev.* 16, 1066–1076.

Anastas, J.N., and Moon, R.T. (2013). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 11–26.

Anderson, R.G.W., and Jacobson, K. (2002). A Role for Lipid Shells in Targeting Proteins to Caveolae, Rafts, and Other Lipid Domains. *Science* 296, 1821–1825.

Anderson, R.G., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1976). Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73, 2434–2438.

Anderson, R.G.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1977). Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10, 351–364.

- Arai, H. (2014). Oxidative modification of lipoproteins. *Subcell. Biochem.* 77, 103–114.
- Arakawa, R., and Yokoyama, S. (2002). Helical Apolipoproteins Stabilize ATP-binding Cassette Transporter A1 by Protecting It from Thiol Protease-mediated Degradation. *J. Biol. Chem.* 277, 22426–22429.
- Argmann, C.A., Diepstraten, C.H.V.D., Sawyez, C.G., Edwards, J.Y., Hegele, R.A., Wolfe, B.M., and Huff, M.W. (2001). Transforming Growth Factor- β 1 Inhibits Macrophage Cholesteryl Ester Accumulation Induced by Native and Oxidized VLDL Remnants. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 2011–2018.
- Arias-Moreno, X., Velazquez-Campoy, A., Rodríguez, J.C., Pocoví, M., and Sancho, J. (2008). Mechanism of Low Density Lipoprotein (LDL) Release in the Endosome IMPLICATIONS OF THE STABILITY AND Ca^{2+} AFFINITY OF THE FIFTH BINDING MODULE OF THE LDL RECEPTOR. *J. Biol. Chem.* 283, 22670–22679.
- Asmar, Z.E., Terrand, J., Jenty, M., Host, L., Mlih, M., Zerr, A., Justiniano, H., Matz, R.L., Boudier, C., Scholler, E., et al. (2016). Convergent signaling pathways controlled by LRP1 cytoplasmic and extracellular domains limit cellular cholesterol accumulation. *J. Biol. Chem.* jbc.M116.714485.
- Assmann, G., and Gotto, A.M. (2004). HDL Cholesterol and Protective Factors in Atherosclerosis. *Circulation* 109, III-8-III-14.
- Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A., and Aaronson, S.A. (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* 3, 683–686.
- 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.
- Ball, R.Y., Stowers, E.C., Burton, J.H., Cary, N.R.B., Skepper, J.N., and Mitchinson, M.J. (1995). Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis* 114, 45–54.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281–297.
- Barter, P.J., Brewer, H.B., Chapman, M.J., Hennekens, C.H., Rader, D.J., and Tall, A.R. (2003). Cholesteryl Ester Transfer Protein A Novel Target for Raising HDL and Inhibiting Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 160–167.
- Basford, J.E., Wancata, L., Hofmann, S.M., Silva, R.A.G.D., Davidson, W.S., Howles, P.N., and Hui, D.Y. (2011). Hepatic Deficiency of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-1 Reduces High Density Lipoprotein Secretion and Plasma Levels in Mice. *J. Biol. Chem.* 286, 13079–13087.
- Bazzoni, G. (2006). Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall. *Thromb. Haemost.* 95, 36–42.

- Bedel, A., Nègre-Salvayre, A., Heeneman, S., Grazide, M.-H., Thiers, J.-C., Salvayre, R., and Maupas-Schwalm, F. (2008). E-Cadherin/ β -Catenin/T-Cell Factor Pathway Is Involved in Smooth Muscle Cell Proliferation Elicited by Oxidized Low-Density Lipoprotein. *Circ. Res.* *103*, 694–701.
- Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J., and Stanley, K.K. (1989). The LDL–receptor–related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* *341*, 162–164.
- Bennett, C.N., Ross, S.E., Longo, K.A., Bajnok, L., Hemati, N., Johnson, K.W., Harrison, S.D., and MacDougald, O.A. (2002). Regulation of Wnt Signaling during Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *277*, 30998–31004.
- Bentzon, J.F., Otsuka, F., Virmani, R., and Falk, E. (2014). Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circ. Res.* *114*, 1852–1866.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). Important Derivatives of Cholesterol Include Bile Salts and Steroid Hormones.
- Bhatt, P.M., and Malgor, R. (2014). Wnt5a: A player in the pathogenesis of atherosclerosis and other inflammatory disorders. *Atherosclerosis* *237*, 155–162.
- Bhatt, P.M., Lewis, C.J., House, D.L., Keller, C.M., Kohn, L.D., Silver, M.J., McCall, K.D., Goetz, D.J., and Malgor, R. (2012). Increased Wnt5a mRNA Expression in Advanced Atherosclerotic Lesions, and Oxidized LDL Treated Human Monocyte-Derived Macrophages. *Open Circ. Vasc. J.* *5*, 1–7.
- Bisson, J.A., Mills, B., Paul Helt, J.-C., Zwaka, T.P., and Cohen, E.D. (2015). Wnt5a and Wnt11 inhibit the canonical Wnt pathway and promote cardiac progenitor development via the Caspase-dependent degradation of AKT. *Dev. Biol.* *398*, 80–96.
- Björnsson, E.S. (2015). Drug-induced liver injury: an overview over the most critical compounds. *Arch. Toxicol.* *89*, 327–334.
- Boileau, C., Jondeau, G., Mizuguchi, T., and Matsumoto, N. (2005). Molecular genetics of Marfan syndrome. *Curr. Opin. Cardiol.* *20*, 194–200.
- Bommer, G.T., and MacDougald, O.A. (2011). Regulation of lipid homeostasis by the bifunctional SREBF2-miR33a locus. *Cell Metab.* *13*, 241–247.
- Bonthu, S., Heistad, D.D., Chappell, D.A., Lamping, K.G., and Faraci, F.M. (1997). Atherosclerosis, Vascular Remodeling, and Impairment of Endothelium-Dependent Relaxation in Genetically Altered Hyperlipidemic Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *17*, 2333–2340.
- Boucher, P., and Gotthardt, M. (2004). LRP and PDGF Signaling: A Pathway to Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* *14*, 55–60.
- Boucher, P., Liu, P., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Anderson, R.G.W., and Herz, J. (2002). Platelet-derived Growth Factor Mediates Tyrosine Phosphorylation of the Cytoplasmic Domain of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein in Caveolae. *J. Biol. Chem.* *277*, 15507–15513.

Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W.-P., Anderson, R.G.W., and Herz, J. (2003). LRP: Role in Vascular Wall Integrity and Protection from Atherosclerosis. *Science* 300, 329–332.

Boucher, P., Li, W.-P., Matz, R.L., Takayama, Y., Auwerx, J., Anderson, R.G.W., and Herz, J. (2007). LRP1 Functions as an Atheroprotective Integrator of TGF β and PDGF Signals in the Vascular Wall: Implications for Marfan Syndrome. *PLoS ONE* 2, e448.

Bovenschen, N., Herz, J., Grimbergen, J.M., Lenting, P.J., Havekes, L.M., Mertens, K., and Vlijmen, B.J.M. van (2003). Elevated plasma factor VIII in a mouse model of low-density lipoprotein receptor–related protein deficiency. *Blood* 101, 3933–3939.

Bradley, E.W., and Drissi, M.H. (2010). WNT5A regulates chondrocyte differentiation through differential use of the CaN/NFAT and IKK/NF-kappaB pathways. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 24, 1581–1593.

Brantjes, H., Roose, J., van de Wetering, M., and Clevers, H. (2001). All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res.* 29, 1410–1419.

Briggs, M.R., Yokoyama, C., Wang, X., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1993). Nuclear protein that binds sterol regulatory element of low density lipoprotein receptor promoter. I. Identification of the protein and delineation of its target nucleotide sequence. *J. Biol. Chem.* 268, 14490–14496.

Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.-H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O.F., et al. (1999). Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* 22, 336–345.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1976). Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. *Science* 191, 150–154.

Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 11041–11048.

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.

Brown, A.J., Sun, L., Feramisco, J.D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2002a). Cholesterol Addition to ER Membranes Alters Conformation of SCAP, the SREBP Escort Protein that Regulates Cholesterol Metabolism. *Mol. Cell* 10, 237–245.

Brown, G., Albers, J.J., Fisher, L.D., Schaefer, S.M., Lin, J.T., Kaplan, C., Zhao, X.Q., Bisson, B.D., Fitzpatrick, V.F., and Dodge, H.T. (1990). Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N. Engl. J. Med.* 323, 1289–1298.

Brown, M.L., Yui, K., Smith, J.D., LeBoeuf, R.C., Weng, W., Umeda, P.K., Li, R., Song, R., Gianturco, S.H., and Bradley, W.A. (2002b). The murine macrophage apoB-48 receptor gene (Apob-48r) homology to the human receptor. *J. Lipid Res.* 43, 1181–1191.

Brown, M.S., Herz, J., and Goldstein, J.L. (1997). LDL-receptor structure: Calcium cages, acid baths and recycling receptors. *Nature* 388, 629–630.

Browning, J.D., and Horton, J.D. (2010). Fasting reduces plasma proprotein convertase, subtilisin/kexin type 9 and cholesterol biosynthesis in humans. *J. Lipid Res.* 51, 3359–3363.

Brunham, L.R., Singaraja, R.R., Duong, M., Timmins, J.M., Fievet, C., Bissada, N., Kang, M.H., Samra, A., Fruchart, J.-C., McManus, B., et al. (2009). Tissue-Specific Roles of ABCA1 Influence Susceptibility to Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 548–554.

Burke, A.P., Farb, A., Malcom, G.T., Liang, Y., Smialek, J., and Virmani, R. (1997). Coronary Risk Factors and Plaque Morphology in Men with Coronary Disease Who Died Suddenly. *N. Engl. J. Med.* 336, 1276–1282.

Cai, H., and Harrison, D.G. (2000). Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. *Circ. Res.* 87, 840–844.

Cal, R., Castellano, J., Revuelta-López, E., Aledo, R., Barriga, M., Farré, J., Vilahur, G., Nasarre, L., Hove-Madsen, L., Badimon, L., et al. (2012). Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates hypoxia-induced very low density lipoprotein-cholesteryl ester uptake and accumulation in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* 94, 469–479.

Calling, S., Ji, J., Sundquist, J., Sundquist, K., and Zöller, B. (2013). Shared and non-shared familial susceptibility of coronary heart disease, ischemic stroke, peripheral artery disease and aortic disease. *Int. J. Cardiol.* 168, 2844–2850.

Candela, P., Saint-Pol, J., Kuntz, M., Boucau, M.-C., Lamartiniere, Y., Gosselet, F., and Fenart, L. (2015). In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: Focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. *Brain Res.* 1594, 15–26.

Carmena, R., Duriez, P., and Fruchart, J.-C. (2004). Atherogenic Lipoprotein Particles in Atherosclerosis. *Circulation* 109, III-2-III-7.

Caro, C.G., Fitz-Gerald, J.M., and Schroter, R.C. (1969). Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man. *Nature* 223, 1159–1160.

Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PF, Abbott RD, Kalousdian S, and Kannel WB (1986). Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels: The framingham study. *JAMA* 256, 2835–2838.

Castro, G.R., and Fielding, C.J. (1988). Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry (Mosc.)* 27, 25–29.

Cawthorn, W.P., Bree, A.J., Yao, Y., Du, B., Hemati, N., Martinez-Santibañez, G., and MacDougald, O.A. (2012). Wnt6, Wnt10a and Wnt10b inhibit adipogenesis and stimulate osteoblastogenesis through a β -catenin-dependent mechanism. *Bone* 50, 477–489.

Chang, C.C.Y., Sakashita, N., Ornvold, K., Lee, O., Chang, E.T., Dong, R., Lin, S., Lee, C.-Y.G., Strom, S., Kashyap, R., et al. (2000). Immunological Quantitation and Localization of ACAT-1 and ACAT-2 in Human Liver and Small Intestine. *J. Biol. Chem.*

Chang, T.-Y., Li, B.-L., Chang, C.C.Y., and Urano, Y. (2009). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 297, E1–E9.

- Cheng, C., Smith, S.K., and Charnock-Jones, D.S. (2003). Wnt-1 signaling inhibits human umbilical vein endothelial cell proliferation and alters cell morphology. *Exp. Cell Res.* 291, 415–425.
- Cheng, C., Yeh, J., Fan, T.-P., Smith, S.K., and Charnock-Jones, D.S. (2008). Wnt5a-mediated non-canonical Wnt signalling regulates human endothelial cell proliferation and migration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365, 285–290.
- Chiang, J.Y.L., Kimmel, R., and Stroup, D. (2001). Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR α). *Gene* 262, 257–265.
- Choi, H.Y., Rahmani, M., Wong, B.W., Allahverdian, S., McManus, B.M., Pickering, J.G., Chan, T., and Francis, G.A. (2009). ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression and Apolipoprotein A-I Binding Are Impaired in Intima-Type Arterial Smooth Muscle Cells. *Circulation* 119, 3223–3231.
- Choi, S.-E., Jang, H.-J., Kang, Y., Jung, J.G., Han, S.J., Kim, H.J., Kim, D.J., and Lee, K.-W. (2010). Atherosclerosis induced by a high-fat diet is alleviated by lithium chloride via reduction of VCAM expression in ApoE-deficient mice. *Vascul. Pharmacol.* 53, 264–272.
- Chowdhury, S.M., Zhu, X., Aloor, J.J., Azzam, K.M., Gabor, K.A., Ge, W., Addo, K.A., Tomer, K.B., Parks, J.S., and Fessler, M.B. (2015). Proteomic analysis of ABCA1-null macrophages reveals a role for stomatin like protein-2 in raft composition and Toll like Receptor signaling. *Mol. Cell. Proteomics* mcp.M114.045179.
- Christman, M.A., Goetz, D.J., Dickerson, E., McCall, K.D., Lewis, C.J., Benencia, F., Silver, M.J., Kohn, L.D., and Malgor, R. (2008). Wnt5a is expressed in murine and human atherosclerotic lesions. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 294, H2864–H2870.
- Christodoulides, C., Lagathu, C., Sethi, J.K., and Vidal-Puig, A. (2009). Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol. Metab.* 20, 16–24.
- 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.
- Clarke, M.C.H., Littlewood, T.D., Figg, N., Maguire, J.J., Davenport, A.P., Goddard, M., and Bennett, M.R. (2008). Chronic Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Accelerates Atherosclerosis and Promotes Calcification and Medial Degeneration. *Circ. Res.* 102, 1529–1538.
- Cohen, P., and Goedert, M. (2004). GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 479–487.
- Collot-Teixeira, S., Martin, J., McDermott-Roe, C., Poston, R., and McGregor, J.L. (2007). CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 75, 468–477.
- Cooper, A.D. (1997). Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J. Lipid Res.* 38, 2173–2192.
- Cooper, G.M. (2000). Structure of the Plasma Membrane.

- Correll, C.C., and Edwards, P.A. (1994). Mevalonic acid-dependent degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 269, 633–638.
- Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A.R. (2000). Sterol-dependent transactivation of the human ABC1 promoter by LXR/RXR. *J. Biol. Chem.*
- Costet, P., Lalanne, F., Gerbod-Giannone, M.C., Molina, J.R., Fu, X., Lund, E.G., Gudas, L.J., and Tall, A.R. (2003). Retinoic Acid Receptor-Mediated Induction of ABCA1 in Macrophages. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7756–7766.
- Crowther, M., Goodall, S., Jones, J.L., Bell, P.R.F., and Thompson, M.M. (2000). Increased matrix metalloproteinase 2 expression in vascular smooth muscle cells cultured from abdominal aortic aneurysms. *J. Vasc. Surg.* 32, 575–583.
- Cruciat, C.-M., and Niehrs, C. (2013). Secreted and Transmembrane Wnt Inhibitors and Activators. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a015081.
- Daniels, D.L., and Weis, W.I. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 364–371.
- Davies, M. (2000). The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 83, 361–366.
- Davies, M.J., Richardson, P.D., Woolf, N., Katz, D.R., and Mann, J. (1993). Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br. Heart J.* 69, 377–381.
- Davignon, J., and Ganz, P. (2004). Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation* 109, III-27-III-32.
- Davis, C.G., Goldstein, J.L., Südhof, T.C., Anderson, R.G.W., Russell, D.W., and Brown, M.S. (1987). Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* 326, 760–765.
- De, A. (2011). Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 43, 745–756.
- Deanfield, J.E., Halcox, J.P., and Rabelink, T.J. (2007). Endothelial Function and Dysfunction Testing and Clinical Relevance. *Circulation* 115, 1285–1295.
- Dedoussis, G.V.Z., Schmidt, H., and Genschel, J. (2004). LDL-receptor mutations in Europe. *Hum. Mutat.* 24, 443–459.
- DeMali, K.A., Whiteford, C.C., Ulug, E.T., and Kazlauskas, A. (1997). Platelet-derived Growth Factor-dependent Cellular Transformation Requires Either Phospholipase C γ or Phosphatidylinositol 3 Kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 9011–9018.
- Diffenderfer, M.R., and Schaefer, E.J. (2014). The composition and metabolism of large and small LDL. *Curr. Opin. Lipidol.* 25, 221–226.

Dobrosotskaya, I.Y., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Rawson, R.B. (2003). Reconstitution of sterol-regulated endoplasmic reticulum-to-Golgi transport of SREBP-2 in insect cells by co-expression of mammalian SCAP and Insigs. *J. Biol. Chem.* 278, 35837–35843.

Doran, A.C., Meller, N., and McNamara, C.A. (2008). Role of Smooth Muscle Cells in the Initiation and Early Progression of Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 812–819.

Dubuc, G., Chamberland, A., Wassef, H., Davignon, J., Seidah, N.G., Bernier, L., and Prat, A. (2004). Statins upregulate PCSK9, the gene encoding the proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase-1 implicated in familial hypercholesterolemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1454–1459.

Eddington, H., Sinha, S., and Kalra, P.A. (2009). Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease: A Clinical Review. *J. Ren. Care* 35, 45–50.

Edwards, P.A., Kennedy, M.A., and Mak, P.A. (2002). LXRs; Oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis. *Vascul. Pharmacol.* 38, 249–256.

Emonard, H., Bellon, G., de Diesbach, P., Mettlen, M., Hornebeck, W., and Courtoy, P.J. (2005). Regulation of matrix metalloproteinase (MMP) activity by the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP). A new function for an “old friend.” *Biochimie* 87, 369–376.

Emonard, H., Théret, L., Bennasroune, A.H., and Dedieu, S. (2014). Regulation of LRP-1 expression: Make the point. *Pathol. Biol.* 62, 84–90.

Engel, T., Bode, G., Lucken, A., Knop, M., Kannenberg, F., Nofer, J.-R., Assmann, G., and Seedorf, U. (2006). Expression and functional characterization of ABCG1 splice variant ABCG1(666). *FEBS Lett.* 580, 4551–4559.

Engelking, L.J., Kuriyama, H., Hammer, R.E., Horton, J.D., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Liang, G. (2004). Overexpression of Insig-1 in the livers of transgenic mice inhibits SREBP processing and reduces insulin-stimulated lipogenesis. *J. Clin. Invest.* 113, 1168–1175.

Espirito Santo, S.M.S., Pires, N.M.M., Boesten, L.S.M., Gerritsen, G., Bovenschen, N., van Dijk, K.W., Jukema, J.W., Princen, H.M.G., Bensadoun, A., Li, W.-P., et al. (2004). Hepatic low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency in mice increases atherosclerosis independent of plasma cholesterol. *Blood* 103, 3777–3782.

Ezan, J., Leroux, L., Barandon, L., Dufourcq, P., Jaspard, B., Moreau, C., Allières, C., Daret, D., Couffignal, T., and Dupl  , C. (2004). FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo. *Cardiovasc. Res.* 63, 731–738.

Falk, E., Shah, P.K., and Fuster, V. (1995). Coronary Plaque Disruption. *Circulation* 92, 657–671.

Fan, W.-H., and Karnovsky, M.J. (2002). Increased MMP-2 Expression in Connective Tissue Growth Factor Over-expression Vascular Smooth Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 277, 9800–9805.

Fan, W.-H., Pech, M., and Karnovsky, M.J. (2000). Connective tissue growth factor (CTGF) stimulates vascular smooth muscle cell growth and migration in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 915–923.

Feng, B., and Tabas, I. (2002). ABCA1-mediated Cholesterol Efflux Is Defective in Free Cholesterol-loaded Macrophages MECHANISM INVOLVES ENHANCED ABCA1 DEGRADATION IN A PROCESS REQUIRING FULL NPC1 ACTIVITY. *J. Biol. Chem.* 277, 43271–43280.

Feramisco, J.D., Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Reitz, J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2005). Intramembrane aspartic acid in SCAP protein governs cholesterol-induced conformational change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3242–3247.

Fernández-Hernando, C., and Moore, K.J. (2011). miRNA Modulation of Cholesterol Homeostasis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2378–2382.

Fernández-Hernando, C., Suárez, Y., Rayner, K.J., and Moore, K.J. (2011). MicroRNAs in lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 22, 86–92.

Ferré, P., and Foufelle, F. (2010). Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes. Metab.* 12, 83–92.

Finn, A.V., Nakano, M., Narula, J., Kolodgie, F.D., and Virmani, R. (2010). Concept of Vulnerable/Unstable Plaque. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1282–1292.

Fishbein, M.C., and Siegel, R.J. (1996). How Big Are Coronary Atherosclerotic Plaques That Rupture? *Circulation* 94, 2662–2666.

Fisher, C., Abdul-Aziz, D., and Blacklow, S.C. (2004). A Two-Module Region of the Low-Density Lipoprotein Receptor Sufficient for Formation of Complexes with Apolipoprotein E Ligands†. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 1037–1044.

Fukao, H., and Matsuo, O. (2000). Antithrombotic regulation in human endothelial cells by fibrinolytic factors. *Semin. Thromb. Hemost.* 26, 33–38.

Gaëta, B.A., Borthwick, I., and Stanley, K.K. (1994). The 5'-flanking region of the α 2MR/LRP gene contains an enhancer-like cluster of Sp1 binding sites. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 1219, 307–313.

Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Lark, M.W., and Libby, P. (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 94, 2493–2503.

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.

Gelissen, I.C., Sharpe, L.J., Sandoval, C., Rao, G., Kockx, M., Kritharides, L., Jessup, W., and Brown, A.J. (2012). Protein kinase A modulates the activity of a major human isoform of ABCG1. *J. Lipid Res.* 53, 2133–2140.

Gerhardt, T., and Ley, K. (2015). Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc. Res.* 107, 321–330.

Gerin, I., Clerbaux, L.-A., Haumont, O., Lanthier, N., Das, A.K., Burant, C.F., Leclercq, I.A., MacDougald, O.A., and Bommer, G.T. (2010). Expression of miR-33 from an SREBP2 Intron Inhibits Cholesterol Export and Fatty Acid Oxidation. *J. Biol. Chem.* 285, 33652–33661.

Gertz, S.D., and Roberts, W.C. (1990). Hemodynamic shear force in rupture of coronary arterial atherosclerotic plaques. *Am. J. Cardiol.* 66, 1368–1372.

Gibbons, G.F., Wiggins, D., Brown, A.-M., and Hebbachi, A.-M. (2004). Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 59–64.

Gimbrone, M.A., Topper, J.N., Nagel, T., Anderson, K.R., and Garcia-Cardena, G. (2000). Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 902, 230–239–240.

Glagov, S., Weisenberg, E., Zarins, C.K., Stankunavicius, R., and Kolettis, G.J. (1987). Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N. Engl. J. Med.* 316, 1371–1375.

Glagov, S., Vito, R., Giddens, D.P., and Zarins, C.K. (1992). Micro-architecture and composition of artery walls: relationship to location, diameter and the distribution of mechanical stress. *J. Hypertens. Suppl. Off. J. Int. Soc. Hypertens.* 10, S101–104.

Go, G., Srivastava, R., Hernandez-Ono, A., Gang, G., Smith, S.B., Booth, C.J., Ginsberg, H.N., and Mani, A. (2014). The Combined Hyperlipidemia Caused by Impaired Wnt-LRP6 signaling is reversed by Wnt3a Rescue. *Cell Metab.* 19, 209–220.

Gofman, J.W., Lindgren, F.T., and Elliott, H. (1949). Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J. Biol. Chem.* 179, 973–979.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343, 425–430.

Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2009). The LDL Receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 431–438.

Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., and Brown, M.S. (2006). Protein Sensors for Membrane Sterols. *Cell* 124, 35–46.

Gomez, D., and Owens, G.K. (2012). Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 95, 156–164.

Gong, Y., Lee, J.N., Lee, P.C.W., Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Ye, J. (2006). Sterol-regulated ubiquitination and degradation of Insig-1 creates a convergent mechanism for feedback control of cholesterol synthesis and uptake. *Cell Metab.* 3, 15–24.

Goodwin, A.M., Kitajewski, J., and D'Amore, P.A. (2007). Wnt1 and Wnt5a affect endothelial proliferation and capillary length; Wnt2 does not. *Growth Factors* 25, 25–32.

Gosselet, F., Candela, P., Sevin, E., Berezowski, V., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2009). Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood–brain barrier: Use of an in vitro model. *Brain Res.* 1249, 34–42.

Gotthardt, M., Trommsdorff, M., Nevitt, M.F., Shelton, J., Richardson, J.A., Stockinger, W., Nimpf, J., and Herz, J. (2000). Interactions of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family with Cytosolic Adaptor and Scaffold Proteins Suggest Diverse Biological Functions in Cellular Communication and Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* 275, 25616–25624.

Gough, P.J., Gomez, I.G., Wille, P.T., and Raines, E.W. (2006). Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J. Clin. Invest.* 116, 59–69.

Grebe, A., and Latz, E. (2013). Cholesterol Crystals and Inflammation. *Curr. Rheumatol. Rep.* 15, 313.

Grumolato, L., Liu, G., Mong, P., Mudbhary, R., Biswas, R., Arroyave, R., Vijayakumar, S., Economides, A.N., and Aaronson, S.A. (2010). Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev.* 24, 2517–2530.

Gu, H., Li, G., Gao, X., Berthiaume, L.G., and Zhang, D. (2013). Characterization of palmitoylation of ATP binding cassette transporter G1: Effect on protein trafficking and function. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1831, 1067–1078.

Gu, H.-M., Wang, F.-Q., and Zhang, D.-W. (2014). Caveolin-1 interacts with ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) and regulates ABCG1-mediated cholesterol efflux. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 847–858.

Guan, G., Dai, P.-H., Osborne, T.F., Kim, J.B., and Shechter, I. (1997). Multiple Sequence Elements are Involved in the Transcriptional Regulation of the Human Squalene Synthase Gene. *J. Biol. Chem.* 272, 10295–10302.

Guyton, J.R., and Klemp, K.F. (1989). The lipid-rich core region of human atherosclerotic fibrous plaques. Prevalence of small lipid droplets and vesicles by electron microscopy. *Am. J. Pathol.* 134, 705–717.

Guyton, J.R., and Klemp, K.F. (1996). Development of the Lipid-Rich Core in Human Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 4–11.

Habas, R., and Dawid, I.B. (2005). Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J. Biol.* 4, 2.

Hahn-Dantona, E., Ruiz, J.F., Bornstein, P., and Strickland, D.K. (2001). The Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Modulates Levels of Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) by Mediating Its Cellular Catabolism. *J. Biol. Chem.* 276, 15498–15503.

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.

Hardwick, S.J., Hegyi, L., Clare, K., Law, N.S., Carpenter, K.L.H., Mitchinson, M.J., and Skepper, J.N. (1996). Apoptosis in Human Monocyte-Macrophages Exposed to Oxidized Low Density Lipoprotein. *J. Pathol.* 179, 294–302.

Hart, M., Concordet, J.-P., Lassot, I., Albert, I., del los Santos, R., Durand, H., Perret, C., Rubinfeld, B., Margottin, F., Benarous, R., et al. (1999). The F-box protein β -TrCP associates with phosphorylated β -catenin and regulates its activity in the cell. *Curr. Biol.* 9, 207–211.

Hartman, J., and Frishman, W.H. (2014). Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. *Cardiol. Rev.* 22, 147–151.

Havel, R.J. (1987). Lipid transport function of lipoproteins in blood plasma. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 253, E1–E5.

Havel, R.J. (1995). Chylomicron remnants: hepatic receptors and metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 6, 312–316.

Hegyi, L., Skepper, J.N., Cary, N.R.B., and Mitchinson, M.J. (1996). Foam Cell Apoptosis and the Development of the Lipid Core of Human Atherosclerosis. *J. Pathol.* 180, 423–429.

Heistad, D.D., Marcus, M.L., Larsen, G.E., and Armstrong, M.L. (1981). Role of vasa vasorum in nourishment of the aortic wall. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 240, H781–H787.

Heldin, C.-H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390, 465–471.

Hennessy, A.A., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Caplice, N., and Stanton, C. (2014). Role of the Gut in Modulating Lipoprotein Metabolism. *Curr. Cardiol. Rep.* 16, 1–12.

Herz, J., and Strickland, D.K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest.* 108, 779–784.

Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H., and Stanley, K.K. (1988). Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* 7, 4119–4127.

Herz, J., Kowal, R.C., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1990). Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J.* 9, 1769–1776.

Herz, J., Goldstein, J.L., Strickland, D.K., Ho, Y.K., and Brown, M.S. (1991). 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/ α 2-macroglobulin receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 21232–21238.

Herz, J., Clouthier, D.E., and Hammer, R.E. (1992). LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 71, 411–421.

Herz, J., Couthier, D.E., and Hammer, R.E. (1993). Correction: LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* 73, 428.

Hofmann, A.F. (1999). Bile Acids: The Good, the Bad, and the Ugly. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod. Jointly Int. Union Physiol. Sci. Am. Physiol. Soc.* 14, 24–29.

Horie, T., Ono, K., Horiguchi, M., Nishi, H., Nakamura, T., Nagao, K., Kinoshita, M., Kuwabara, Y., Marusawa, H., Iwanaga, Y., et al. (2010). MicroRNA-33 encoded by an intron of sterol regulatory element-binding protein 2 (Srebp2) regulates HDL in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 17321–17326.

Horie, T., Baba, O., Kuwabara, Y., Chujo, Y., Watanabe, S., Kinoshita, M., Horiguchi, M., Nakamura, T., Chonabayashi, K., Hishizawa, M., et al. (2012). MicroRNA-33 Deficiency Reduces the Progression of Atherosclerotic Plaque in ApoE^{-/-} Mice. *J. Am. Heart Assoc. Cardiovasc. Cerebrovasc. Dis.* 1.

Horton, J.D., Shimomura, I., Brown, M.S., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., and Shimano, H. (1998). Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest.* 101, 2331–2339.

Hsieh, J.C., Kodjabachian, L., Rebbert, M.L., Rattner, A., Smallwood, P.M., Samos, C.H., Nusse, R., Dawid, I.B., and Nathans, J. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398, 431–436.

Hsieh, V., Kim, M.-J., Gelissen, I.C., Brown, A.J., Sandoval, C., Hallab, J.C., Kockx, M., Traini, M., Jessup, W., and Kritharides, L. (2014). Cellular Cholesterol Regulates Ubiquitination and Degradation of the Cholesterol Export Proteins ABCA1 and ABCG1. *J. Biol. Chem.* 289, 7524–7536.

Hu, L., Boesten, L.S.M., May, P., Herz, J., Bovenschen, N., Huisman, M.V., Berbée, J.F.P., Havekes, L.M., Vlijmen, B.J.M. van, and Tamsma, J.T. (2006). Macrophage Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Deficiency Enhances Atherosclerosis in ApoE/LDLR Double Knockout Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2710–2715.

Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and Wang, X. (1993). SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 11603–11607.

Huang, S.S., Ling, T.-Y., Tseng, W.-F., Huang, Y.-H., Tang, F.-M., Leal, S.M., and Huang, J.S. (2003). Cellular growth inhibition by IGFBP-3 and TGF- β 1 requires LRP-1. *FASEB J.* 17, 2068–2081.

Hulsmans, M., and Holvoet, P. (2010). The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 70–78.

Huo, Y., and Ley, K. (2001). Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol. Scand.* 173, 35–43.

Hurt-Camejo, E., Olsson, U., Wiklund, O., Bondjers, G., and Camejo, G. (1997). Cellular Consequences of the Association of ApoB Lipoproteins With Proteoglycans Potential Contribution to Atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 1011–1017.

Hussain, M.M., Shi, J., and Dreizen, P. (2003). Microsomal triglyceride transfer protein and its role in apoB-lipoprotein assembly. *J. Lipid Res.* 44, 22–32.

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.

Ishibashi, M., Filomenko, R., Rébé, C., Chevriaux, A., Varin, A., Derangère, V., Bessède, G., Gambert, P., Lagrost, L., and Masson, D. (2013). 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, S., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Herz, J., and Burns, D.K. (1994a). Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J. Clin. Invest.* 93, 1885–1893.

Ishibashi, S., Herz, J., Maeda, N., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1994b). The two-receptor model of lipoprotein clearance: tests of the hypothesis in “knockout” mice lacking the low density lipoprotein receptor, apolipoprotein E, or both proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 4431–4435.

Ishigami, M., Swertfeger, D.K., Granholm, N.A., and Hui, D.Y. (1998). Apolipoprotein E Inhibits Platelet-derived Growth Factor-induced Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Proliferation by Suppressing Signal Transduction and Preventing Cell Entry to G1 Phase. *J. Biol. Chem.* 273, 20156–20161.

Istvan, E.S., and Deisenhofer, J. (2001). Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science* 292, 1160–1164.

Janda, C.Y., Waghray, D., Levin, A.M., Thomas, C., and Garcia, K.C. (2012a). Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 337, 59–64.

Janda, C.Y., Waghray, D., Levin, A.M., Thomas, C., and Garcia, K.C. (2012b). Structural basis of Wnt recognition by Frizzled. *Science* 337, 59–64.

Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., and Mangelsdorf, D.J. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α . *Nature* 383, 728–731.

Janowski, B.A., Grogan, M.J., Jones, S.A., Wisely, G.B., Kliewer, S.A., Corey, E.J., and Mangelsdorf, D.J. (1999). Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR α and LXR β . *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 266–271.

Jauhiainen, M., Metso, J., Pahlman, R., Blomqvist, S., Tol, A. van, and Ehnholm, C. (1993). Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion. *J. Biol. Chem.* 268, 4032–4036.

Jensen, H.K. (2002). The molecular genetic basis and diagnosis of familial hypercholesterolemia in Denmark. *Dan. Med. Bull.* 49, 318–345.

- Jeong, H.J., Lee, H.-S., Kim, K.-S., Kim, Y.-K., Yoon, D., and Park, S.W. (2008). Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2. *J. Lipid Res.* *49*, 399–409.
- Jo, Y., Lee, P.C.W., Sguigna, P.V., and DeBose-Boyd, R.A. (2011). Sterol-induced degradation of HMG CoA reductase depends on interplay of two Insigs and two ubiquitin ligases, gp78 and Trc8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 20503–20508.
- Johnson, C., and Galis, Z.S. (2004). Matrix Metalloproteinase-2 and -9 Differentially Regulate Smooth Muscle Cell Migration and Cell-Mediated Collagen Organization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 54–60.
- Jose, J. (2016). Statins and its hepatic effects: Newer data, implications, and changing recommendations. *J. Pharm. Bioallied Sci.* *8*, 23–28.
- Kämmerer, I., Ringseis, R., Biemann, R., Wen, G., and Eder, K. (2011). 13-hydroxy linoleic acid increases expression of the cholesterol transporters ABCA1, ABCG1 and SR-BI and stimulates apoA-I-dependent cholesterol efflux in RAW264.7 macrophages. *Lipids Health Dis.* *10*, 222.
- Kanai, Y., Wang, D., and Hirokawa, N. (2014). KIF13B enhances the endocytosis of LRP1 by recruiting LRP1 to caveolae. *J. Cell Biol.* *204*, 395–408.
- Kanazawa, A., Tsukada, S., Kamiyama, M., Yanagimoto, T., Nakajima, M., and Maeda, S. (2005). Wnt5b partially inhibits canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway and promotes adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *330*, 505–510.
- Kanekiyo, T., and Bu, G. (2014). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- β clearance in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* *6*.
- Kast-Woelbern, H.R., Dana, S.L., Cesario, R.M., Sun, L., Grandpre, L.Y. de, Brooks, M.E., Osburn, D.L., Reifel-Miller, A., Klausning, K., and Leibowitz, M.D. (2004). Rosiglitazone Induction of Insig-1 in White Adipose Tissue Reveals a Novel Interplay of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ and Sterol Regulatory Element-binding Protein in the Regulation of Adipogenesis. *J. Biol. Chem.* *279*, 23908–23915.
- Katoh (2009). Transcriptional mechanisms of WNT5A based on NF- κ B, Hedgehog, TGF β , and Notch signaling cascades. *Int. J. Mol. Med.* *23*.
- Kennedy, M.A., Venkateswaran, A., Tarr, P.T., Xenarios, I., Kudoh, J., Shimizu, N., and Edwards, P.A. (2001). Characterization of the Human ABCG1 Gene LIVER X RECEPTOR ACTIVATES AN INTERNAL PROMOTER THAT PRODUCES A NOVEL TRANSCRIPT ENCODING AN ALTERNATIVE FORM OF THE PROTEIN. *J. Biol. Chem.* *276*, 39438–39447.
- Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldán, Á., 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.
- Kim, J., Kim, J., Kim, D.W., Ha, Y., Ihm, M.H., Kim, H., Song, K., and Lee, I. (2010). Wnt5a Induces Endothelial Inflammation via β -Catenin-Independent Signaling. *J. Immunol.* *185*, 1274–1282.

Kim, J., Chang, W., Jung, Y., Song, K., and Lee, I. (2012). Wnt5a activates THP-1 monocytic cells via a β -catenin-independent pathway involving JNK and NF- κ B activation. *Cytokine* 60, 242–248.

Kim, J., Jang, S.-W., Park, E., Oh, M., Park, S., and Ko, J. (2014). The role of heat shock protein 90 in migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in the development of atherosclerosis. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 72, 157–167.

Kindel, T., Lee, D.M., and Tso, P. (2010). The mechanism of the formation and secretion of chylomicrons. *Atheroscler. Suppl.* 11, 11–16.

Klag, M.J., Ford, D.E., Mead, L.A., He, J., Whelton, P.K., Liang, K.-Y., and Levine, D.M. (1993). Serum Cholesterol in Young Men and Subsequent Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 328, 313–318.

Kohn, A.D., and Moon, R.T. (2005). Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* 38, 439–446.

Kolovou, G., Anagnostopoulou, K., Mikhailidis, D., and Cokkinos, D. (2008). Apolipoprotein E Knockout Models. *Curr. Pharm. Des.* 14, 338–351.

Komekado, H., Yamamoto, H., Chiba, T., and Kikuchi, A. (2007). Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes Cells* 12, 521–534.

Komiya, Y., and Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 4, 68–75.

Kovacic, S., and Bakran, M. (2012). Genetic Susceptibility to Atherosclerosis. *Stroke Res. Treat.* 2012, e362941.

Kowal, R.C., Herz, J., Goldstein, J.L., Esser, V., and Brown, M.S. (1989). Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 5810–5814.

Krause, B.R., and Hartman, A.D. (1984). Adipose tissue and cholesterol metabolism. *J. Lipid Res.* 25, 97–110.

Kumawat, K., Menzen, M.H., Bos, I.S.T., Baarsma, H.A., Borger, P., Roth, M., Tamm, M., Halayko, A.J., Simoons, M., Prins, A., et al. (2013). Noncanonical WNT-5A signaling regulates TGF- β -induced extracellular matrix production by airway smooth muscle cells. *FASEB J.* 27, 1631–1643.

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.

Kurayoshi, M., Yamamoto, H., Izumi, S., and Kikuchi, A. (2007). Post-translational palmitoylation and glycosylation of Wnt-5a are necessary for its signalling. *Biochem. J.* 402, 515–523.

Kütt, H., Herz, J., and Stanley, K.K. (1989). Structure of the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) promoter. *Biochim. Biophys. Acta* 1009, 229–236.

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.

Lagace, T.A. (2014). PCSK9 and LDLR degradation: regulatory mechanisms in circulation and in cells. *Curr. Opin. Lipidol.* 25, 387–393.

Lammers, B., Out, R., Hildebrand, R.B., Quinn, C.M., Williamson, D., Hoekstra, M., Meurs, I., Van Berkel, T.J.C., Jessup, W., and Van Eck, M. (2009). Independent protective roles for macrophage Abcg1 and Apoe in the atherosclerotic lesion development. *Atherosclerosis* 205, 420–426.

Landry, Y.D., Denis, M., Nandi, S., Bell, S., Vaughan, A.M., and Zha, X. (2006). ATP-binding Cassette Transporter A1 Expression Disrupts Raft Membrane Microdomains through Its ATPase-related Functions. *J. Biol. Chem.* 281, 36091–36101.

Langmann, T., Porsch-Özcürümez, M., Heimerl, S., Probst, M., Moehle, C., Taher, M., Borsukova, H., Kielar, D., Kaminski, W.E., Dittrich-Wengenroth, E., et al. (2002). Identification of Sterol-independent Regulatory Elements in the Human ATP-binding Cassette Transporter A1 Promoter ROLE OF Sp1/3, E-BOX BINDING FACTORS, AND AN ONCOSTATIN M-RESPONSIVE ELEMENT. *J. Biol. Chem.* 277, 14443–14450.

Larrede, S., Quinn, C.M., Jessup, W., Frisdal, E., Olivier, M., Hsieh, V., Kim, M.-J., Eck, M.V., 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.

Law, M.R., Wald, N.J., and Rudnicka, A.R. (2003). Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 326, 1423.

Lawn, R.M., Wade, D.P., Couse, T.L., and Wilcox, J.N. (2001). Localization of Human ATP-Binding Cassette Transporter 1 (ABC1) in Normal and Atherosclerotic Tissues. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 378–385.

Leal, S.M., Liu, Q., Huang, S.S., and Huang, J.S. (1997). The Type V Transforming Growth Factor β Receptor Is the Putative Insulin-like Growth Factor-binding Protein 3 Receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 20572–20576.

Lee, J.N., Song, B., DeBose-Boyd, R.A., and Ye, J. (2006). Sterol-regulated Degradation of Insig-1 Mediated by the Membrane-bound Ubiquitin Ligase gp78. *J. Biol. Chem.* 281, 39308–39315.

Lee, O., Chang, C.C.Y., Lee, W., and Chang, T.-Y. (1998). Immunodepletion experiments suggest that acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) protein plays a major catalytic role in adult human liver, adrenal gland, macrophages, and kidney, but not in intestines. *J. Lipid Res.* 39, 1722–1727.

Lee, S.J., Sekimoto, T., Yamashita, E., Nagoshi, E., Nakagawa, A., Imamoto, N., Yoshimura, M., Sakai, H., Chong, K.T., Tsukihara, T., et al. (2003). The Structure of Importin- β Bound to SREBP-2: Nuclear Import of a Transcription Factor. *Science* 302, 1571–1575.

Lehto, M., and Olkkonen, V.M. (2003). The OSBP-related proteins: a novel protein family involved in vesicle transport, cellular lipid metabolism, and cell signalling. *Biochim. Biophys. Acta* 1631, 1–11.

Lewis, B. (1973). Classification of lipoproteins and lipoprotein disorders. *J. Clin. Pathol. Suppl. Clin Path* 5, 26–31.

Li, D., Zhang, Y., Ma, J., Ling, W., and Xia, M. (2010). Adenosine Monophosphate Activated Protein Kinase Regulates ABCG1-Mediated Oxysterol Efflux From Endothelial Cells and Protects Against Hypercholesterolemia-Induced Endothelial Dysfunction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 1354–1362.

Li, X., Li, Y., Yang, W., Xiao, C., Fu, S., Deng, Q., Ding, H., Wang, Z., Liu, G., and Li, X. (2014). SREBP-1c overexpression induces triglycerides accumulation through increasing lipid synthesis and decreasing lipid oxidation and VLDL assembly in bovine hepatocytes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143, 174–182.

Li, Z., Li, L., Zielke, H.R., Cheng, L., Xiao, R., Crow, M.T., Stetler-Stevenson, W.G., Froehlich, J., and Lakatta, E.G. (1996). Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.* 148, 121–128.

Lillis, A.P., Van Duyn, L.B., Murphy-Ullrich, J.E., and Strickland, D.K. (2008). The low density lipoprotein receptor-related protein 1: Unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol. Rev.* 88, 887–918.

Lillis, A.P., Muratoglu, S.C., Au, D.T., Migliorini, M., Lee, M.-J., Fried, S.K., Mikhailenko, I., and Strickland, D.K. (2015). LDL Receptor-Related Protein-1 (LRP1) Regulates Cholesterol Accumulation in Macrophages. *PLoS ONE* 10, e0128903.

Liu, G., Vijayakumar, S., Grumolato, L., Arroyave, R., Qiao, H., Akiri, G., and Aaronson, S.A. (2009). Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells. *J. Cell Biol.* 185, 67–75.

Llorente-Cortés, V., Martínez-González, J., and Badimon, L. (2000). LDL Receptor-Related Protein Mediates Uptake of Aggregated LDL in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1572–1579.

Llorente-Cortés, V., Costales, P., Bernués, J., Camino-Lopez, S., and Badimon, L. (2006). Sterol Regulatory Element-binding Protein-2 Negatively Regulates Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Transcription. *J. Mol. Biol.* 359, 950–960.

Llorente-Cortés, V., Royo, T., Otero-Viñas, M., Berrozpe, M., and Badimon, L. (2007). Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein (LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages. *Cardiovasc. Res.* 74, 526–536.

- Longo, K.A., Wright, W.S., Kang, S., Gerin, I., Chiang, S.-H., Lucas, P.C., Opp, M.R., and MacDougald, O.A. (2004). Wnt10b Inhibits Development of White and Brown Adipose Tissues. *J. Biol. Chem.* 279, 35503–35509.
- Lorkowski, S., Rust, S., Engel, T., Jung, E., Tegelkamp, K., Galinski, E.A., Assmann, G., and Cullen, P. (2001). Genomic Sequence and Structure of the Human ABCG1 (ABC8) Gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280, 121–131.
- Loukinova, E., Ranganathan, S., Kuznetsov, S., Gorlatova, N., Migliorini, M.M., Loukinov, D., Ulery, P.G., Mikhailenko, I., Lawrence, D.A., and Strickland, D.K. (2002). Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-induced Tyrosine Phosphorylation of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) EVIDENCE FOR INTEGRATED CO-RECEPTOR FUNCTION BETWEEN LRP AND THE PDGF. *J. Biol. Chem.* 277, 15499–15506.
- Lundberg, B. (1985). Chemical composition and physical state of lipid deposits in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 56, 93–110.
- Lüscher, T.F., and Barton, M. (1997). Biology of the endothelium. *Clin. Cardiol.* 20, II-3-10.
- Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233–241.
- Lyon, C., Mill, C., Tsaousi, A., Williams, H., and George, S. (2011). Regulation of VSMC behavior by the cadherin-catenin complex. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 16, 644–657.
- Ma, A.Z.S., Song, Z.Y., and Zhang, Q. (2014). Cholesterol efflux is LXRA isoform-dependent in human macrophages. *BMC Cardiovasc. Disord.* 14, 80.
- MacDonald, B.T., and He, X. (2012). Frizzled and LRP5/6 Receptors for Wnt/ β -Catenin Signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a007880.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17, 9–26.
- Mahley, R.W., Innerarity, T.L., Rall, S.C., and Weisgraber, K.H. (1984). Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* 25, 1277–1294.
- Maiolino, G., Rossitto, G., Caielli, P., Bisogni, V., Rossi, G.P., and Calò, L.A. (2013). The Role of Oxidized Low-Density Lipoproteins in Atherosclerosis: The Myths and the Facts. *Mediators Inflamm.* 2013.
- Malden, L.T., Chait, A., Raines, E.W., and Ross, R. (1991). The influence of oxidatively modified low density lipoproteins on expression of platelet-derived growth factor by human monocyte-derived macrophages. *J. Biol. Chem.* 266, 13901–13907.
- Malgor, R., Bhatt, P.M., Connolly, B.A., Jacoby, D.L., Feldmann, K.J., Silver, M.J., Nakazawa, M., McCall, K.D., and Goetz, D.J. (2013). Wnt5a, TLR2 and TLR4 are elevated in advanced human atherosclerotic lesions. *Inflamm. Res.* 63, 277–285.
- Malinauskas, T., Aricescu, A.R., Lu, W., Siebold, C., and Jones, E.Y. (2011). Modular mechanism of Wnt signaling inhibition by Wnt inhibitory factor 1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 886–893.

- Mansi, I., Frei, C.R., Wang, C.-P., and Mortensen, E.M. (2015). Statins and New-Onset Diabetes Mellitus and Diabetic Complications: A Retrospective Cohort Study of US Healthy Adults. *J. Gen. Intern. Med.* *30*, 1599–1610.
- Maor, I., Hayek, T., Coleman, R., and Aviram, M. (1997). Plasma LDL Oxidation Leads to Its Aggregation in the Atherosclerotic Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *17*, 2995–3005.
- Martin, S.S., Gosch, K., Kulkarni, K.R., Spertus, J.A., Mathews, R., Ho, P.M., Maddox, T.M., Newby, L.K., Alexander, K.P., and Wang, T.Y. (2013). Modifiable factors associated with failure to attain low-density lipoprotein cholesterol goal at 6 months after acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* *165*, 26–33.e3.
- Masckauchán, T.N.H., Agalliu, D., Vorontchikhina, M., Ahn, A., Parmalee, N.L., Li, C.-M., Khoo, A., Tycko, B., Brown, A.M.C., and Kitajewski, J. (2006). Wnt5a Signaling Induces Proliferation and Survival of Endothelial Cells In Vitro and Expression of MMP-1 and Tie-2. *Mol. Biol. Cell* *17*, 5163–5172.
- Matthijs Blankesteijn, W., and Hermans, K.C.M. Wnt signaling in atherosclerosis. *Eur. J. Pharmacol.*
- May, P., Bock, H.H., Nimpf, J., and Herz, J. (2003). Differential Glycosylation Regulates Processing of Lipoprotein Receptors by γ -Secretase. *J. Biol. Chem.* *278*, 37386–37392.
- McKenney, J.M., Koren, M.J., Kereiakes, D.J., Hanotin, C., Ferrand, A.-C., and Stein, E.A. (2012). Safety and efficacy of a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease, SAR236553/REGN727, in patients with primary hypercholesterolemia receiving ongoing stable atorvastatin therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* *59*, 2344–2353.
- McNeish, J., Aiello, R.J., Guyot, D., Turi, T., Gabel, C., Aldinger, C., Hoppe, K.L., Roach, M.L., Royer, L.J., de Wet, J., et al. (2000). High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 4245–4250.
- Merten, D. med M., and Thiagarajan, P. (2004). P-selectin in arterial thrombosis. *Z. Für Kardiologie* *93*, 855–863.
- Mestas, J., and Ley, K. (2008). Monocyte-Endothelial Cell Interactions in the Development of Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* *18*, 228–232.
- 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.
- Mikels, A.J., and Nusse, R. (2006a). Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* *25*, 7461–7468.
- Mikels, A.J., and Nusse, R. (2006b). Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* *4*, e115.

- Mikhailenko, I., Considine, W., Argraves, K.M., Loukinov, D., Hyman, B.T., and Strickland, D.K. (1999). Functional domains of the very low density lipoprotein receptor: molecular analysis of ligand binding and acid-dependent ligand dissociation mechanisms. *J. Cell Sci.* *112*, 3269–3281.
- Mill, C., Monk, B.A., Williams, H., Simmonds, S.J., Jeremy, J.Y., Johnson, J.L., and George, S.J. (2014). Wnt5a-Induced Wnt1-Inducible Secreted Protein-1 Suppresses Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis Induced by Oxidative Stress. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *34*, 2449–2456.
- Miller, J.R., Hocking, A.M., Brown, J.D., and Moon, R.T. (1999). Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* *18*, 7860–7872.
- Miyazaki, A., Sakashita, N., Lee, O., Takahashi, K., Horiuchi, S., Hakamata, H., Morganelli, P.M., Chang, C.C.Y., and Chang, T.-Y. (1998). Expression of ACAT-1 Protein in Human Atherosclerotic Lesions and Cultured Human Monocytes-Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *18*, 1568–1574.
- Miyoshi, H., Ajima, R., Luo, C.T., Yamaguchi, T.P., and Stappenbeck, T.S. (2012). Wnt5a potentiates TGF- β signaling to promote colonic crypt regeneration after tissue injury. *Science* *338*, 108–113.
- Moestrup, S.K., Gliemann, J., and Pallesen, G. (1992). Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res.* *269*, 375–382.
- Molisse, T.A., Tunick, P.A., and Kronzon, I. (2007). Complications of aortic atherosclerosis: atheroemboli and thromboemboli. *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* *9*, 137–147.
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S., and Heldin, C.-H. (2001). Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J. Cell Sci.* *114*, 4359–4369.
- Muller, J.E. (1999). Circadian variation and triggering of acute coronary events. *Am. Heart J.* *137*, S1–S8.
- Muller, J.E. (2000). Triggering of cardiac events by sexual activity: findings from a case-crossover analysis. *Am. J. Cardiol.* *86*, 14F–18F.
- Mulvihill, E.R., Jaeger, J., Sengupta, R., Ruzzo, W.L., Reimer, C., Lukito, S., and Schwartz, S.M. (2004). Atherosclerotic Plaque Smooth Muscle Cells Have a Distinct Phenotype. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 1283–1289.
- Nahrendorf, M., and Swirski, F.K. (2015). Lifestyle effects on hematopoiesis and atherosclerosis. *Circ. Res.* *116*, 884–894.
- Najafi-Shoushtari, S.H., Kristo, F., Li, Y., Shioda, T., Cohen, D.E., Gerszten, R.E., and Näär, A.M. (2010). MicroRNA-33 and the SREBP Host Genes Cooperate to Control Cholesterol Homeostasis. *Science* *328*, 1566–1569.

Nakajima, K., Nagamine, T., Fujita, M.Q., Ai, M., Tanaka, A., and Schaefer, E. (2014). Apolipoprotein B-48: a unique marker of chylomicron metabolism. *Adv. Clin. Chem.* 64, 117–177.

Nakajima, T., Hamakubo, T., Kodama, T., Inazawa, J., and Emi, M. (1999). Genomic structure and chromosomal mapping of the human sterol regulatory element binding protein (SREBP) cleavage-activating protein (SCAP) gene. *J. Hum. Genet.* 44, 402–407.

Nakamura, K., Kennedy, M.A., Baldán, A., Bojanic, D.D., Lyons, K., and Edwards, P.A. (2004a). Expression and regulation of multiple murine ATP-binding cassette transporter G1 mRNAs/isoforms that stimulate cellular cholesterol efflux to high density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 279, 45980–45989.

Nakamura, K., Kennedy, M.A., Baldán, Á., Bojanic, D.D., Lyons, K., and Edwards, P.A. (2004b). Expression and Regulation of Multiple Murine ATP-binding Cassette Transporter G1 mRNAs/Isoforms That Stimulate Cellular Cholesterol Efflux to High Density Lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 279, 45980–45989.

Nakao, A., Imamura, T., Souchelnytskyi, S., Kawabata, M., Ishisaki, A., Oeda, E., Tamaki, K., Hanai, J., Heldin, C.H., Miyazono, K., et al. (1997). TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *EMBO J.* 16, 5353–5362.

Neels, J.G., Berg, B.M.M. van den, Lookene, A., Olivecrona, G., Pannekoek, H., and Zonneveld, A.-J. van (1999). The Second and Fourth Cluster of Class A Cysteine-rich Repeats of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Share Ligand-binding Properties. *J. Biol. Chem.* 274, 31305–31311.

Nestel, P.J., Havel, R.J., and Bezman, A. (1962). SITES OF INITIAL REMOVAL OF CHYLOMICRON TRIGLYCERIDE FATTY ACIDS FROM THE BLOOD*. *J. Clin. Invest.* 41, 1915–1921.

Nestel, P.J., Whyte, H.M., and Goodman, D.S. (1969). Distribution and turnover of cholesterol in humans. *J. Clin. Invest.* 48, 982–991.

Neufeld, E.B., Remaley, A.T., Demosky, S.J., Stonik, J.A., Cooney, A.M., Comly, M., Dwyer, N.K., Zhang, M., Blanchette-Mackie, J., Santamarina-Fojo, S., et al. (2001). Cellular Localization and Trafficking of the Human ABCA1 Transporter. *J. Biol. Chem.* 276, 27584–27590.

Neufeld, E.B., O'Brien, K., Walts, A.D., Stonik, J.A., Demosky, S.J., Malide, D., Combs, C.A., and Remaley, A.T. (2014). Cellular Localization and Trafficking of the Human ABCG1 Transporter. *Biology* 3, 781–800.

Newby, A.C. (2006). Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc. Res.* 69, 614–624.

Newby, A.C., and Zaltsman, A.B. (1999). Fibrous cap formation or destruction — the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc. Res.* 41, 345–360.

Niesor, E.J., Schwartz, G.G., Perez, A., Stauffer, A., Durrwell, A., Bucklar-Suchankova, G., Benghozi, R., Abt, M., and Kallend, D. (2015). Statin-Induced Decrease in ATP-Binding Cassette Transporter A1 Expression via microRNA33 Induction may Counteract Cholesterol Efflux to High-Density Lipoprotein. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 29, 7–14.

Nimpf, J., and Schneider, W.J. (2000). From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1529, 287–298.

Nishimura, T., Inoue, T., Shibata, N., Sekine, A., Takabe, W., Noguchi, N., and Arai, H. (2005). Inhibition of cholesterol biosynthesis by 25-hydroxycholesterol is independent of OSBP. *Genes Cells* 10, 793–801.

Nishizuka, M., Koyanagi, A., Osada, S., and Imagawa, M. (2008). Wnt4 and Wnt5a promote adipocyte differentiation. *FEBS Lett.* 582, 3201–3205.

Nohturfft, A., DeBose-Boyd, R.A., Scheek, S., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1999). Sterols regulate cycling of SREBP cleavage-activating protein (SCAP) between endoplasmic reticulum and Golgi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 11235–11240.

Oi, K., Hirano, T., Sakai, S., Kawaguchi, Y., and Hosoya, T. (1999). Role of hepatic lipase in intermediate-density lipoprotein and small, dense low-density lipoprotein formation in hemodialysis patients. *Kidney Int. Suppl.* 71, S227–228.

Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N., Takada, R., Kani, S., Ohkawara, B., Koshida, I., Suzuki, K., Yamada, G., Schwabe, G.C., et al. (2003). The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 8, 645–654.

Oliveira, R.B. de, Okazaki, H., Stinghen, A.E.M., Drüeke, T.B., Massy, Z.A., and Jorgetti, V. (2013). Vascular calcification in chronic kidney disease: a review. *J. Bras. Nefrol.* 35, 147–161.

Ono, K., Horie, T., Nishino, T., Baba, O., Kuwabara, Y., and Kimura, T. (2015). MicroRNAs and High-Density Lipoprotein Cholesterol Metabolism. *Int. Heart. J.*

Oram, J.F., and Heinecke, J.W. (2005). ATP-Binding Cassette Transporter A1: A Cell Cholesterol Exporter That Protects Against Cardiovascular Disease. *Physiol. Rev.* 85, 1343–1372.

Oram, J.F., Wolfbauer, G., Vaughan, A.M., Tang, C., and Albers, J.J. (2003). Phospholipid Transfer Protein Interacts with and Stabilizes ATP-binding Cassette Transporter A1 and Enhances Cholesterol Efflux from Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 52379–52385.

Orsó, E., Broccardo, C., Kaminski, W.E., Böttcher, A., Liebisch, G., Drobnik, W., Götz, A., Chambenoit, O., Diederich, W., Langmann, T., et al. (2000). Transport of lipids from Golgi to plasma membrane is defective in Tangier disease patients and Abcl1-deficient mice. *Nat. Genet.* 24, 192–196.

Ory, D.S. (2007). Chylomicrons and Lipoprotein Lipase at the Endothelial Surface: Bound and GAG-ged? *Cell Metab.* 5, 229–231.

OTSUKA, F., SAKAKURA, K., YAHAGI, K., JONER, M., and VIRMANI, R. (2014). Has Our Understanding of Calcification in Human Coronary Atherosclerosis Progressed? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 724–736.

Ou, J., Tu, H., Shan, B., Luk, A., DeBose-Boyd, R.A., Bashmakov, Y., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2001). Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 6027–6032.

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., Hoekstra, M., Habets, K., Meurs, I., Waard, V. de, Hildebrand, R.B., Wang, Y., Chimini, G., Kuiper, J., Berkel, T.J.C.V., et al. (2008). 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.

Overton, C.D., Yancey, P.G., Major, A.S., Linton, M.F., and Fazio, S. (2007). Deletion of Macrophage LDL Receptor-Related Protein Increases Atherogenesis in the Mouse. *Circ. Res.* 100, 670–677.

Ozasa, H., Ayaori, M., Iizuka, M., Terao, Y., Uto-Kondo, H., Yakushiji, E., Takiguchi, S., Nakaya, K., Hisada, T., Uehara, Y., et al. (2011). Pioglitazone enhances cholesterol efflux from macrophages by increasing ABCA1/ABCG1 expressions via PPAR γ /LXR α pathway: Findings from in vitro and ex vivo studies. *Atherosclerosis* 219, 141–150.

Panousis, C.G., Evans, G., and Zuckerman, S.H. (2001). TGF- β increases cholesterol efflux and ABC-1 expression in macrophage-derived foam cells: opposing the effects of IFN- γ . *J. Lipid Res.* 42, 856–863.

Parini, P., Jiang, Z.-Y., Einarsson, C., Eggertsen, G., Zhang, S.-D., Rudel, L.L., Han, T.-Q., and Eriksson, M. (2009). ACAT2 and human hepatic cholesterol metabolism: identification of important gender-related differences in normolipidemic, non-obese Chinese patients. *Atherosclerosis* 207, 266–271.

Park, Y.M. (2014). CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp. Mol. Med.* 46, e99.

Paulsson, M. (1992). Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 27, 93–127.

Phan, C.T., and Tso, P. (2001). Intestinal lipid absorption and transport. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 6, D299–319.

Plenz, G.A.M., Deng, M.C., Robenek, H., and Völker, W. (2003). Vascular collagens: spotlight on the role of type VIII collagen in atherogenesis. *Atherosclerosis* 166, 1–11.

Polakis, P. (2012). Wnt signaling in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.

Polavarapu, R., Gongora, M.C., Yi, H., Ranganathan, S., Lawrence, D.A., Strickland, D., and Yepes, M. (2007). Tissue-type plasminogen activator–mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor–related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood* 109, 3270–3278.

Prattes, S., Horl, G., Hammer, A., Blaschitz, A., Graier, W.F., Sattler, W., Zechner, R., and Steyrer, E. (2000). Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes: triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures. *J. Cell Sci.* 113, 2977–2989.

Proudfoot, D., Skepper, J.N., Hegyi, L., Bennett, M.R., Shanahan, C.M., and Weissberg, P.L. (2000). Apoptosis Regulates Human Vascular Calcification In Vitro Evidence for Initiation of Vascular Calcification by Apoptotic Bodies. *Circ. Res.* 87, 1055–1062.

Proudfoot, D., Davies, J.D., Skepper, J.N., Weissberg, P.L., and Shanahan, C.M. (2002). Acetylated Low-Density Lipoprotein Stimulates Human Vascular Smooth Muscle Cell Calcification by Promoting Osteoblastic Differentiation and Inhibiting Phagocytosis. *Circulation* 106, 3044–3050.

Qin, L., Hu, R., Zhu, N., Yao, H.-L., Lei, X.-Y., Li, S.-X., Liao, D.-F., and Zheng, X.-L. (2014). The novel role and underlying mechanism of Wnt5a in regulating cellular cholesterol accumulation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 41, 671–678.

Quasnicka, H., Slater, S.C., Beeching, C.A., Boehm, M., Sala-Newby, G.B., and George, S.J. (2006). Regulation of Smooth Muscle Cell Proliferation by β -Catenin/T-Cell Factor Signaling Involves Modulation of Cyclin D1 and p21 Expression. *Circ. Res.* 99, 1329–1337.

Raal, F., Scott, R., Somaratne, R., Bridges, I., Li, G., Wasserman, S.M., and Stein, E.A. (2012). Low-density lipoprotein cholesterol-lowering effects of AMG 145, a monoclonal antibody to proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 serine protease in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia: the Reduction of LDL-C with PCSK9 Inhibition in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Disorder (RUTHERFORD) randomized trial. *Circulation* 126, 2408–2417.

Radhakrishnan, A., Sun, L.-P., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2004). Direct Binding of Cholesterol to the Purified Membrane Region of SCAP: Mechanism for a Sterol-Sensing Domain. *Mol. Cell* 15, 259–268.

Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H.J., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 6511–6518.

Raines, E.W., and Ross, R. (1993). Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br. Heart J.* 69, S30–S37.

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.

Rapp, J.H., Connor, W.E., Lin, D.S., Inahara, T., and Porter, J.M. (1983). Lipids of human atherosclerotic plaques and xanthomas: clues to the mechanism of plaque progression. *J. Lipid Res.* 24, 1329–1335.

Rattner, A., Hsieh, J.C., Smallwood, P.M., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Nathans, J. (1997). A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2859–2863.

Rawson, R.B., DeBose-Boyd, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1999). Failure to Cleave Sterol Regulatory Element-binding Proteins (SREBPs) Causes Cholesterol Auxotrophy in Chinese Hamster Ovary Cells with Genetic Absence of SREBP Cleavage-activating Protein. *J. Biol. Chem.* 274, 28549–28556.

Rayner, K.J., Suárez, Y., Dávalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M.L., Tamehiro, N., Fisher, E.A., Moore, K.J., and Fernández-Hernando, C. (2010). MiR-33 Contributes to the Regulation of Cholesterol Homeostasis. *Science* 328, 1570–1573.

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.

Rayner, K.J., Fernández-Hernando, C., and Moore, K.J. (2012). MicroRNAs regulate lipid metabolism in atherogenesis. *Thromb. Haemost.* 107, 642–647.

Reekmans, S.M., Pflanzner, T., Gordts, P.L.S.M., Isbert, S., Zimmermann, P., Annaert, W., Weggen, S., Roebroek, A.J.M., and Pietrzik, C.U. (2010). Inactivation of the proximal NPXY motif impairs early steps in LRP1 biosynthesis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 67, 135–145.

Reitsma, S., Slaaf, D.W., Vink, H., van Zandvoort, M.A.M.J., and oude Egbrink, M.G.A. (2007). The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Arch.* 454, 345–359.

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.

Ridgway, N.D., Dawson, P.A., Ho, Y.K., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1992). Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding. *J. Cell Biol.* 116, 307–319.

Roarty, K., and Serra, R. (2007). Wnt5a is required for proper mammary gland development and TGF- β -mediated inhibition of ductal growth. *Development* 134, 3929–3939.

Róg, T., Vattulainen, I., Jansen, M., Ikonen, E., and Karttunen, M. (2008). Comparison of cholesterol and its direct precursors along the biosynthetic pathway: Effects of cholesterol, desmosterol and 7-dehydrocholesterol on saturated and unsaturated lipid bilayers. *J. Chem. Phys.* 129, 154508.

Rohlmann, A., Gotthardt, M., Hammer, R.E., and Herz, J. (1998). Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J. Clin. Invest.* 101, 689–695.

Ross, R., and Glomset, J.A. (1973). Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 180, 1332–1339.

Ross, S.E., Hemati, N., Longo, K.A., Bennett, C.N., Lucas, P.C., Erickson, R.L., and MacDougald, O.A. (2000). Inhibition of Adipogenesis by Wnt Signaling. *Science* 289, 950–953.

Russell, D.W. (2003). The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 72, 137–174.

Russo, G., Leopold, J.A., and Loscalzo, J. (2002). Vasoactive substances: Nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vascul. Pharmacol.* 38, 259–269.

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.

Sabol, S.L., Brewer, H.B., and Santamarina-Fojo, S. (2005). The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J. Lipid Res.* 46, 2151–2167.

Sagare, A., Deane, R., Bell, R.D., Johnson, B., Hamm, K., Pendu, R., Marky, A., Lenting, P.J., Wu, Z., Zarcone, T., et al. (2007). Clearance of amyloid- β by circulating lipoprotein receptors. *Nat. Med.* 13, 1029–1031.

Sage, A.P., Tintut, Y., and Demer, L.L. (2010). Regulatory Mechanisms in Atherosclerotic Calcification. *Nat. Rev. Cardiol.* 7, 528–536.

Sagripanti, A., and Carpi, A. (2000). Antithrombotic and prothrombotic activities of the vascular endothelium. *Biomed. Pharmacother.* 54, 107–111.

Saito, S., Zempo, N., Yamashita, A., Takenaka, H., Fujioka, K., and Esato, K. (2002). Matrix Metalloproteinase Expressions in Arteriosclerotic Aneurysmal Disease. *Vasc. Endovascular Surg.* 36, 1–7.

Sakashita, N., Miyazaki, A., Chang, C.C.Y., Chang, T.-Y., Kiyota, E., Satoh, M., Komohara, Y., Morganelli, P.M., Horiuchi, S., and Takeya, M. (2003). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) is induced in monocyte-derived macrophages: in vivo and in vitro studies. *Lab. Invest. J. Tech. Methods Pathol.* 83, 1569–1581.

Salvayre, R., Auge, N., Benoist, H., and Negre-Salvayre, A. (2002). Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 213–221.

Sanchez, H.B., Yieh, L., and Osborne, T.F. (1995). Cooperation by Sterol Regulatory Element-binding Protein and Sp1 in Sterol Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Gene. *J. Biol. Chem.* 270, 1161–1169.

- Santamarina-Fojo, S., Peterson, K., Knapper, C., Qiu, Y., Freeman, L., Cheng, J.-F., Osorio, J., Remaley, A., Yang, X.-P., Haudenschild, C., et al. (2000). Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: Analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7987–7992.
- Santamarina-Fojo, S., Remaley, A.T., Neufeld, E.B., and Brewer, H.B. (2001). Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J. Lipid Res.* 42, 1339–1345.
- Sathasivam, S., and Lecky, B. (2008). Statin induced myopathy. *BMJ* 337, a2286.
- Sato, A., Yamamoto, H., Sakane, H., Koyama, H., and Kikuchi, A. (2010). Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J.* 29, 41–54.
- Sato, R., Inoue, J., Kawabe, Y., Kodama, T., Takano, T., and Maeda, M. (1996). Sterol-dependent Transcriptional Regulation of Sterol Regulatory Element-binding Protein-2. *J. Biol. Chem.* 271, 26461–26464.
- Sattar, N., Preiss, D., Murray, H.M., Welsh, P., Buckley, B.M., de Craen, A.J., Seshasai, S.R.K., McMurray, J.J., Freeman, D.J., Jukema, J.W., et al. (2010). Statins and risk of incident diabetes: a collaborative meta-analysis of randomised statin trials. *The Lancet* 375, 735–742.
- Schambony, A., and Wedlich, D. (2007). Wnt-5A/Ror2 regulate expression of XPAPC through an alternative noncanonical signaling pathway. *Dev. Cell* 12, 779–792.
- Schipper, H.S., Prakken, B., Kalkhoven, E., and Boes, M. (2012). Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* TEM 23, 407–415.
- Schleifarth, J.R., Person, A.D., Martinsen, B.J., Sukovich, D.J., Neumann, A., Baker, C.V.H., Lohr, J.L., Cornfield, D.N., Ekker, S.C., and Petryk, A. (2007). Wnt5a Is Required for Cardiac Outflow Tract Septation in Mice. *Pediatr. Res.* 61, 386–391.
- Scott-Burden, T., and Vanhoutte, P.M. (1994). Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors. *Tex. Heart Inst. J.* 21, 91–97.
- Sekiya, M., Osuga, J., 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.
- Sekiya, M., Osuga, J., Igarashi, M., Okazaki, H., and Ishibashi, S. (2011). The Role of Neutral Cholesterol Ester Hydrolysis in Macrophage Foam Cells. *J. Atheroscler. Thromb.* 18, 359–364.
- Sever, N., Yang, T., Brown, M.S., Goldstein, J.L., and DeBose-Boyd, R.A. (2003). Accelerated Degradation of HMG CoA Reductase Mediated by Binding of Insig-1 to Its Sterol-Sensing Domain. *Mol. Cell* 11, 25–33.
- Shah, P.K., Falk, E., Badimon, J.J., Fernandez-Ortiz, A., Mailhac, A., Villareal-Levy, G., Fallon, J.T., Regnstrom, J., and Fuster, V. (1995). Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture. *Circulation* 92, 1565–1569.

Shao, W., and Espenshade, P.J. (2014). Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP) Cleavage Regulates Golgi-to-ER Recycling of SREBP Cleavage Activating Protein (SCAP). *J. Biol. Chem.* jbc.M113.545699.

Shelness, G.S., and Sellers, J.A. (2001). Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr. Opin. Lipidol.* 12, 151–157.

Shyy, Y.J., Hsieh, H.J., Usami, S., and Chien, S. (1994). Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4678–4682.

Siasos, G., Tsigkou, V., Kokkou, E., Oikonomou, E., Vavuranakis, M., Vlachopoulos, C., Verveniatis, A., Limperi, M., Genimata, V., Papavassiliou, A.G., et al. (2014). Smoking and atherosclerosis: mechanisms of disease and new therapeutic approaches. *Curr. Med. Chem.* 21, 3936–3948.

Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572.

Simons, K., and Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 31–39.

Simons, K., and Vaz, W.L.C. (2004). Model Systems, Lipid Rafts, and Cell Membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 269–295.

Singaraja, R.R., Bocher, V., James, E.R., Clee, S.M., Zhang, L.-H., Leavitt, B.R., Tan, B., Brooks-Wilson, A., Kwok, A., Bissada, N., et al. (2001). Human ABCA1 BAC Transgenic Mice Show Increased High Density Lipoprotein Cholesterol and ApoAI-dependent Efflux Stimulated by an Internal Promoter Containing Liver X Receptor Response Elements in Intron 1. *J. Biol. Chem.* 276, 33969–33979.

Singaraja, R.R., Fievet, C., Castro, G., James, E.R., Hennuyer, N., Clee, S.M., Bissada, N., Choy, J.C., Fruchart, J.-C., McManus, B.M., et al. (2002). Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 110, 35–42.

Sinzinger, H., Wolfram, R., and Peskar, B.A. (2002). Muscular side effects of statins. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 40, 163–171.

Skålén, K., Gustafsson, M., Rydberg, E.K., Hultén, L.M., Wiklund, O., Innerarity, T.L., and Borén, J. (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 417, 750–754.

Slusarski, D.C., Yang-Snyder, J., Busa, W.B., and Moon, R.T. (1997a). Modulation of embryonic intracellular Ca²⁺ signaling by Wnt-5A. *Dev. Biol.* 182, 114–120.

Slusarski, D.C., Corces, V.G., and Moon, R.T. (1997b). Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* 390, 410–413.

Smith, J.D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J., and Miyata, M. (1995). Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 8264–8268.

Smith, J.L., Rangaraj, K., Simpson, R., Maclean, D.J., Nathanson, L.K., Stuart, K.A., Scott, S.P., Ramm, G.A., and Jersey, J. de (2004). Quantitative analysis of the expression of ACAT genes in human tissues by real-time PCR. *J. Lipid Res.* *45*, 686–696.

Smolich, B.D., McMahon, J.A., McMahon, A.P., and Papkoff, J. (1993). Wnt family proteins are secreted and associated with the cell surface. *Mol. Biol. Cell* *4*, 1267–1275.

Song, B.-L., Javitt, N.B., and DeBose-Boyd, R.A. (2005a). Insig-mediated degradation of HMG CoA reductase stimulated by lanosterol, an intermediate in the synthesis of cholesterol. *Cell Metab.* *1*, 179–189.

Song, B.-L., Sever, N., and DeBose-Boyd, R.A. (2005b). Gp78, a Membrane-Anchored Ubiquitin Ligase, Associates with Insig-1 and Couples Sterol-Regulated Ubiquitination to Degradation of HMG CoA Reductase. *Mol. Cell* *19*, 829–840.

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. *J. Lipid Res.* *54*, 2174–2184.

Speer, M.Y., Yang, H.-Y., Brabb, T., Leaf, E., Look, A., Lin, W.-L., Frutkin, A., Dichek, D., and Giachelli, C.M. (2009). Smooth Muscle Cells Give Rise to Osteochondrogenic Precursors and Chondrocytes in Calcifying Arteries. *Circ. Res.* *104*, 733–741.

Spence, J.D. (1989). Pathogenesis of atherosclerosis and its complications: effects of antihypertensive drugs. *J. Hum. Hypertens.* *3 Suppl 2*, 63–68.

Stamos, J.L., and Weis, W.I. (2013). The β -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a007898.

Strydom, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *14*, 840–856.

Strydom, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. (1995). A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis A Report From the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *15*, 1512–1531.

Stein, E.A., Gipe, D., Bergeron, J., Gaudet, D., Weiss, R., Dufour, R., Wu, R., and Pordy, R. (2012). Effect of a monoclonal antibody to PCSK9, REGN727/SAR236553, to reduce low-density lipoprotein cholesterol in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia on stable statin dose with or without ezetimibe therapy: a phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* *380*, 29–36.

Steinberg, D. (1987). Lipoproteins and the pathogenesis of atherosclerosis. *Circulation* *76*, 508–514.

Steinberg, D., and Witztum, J.L. (2010). Oxidized Low-Density Lipoprotein and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *30*, 2311–2316.

Steinbrecher, U.P. (1988). Role of superoxide in endothelial-cell modification of low-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* *959*, 20–30.

Steinmetz, A., and Utermann, G. (1985). Activation of lecithin: cholesterol acyltransferase by human apolipoprotein A-IV. *J. Biol. Chem.* *260*, 2258–2264.

Stiko-Rahm, A., Hultgårdh-Nilsson, A., Regnström, J., Hamsten, A., and Nilsson, J. (1992). Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *12*, 1099–1109.

Strickland, D.K., Ashcom, J.D., Williams, S., Burgess, W.H., Migliorini, M., and Argraves, W.S. (1990). Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J. Biol. Chem.* *265*, 17401–17404.

Sturek, J.M., Castle, J.D., Trace, A.P., Page, L.C., Castle, A.M., Evans-Molina, C., Parks, J.S., Mirmira, R.G., and Hedrick, C.C. (2010). An intracellular role for ABCG1-mediated cholesterol transport in the regulated secretory pathway of mouse pancreatic β cells. *J. Clin. Invest.* *120*, 2575–2589.

Su Jung, Y., Young Lee, H., Doo Kim, S., Seong Park, J., Kuk Kim, J., Suh, P.-G., and Bae, Y.-S. (2013). Wnt5a stimulates chemotactic migration and chemokine production in human neutrophils. *Exp. Mol. Med.* *45*, e27.

Südhof, T.C., Westhuyzen, D.R.V. der, Goldstein, J.L., Brown, M.S., and Russell, D.W. (1987). Three direct repeats and a TATA-like sequence are required for regulated expression of the human low density lipoprotein receptor gene. *J. Biol. Chem.* *262*, 10773–10779.

Sun, L.-P., Li, L., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2005). Insig Required for Sterol-mediated Inhibition of Scap/SREBP Binding to COPII Proteins in Vitro. *J. Biol. Chem.* *280*, 26483–26490.

Sun, L.-P., Seemann, J., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2007). Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 6519–6526.

Swertfeger, D.K., Bu, G., and Hui, D.Y. (2002). Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Mediates Apolipoprotein E Inhibition of Smooth Muscle Cell Migration. *J. Biol. Chem.* *277*, 4141–4146.

Tabas, I. (1997). Free Cholesterol-Induced Cytotoxicity: A Possible Contributing Factor to Macrophage Foam Cell Necrosis in Advanced Atherosclerotic Lesions. *Trends Cardiovasc. Med.* *7*, 256–263.

Tabas, I. (2002). Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J. Clin. Invest.* *110*, 905–911.

- Tabas, I. (2005). Consequences and Therapeutic Implications of Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis The Importance of Lesion Stage and Phagocytic Efficiency. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2255–2264.
- Tabas, I., Williams, K.J., and Borén, J. (2007). Subendothelial Lipoprotein Retention as the Initiating Process in Atherosclerosis Update and Therapeutic Implications. *Circulation* 116, 1832–1844.
- Takada, I., Kouzmenko, A.P., and Kato, S. (2009). Wnt and PPAR γ signaling in osteoblastogenesis and adipogenesis. *Nat. Rev. Rheumatol.* 5, 442–447.
- Takada, R., Satomi, Y., Kurata, T., Ueno, N., Norioka, S., Kondoh, H., Takao, T., and Takada, S. (2006). Monounsaturated Fatty Acid Modification of Wnt Protein: Its Role in Wnt Secretion. *Dev. Cell* 11, 791–801.
- Takei, A., Huang, Y., and Lopes-Virella, M.F. (2001). Expression of adhesion molecules by human endothelial cells exposed to oxidized low density lipoprotein: Influences of degree of oxidation and location of oxidized LDL. *Atherosclerosis* 154, 79–86.
- Tall, A.R. (1993). Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J. Lipid Res.* 34, 1255–1274.
- 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.
- Tarling, E.J., and Edwards, P.A. (2012). Dancing with the sterols: Critical roles for ABCG1, ABCA1, miRNAs, and nuclear and cell surface receptors in controlling cellular sterol homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1821, 386–395.
- Taylor, F.R., and Kandutsch, A.A. (1985). Oxysterol binding protein. *Chem. Phys. Lipids* 38, 187–194.
- Temel, R.E., Hou, L., Rudel, L.L., and Shelness, G.S. (2007). ACAT2 stimulates cholesteryl ester secretion in apoB-containing lipoproteins. *J. Lipid Res.* 48, 1618–1627.
- Terasaka, N., Westerterp, M., Koetsveld, J., Fernández-Hernando, C., Yvan-Charvet, L., Wang, N., Sessa, W.C., and Tall, A.R. (2010). ATP-Binding Cassette Transporter G1 and High-Density Lipoprotein Promote Endothelial NO Synthesis Through a Decrease in the Interaction of Caveolin-1 and Endothelial NO Synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2219–2225.
- Terrand, J., Bruban, V., Zhou, L., Gong, W., Asmar, Z.E., May, P., Zurhove, K., Haffner, P., Philippe, C., Woldt, E., et al. (2009). LRP1 Controls Intracellular Cholesterol Storage and Fatty Acid Synthesis through Modulation of Wnt Signaling. *J. Biol. Chem.* 284, 381–388.
- Thompson, R.C., Allam, A.H., Zink, A., Wann, L.S., Lombardi, G.P., Cox, S.L., Frohlich, B., Sutherland, M.L., Sutherland, J.D., Frohlich, T.C., et al. (2014). Computed Tomographic Evidence of Atherosclerosis in the Mummified Remains of Humans From Around the World. *Glob. Heart* 9, 187–196.
- Tian, Y., Cohen, E.D., and Morrissey, E.E. (2010). The Importance of Wnt Signaling in Cardiovascular Development. *Pediatr. Cardiol.* 31, 342–348.

- van Tienen, F.H.J., Laeremans, H., van der Kallen, C.J.H., and Smeets, H.J.M. (2009). Wnt5b stimulates adipogenesis by activating PPARgamma, and inhibiting the beta-catenin dependent Wnt signaling pathway together with Wnt5a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 207–211.
- Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P.J., and Yang, Y. (2003). Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent β -catenin degradation. *J. Cell Biol.* 162, 899–908.
- Topper, J.N., and Gimbrone, M.A. (1999). Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol. Med. Today* 5, 40–46.
- Tousoulis, D., Kampoli, A.-M., Tentolouris Nikolaos Papageorgiou, C., and Stefanadis, C. (2012). The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 10, 4–18.
- Tsai, Y.C., Leichner, G.S., Pearce, M.M.P., Wilson, G.L., Wojcikiewicz, R.J.H., Roitelman, J., and Weissman, A.M. (2012). Differential regulation of HMG-CoA reductase and Insig-1 by enzymes of the ubiquitin-proteasome system. *Mol. Biol. Cell* 23, 4484–4494.
- Tsaousi, A., Williams, H., Lyon, C.A., Taylor, V., Swain, A., Johnson, J.L., and George, S.J. (2011). Wnt4/ β -Catenin Signaling Induces VSMC Proliferation and Is Associated With Intimal Thickening. *Circ. Res.* 108, 427–436.
- Tseng, W.-F., Huang, S.S., and Huang, J.S. (2004). LRP-1/T β R-V mediates TGF- β 1-induced growth inhibition in CHO cells. *FEBS Lett.* 562, 71–78.
- Tu, A.Y., Nishida, H.I., and Nishida, T. (1993). High density lipoprotein conversion mediated by human plasma phospholipid transfer protein. *J. Biol. Chem.* 268, 23098–23105.
- Turitto, V.T., Weiss, H.J., Zimmerman, T.S., and Sussman, I.I. (1985). Factor VIII/von Willebrand factor in subendothelium mediates platelet adhesion. *Blood* 65, 823–831.
- Tuttolomondo, A., Di Raimondo, D., Pecoraro, R., Arnao, V., Pinto, A., and Licata, G. (2012). Atherosclerosis as an inflammatory disease. *Curr. Pharm. Des.* 18, 4266–4288.
- Uelmen, P.J., Oka, K., Sullivan, M., Chang, C.C.Y., Chang, T.Y., and Chan, L. (1995). Tissue-specific Expression and Cholesterol Regulation of Acylcoenzyme A:Cholesterol Acyltransferase (ACAT) in Mice MOLECULAR CLONING OF MOUSE ACAT cDNA, CHROMOSOMAL LOCALIZATION, AND REGULATION OF ACAT IN VIVO AND IN VITRO. *J. Biol. Chem.* 270, 26192–26201.
- d’Uscio, L.V., Baker, T.A., Mantilla, C.B., Smith, L., Weiler, D., Sieck, G.C., and Katusic, Z.S. (2001). Mechanism of Endothelial Dysfunction in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1017–1022.
- Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2005). ABCG1 Redistributes Cell Cholesterol to Domains Removable by High Density Lipoprotein but Not by Lipid-depleted Apolipoproteins. *J. Biol. Chem.* 280, 30150–30157.
- Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2006). ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J. Lipid Res.* 47, 2433–2443.

- Vedhachalam, C., Ghering, A.B., Davidson, W.S., Lund-Katz, S., Rothblat, G.H., and Phillips, M.C. (2007a). ABCA1-Induced Cell Surface Binding Sites for ApoA-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1603–1609.
- Vedhachalam, C., Duong, P.T., Nickel, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Saito, H., Rothblat, G.H., Lund-Katz, S., and Phillips, M.C. (2007b). Mechanism of ATP-binding Cassette Transporter A1-mediated Cellular Lipid Efflux to Apolipoprotein A-I and Formation of High Density Lipoprotein Particles. *J. Biol. Chem.* 282, 25123–25130.
- Veeman, M.T., Axelrod, J.D., and Moon, R.T. (2003). A Second Canon: Functions and Mechanisms of β -Catenin-Independent Wnt Signaling. *Dev. Cell* 5, 367–377.
- Venkateswaran, A., Laffitte, B.A., Joseph, S.B., Mak, P.A., Wilpitz, D.C., Edwards, P.A., and Tontonoz, P. (2000). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12097–12102.
- Virmani, R., Burke, A.P., Farb, A., and Kolodgie, F.D. (2006). Pathology of the Vulnerable Plaque. *J. Am. Coll. Cardiol.* 47, C13–C18.
- Wang, H.D., Rätsep, M.T., Chapman, A., and Boyd, R. (2010). Adventitial fibroblasts in vascular structure and function: the role of oxidative stress and beyond This review is one of a selection of papers published in a Special Issue on Oxidative Stress in Health and Disease. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 88, 177–186.
- Wang, N., Silver, D.L., Thiele, C., and Tall, A.R. (2001). ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) Functions as a Cholesterol Efflux Regulatory Protein. *J. Biol. Chem.* 276, 23742–23747.
- Wang, N., Chen, W., Linsel-Nitschke, P., Martinez, L.O., Agerholm-Larsen, B., Silver, D.L., and Tall, A.R. (2003). A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. *J. Clin. Invest.* 111, 99–107.
- 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.
- Watanabe, Y., Inaba, T., Shimano, H., Gotoda, T., Yamamoto, K., Mokuno, H., Sato, H., Yazaki, Y., and Yamada, N. (1994). Induction of LDL receptor-related protein during the differentiation of monocyte-macrophages. Possible involvement in the atherosclerotic process. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 14, 1000–1006.
- Wellington, C.L., Walker, E.K.Y., Suarez, A., Kwok, A., Bissada, N., Singaraja, R., Yang, Y.-Z., Zhang, L.-H., James, E., Wilson, J.E., et al. (2002). ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 82, 273–283.
- Wentzel, J.J., Chatzizisis, Y.S., Gijzen, F.J.H., Giannoglou, G.D., Feldman, C.L., and Stone, P.H. (2012). Endothelial shear stress in the evolution of coronary atherosclerotic plaque and

vascular remodelling: current understanding and remaining questions. *Cardiovasc. Res.* 96, 234–243.

Westergaard, H., and Dietschy, J.M. (1976). The mechanism whereby bile acid micelles increase the rate of fatty acid and cholesterol uptake into the intestinal mucosal cell. *J. Clin. Invest.* 58, 97–108.

Westerterp, M., Koetsveld, J., Yu, S., Han, S., Li, R., Goldberg, I.J., Welch, C.L., and Tall, A.R. (2010). Increased Atherosclerosis in Mice With Vascular ATP-Binding Cassette Transporter G1 Deficiency—Brief Report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2103–2105.

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.

Wight, T.N. (1989). Cell biology of arterial proteoglycans. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 9, 1–20.

Willert, K., and Nusse, R. (2012). Wnt Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a007864.

Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448–452.

Williams, S.E., Ashcom, J.D., Argraves, W.S., and Strickland, D.K. (1992). A novel mechanism for controlling the activity of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Multiple regulatory sites for 39-kDa receptor-associated protein. *J. Biol. Chem.* 267, 9035–9040.

Willich, S.N., Maclure, M., Mittleman, M., Arntz, H.R., and Muller, J.E. (1993). Sudden cardiac death. Support for a role of triggering in causation. *Circulation* 87, 1442–1450.

Willner, E.L., Tow, B., Buhman, K.K., Wilson, M., Sanan, D.A., Rudel, L.L., and Farese, R.V. (2003). Deficiency of acyl CoA:cholesterol acyltransferase 2 prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 1262–1267.

Willnow, T.E., Armstrong, S.A., Hammer, R.E., and Herz, J. (1995). Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 4537–4541.

Willnow, T.E., Moehring, J.M., Inocencio, N.M., Moehring, T.J., and Herz, J. (1996). The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro. *Biochem. J.* 313, 71–76.

Wilson, P.W.F., Kauppila, L.I., O'Donnell, C.J., Kiel, D.P., Hannan, M., Polak, J.M., and Cupples, L.A. (2001). Abdominal Aortic Calcific Deposits Are an Important Predictor of Vascular Morbidity and Mortality. *Circulation* 103, 1529–1534.

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

Regulates Adipogenesis by the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor. *J. Biol. Chem.* 286, 16775–16782.

Woldt, E., Terrand, J., Mlih, M., Matz, R.L., Bruban, V., Coudane, F., Foppolo, S., El Asmar, Z., Chollet, M.E., Ninio, E., et al. (2012). The nuclear hormone receptor PPAR γ counteracts vascular calcification by inhibiting Wnt5a signalling in vascular smooth muscle cells. *Nat. Commun.* 3, 1077.

Wolinsky, H., and Glagov, S. (1969). Comparison of Abdominal and Thoracic Aortic Medial Structure in Mammals. *Circ. Res.* 25, 677–686.

Wong, J., Quinn, C.M., and Brown, A.J. (2007). Synthesis of the oxysterol, 24(S), 25-epoxycholesterol, parallels cholesterol production and may protect against cellular accumulation of newly-synthesized cholesterol. *Lipids Health Dis.* 6, 10.

Wood, P., Imaichi, K., Knowles, J., Michaels, G., and Kinsell, L. (1964). The lipid composition of human plasma chylomicrons. *J. Lipid Res.* 5, 225–231.

Woollett, L.A., Wang, Y., Buckley, D.D., Yao, L., Chin, S., Granholm, N., Jones, P.J.H., Setchell, K.D.R., Tso, P., and Heubi, J.E. (2006). Micellar solubilisation of cholesterol is essential for absorption in humans. *Gut* 55, 197–204.

Wright, M., Aikawa, M., Szeto, W., and Papkoff, J. (1999). Identification of a Wnt-Responsive Signal Transduction Pathway in Primary Endothelial Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 384–388.

Wright, W.S., Longo, K.A., Dolinsky, V.W., Gerin, I., Kang, S., Bennett, C.N., Chiang, S.-H., Prestwich, T.C., Gress, C., Burant, C.F., et al. (2007). Wnt10b inhibits obesity in ob/ob and agouti mice. *Diabetes* 56, 295–303.

Wu, L., and Gonias, S.L. (2005). The low-density lipoprotein receptor-related protein-1 associates transiently with lipid rafts. *J. Cell. Biochem.* 96, 1021–1033.

Xie, Q., Engel, T., Schnoor, M., Niehaus, J., Hofnagel, O., Buers, I., Cullen, P., Seedorf, U., Assmann, G., and Lorkowski, S. (2006). Cell Surface Localization of ABCG1 Does Not Require LXR Activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, e143–e144.

Xu, D., Wang, Z., Zhang, Y., Jiang, W., Pan, Y., Song, B.-L., and Chen, Y. (2015). PAQR3 modulates cholesterol homeostasis by anchoring Scap/SREBP complex to the Golgi apparatus. *Nat. Commun.* 6, 8100.

Xu, Y., Liu, Q., Xu, Y., Liu, C., Wang, X., He, X., Zhu, N., Liu, J., Wu, Y., Li, Y., et al. (2014). Rutaecarpine suppresses atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$ mice through upregulating ABCA1 and SR-BI within RCT. *J. Lipid Res.* 55, 1634–1647.

Yamaguchi, T.P., Bradley, A., McMahon, A.P., and Jones, S. (1999). A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126, 1211–1223.

Yamamoto, K., Murphy, G., and Troeberg, L. (2015). Extracellular regulation of metalloproteinases. *Matrix Biol.* 44–46, 255–263.

- Yang, K.-C., Su, Y.-N., Shew, J.-Y., Yang, K.-Y., Tseng, W.-K., Wu, C.-C., and Lee, Y.-T. (2007). LDLR and ApoB are Major Genetic Causes of Autosomal Dominant Hypercholesterolemia in a Taiwanese Population. *J. Formos. Med. Assoc.* *106*, 799–807.
- Yang, T., Espenshade, P.J., Wright, M.E., Yabe, D., Gong, Y., Aebersold, R., Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (2002a). Crucial Step in Cholesterol Homeostasis. *Cell* *110*, 489–500.
- Yang, X.-P., Freeman, L.A., Knapper, C.L., Amar, M.J.A., Remaley, A., Brewer, H.B., and Santamarina-Fojo, S. (2002b). The E-box motif in the proximal ABCA1 promoter mediates transcriptional repression of the ABCA1 gene. *J. Lipid Res.* *43*, 297–306.
- Yang, Z., Strickland, D.K., and Bornstein, P. (2001). Extracellular Matrix Metalloproteinase 2 Levels Are Regulated by the Low Density Lipoprotein-related Scavenger Receptor and Thrombospondin 2. *J. Biol. Chem.* *276*, 8403–8408.
- Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E.G., Bugge, T.H., Strickland, D.K., and Lawrence, D.A. (2003). Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J. Clin. Invest.* *112*, 1533–1540.
- Yoshikawa, T., Shimano, H., Yahagi, N., Ide, T., Amemiya-Kudo, M., Matsuzaka, T., Nakakuki, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., et al. (2002). Polyunsaturated Fatty Acids Suppress Sterol Regulatory Element-binding Protein 1c Promoter Activity by Inhibition of Liver X Receptor (LXR) Binding to LXR Response Elements. *J. Biol. Chem.* *277*, 1705–1711.
- Yuan, C., Lai, C.W.K., Chan, L.W.C., Chow, M., Law, H.K.W., and Ying, M. (2014). Cumulative Effects of Hypertension, Dyslipidemia, and Chronic Kidney Disease on Carotid Atherosclerosis in Chinese Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Diabetes Res.* *2014*, e179686.
- Yuan, Y., Zhao, L., Chen, Y., Moorhead, J.F., Varghese, Z., Powis, S.H., Minogue, S., Sun, Z., and Ruan, X.Z. (2011). Advanced glycation end products (AGEs) increase human mesangial foam cell formation by increasing Golgi SCAP glycosylation in vitro. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* *301*, F236–F243.
- 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.
- Zambon, A., Bertocco, S., Vitturi, N., Polentarutti, V., Vianello, D., and Crepaldi, G. (2003). Relevance of hepatic lipase to the metabolism of triacylglycerol-rich lipoproteins. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 1070–1074.
- Zarins, C.K., Giddens, D.P., Bharadvaj, B.K., Sottiurai, V.S., Mabon, R.F., and Glagov, S. (1983). Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ. Res.* *53*, 502–514.
- 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.
- Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Almeida, K., Wang, J., Doble, B., Woodgett, J., et al. (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor

Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development* 135, 367–375.

Zhang, H., Links, P.H., Ngsee, J.K., Tran, K., Cui, Z., Ko, K.W.S., and Yao, Z. (2004). Localization of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 to Caveolae in 3T3-L1 Adipocytes in Response to Insulin Treatment. *J. Biol. Chem.* 279, 2221–2230.

Zhang, L., Reue, K., Fong, L.G., Young, S.G., and Tontonoz, P. (2012). Feedback regulation of cholesterol uptake by the LXR-IDOL-LDLR axis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2541–2546.

Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., and Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258, 468–471.

Zhang, X., Goncalves, R., and Mosser, D.M. (2008). The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Curr. Protoc. Immunol.* Ed. John E Coligan Al *CHAPTER*, Unit-14.1.

Zhao, Y., Li, D., Zhao, J., Song, J., and Zhao, Y. (2016). The role of the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) in regulating blood-brain barrier integrity. *Rev. Neurosci.* 27, 623–634.

Zhou, C., Lei, H., Chen, Y., Liu, Q., Li, L.-C., Moorhead, J.F., Varghese, Z., and Ruan, X.Z. (2013). Enhanced SCAP Glycosylation by Inflammation Induces Macrophage Foam Cell Formation. *PLoS ONE* 8.

Zhou, L., Takayama, Y., Boucher, P., Tallquist, M.D., and Herz, J. (2009a). LRP1 Regulates Architecture of the Vascular Wall by Controlling PDGFR β -Dependent Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation. *PLoS ONE* 4, e6922.

Zhou, L., Choi, H.Y., Li, W.-P., Xu, F., and Herz, J. (2009b). LRP1 Controls cPLA2 Phosphorylation, ABCA1 Expression and Cellular Cholesterol Export. *PLoS ONE* 4, e6853.

Zilversmit, D.B. (1965). The composition and structure of lymph chylomicrons in dog, rat, and man. *J. Clin. Invest.* 44, 1610–1622.

Zuliani, G., Vigna, G.B., and Fellin, R. (2007). The anti-atherogenic properties of HDL particles. *Int. Congr. Ser.* 1303, 103–110.

Rôle de la signalisation LRP1/Wnt5a dans le métabolisme du cholestérol

L'athérosclérose débute par l'accumulation de cholestérol dans les cellules des parois artérielles, formant des plaques d'athéromes. LRP1 protège contre la maladie en inhibant l'accumulation intracellulaire de cholestérol et nous avons montré qu'une signalisation Wnt5a était impliquée dans cette inhibition. Le projet de thèse consistait à caractériser les mécanismes moléculaires de cette inhibition et à vérifier l'effet athéroprotecteur de Wnt5a. Nous avons montré *in vitro* et *in vivo* que Wnt5a inhibe l'accumulation de cholestérol via la stimulation de son export et l'inhibition de sa synthèse endogène. Nous avons ensuite observé que l'inactivation de Wnt5a spécifiquement dans les CMLv de souris LDLR^{-/-} conduit à une augmentation des lésions athéromateuses après un régime riche en cholestérol, confirmant alors son rôle athéroprotecteur. Nos travaux ont ainsi permis de révéler le potentiel de Wnt5a en tant que cible thérapeutique dans le traitement contre l'athérosclérose.

Mots clés : cholestérol, LRP1, Wnt5a, athérosclérose, transporteur ABCG1, souris transgéniques

Atherosclerosis is characterized by an intracellular cholesterol accumulation in arterial cells. LRP1 receptor protects against intracellular cholesterol accumulation and we identified the secreted protein Wnt5a as a partner of this inhibitory effect of LRP1. The aim of this thesis is to determine the molecular mechanisms by which the LRP1/Wnt5a signaling pathway prevents cholesterol accumulation in cells and to study the antiatherogenic potential of Wnt5a.

We first showed *in vitro* and *in vivo* that Wnt5a decreases cellular cholesterol content by stimulating its efflux through the induction of cholesterol transporters expression and by down-regulating the expression of HMGCoA-reductase. Then we used mice deleted for Wnt5a specifically in smooth muscle cells, which present more atherosclerotic lesions than control mice after a high cholesterol diet. This confirms that Wnt5a protects against atherosclerosis and could be an interesting therapeutic target in the treatment of the disease.

Key words : cholesterol, LRP1, Wnt5a, atherosclerosis, ABCG1 transporter, transgenic mice