



**HAL**  
open science

# Le rôle de la glutaminolyse hépatique dans l'athérosclérose

Florent Murcy

► **To cite this version:**

Florent Murcy. Le rôle de la glutaminolyse hépatique dans l'athérosclérose. Biologie cellulaire. Université Côte d'Azur, 2022. Français. NNT : 2022COAZ6022 . tel-04031620

**HAL Id: tel-04031620**

**<https://theses.hal.science/tel-04031620>**

Submitted on 16 Mar 2023

**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.

# THÈSE DE DOCTORAT

## Le rôle de la glutaminolyse hépatique dans l'athérosclérose

**Florent MURCY**

Centre méditerranéen de médecine moléculaire (C3M)

---

**Présentée en vue de l'obtention**

**du grade de docteur en** Sciences de la Vie et  
de la Santé. Spécialité : Interactions  
Moléculaires et Cellulaires  
**d'Université Côte d'Azur**

**Dirigée par :** Dr Laurent YVAN-CHARVET

**Soutenu le :** 22 novembre 2022

---

**Devant le jury, composé de :**

Pr. **Fanny BUREL-VANDENBOS**, PU-PH,  
Université Côte-d'Azur-LCAP

Pr. **Bruno FÈVE**, PU-PH, Sorbonne Université-  
UPMC-CRSA

Dr. **Fabienne FOUFELLE**, DR, Sorbonne  
Université-CRC

Dr. **Muriel LAFFARGUE**, DR, Université  
Toulouse III-I2MC

Dr. **Delphine EBERLÉ**, MCU-HDR,  
Université de Lille-Institut Pasteur

---



European Research Council  
Established by the European Commission



# Le rôle de la glutaminolyse hépatique dans l'athérosclérose

## **Jury :**

### **Président :**

Pr. Fanny BUREL-VANDENBOS, Professeure des universités – Praticienne hospitalière, CHU de Nice Pasteur-LCAP, Université Côte-d'Azur

### **Rapporteurs :**

Dr. Muriel LAFFARGUE, Directrice de recherche Inserm, Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires, Université Toulouse III

Dr. Delphine EBERLÉ, Maîtresse de conférence universitaire, Institut Pasteur de Lille Inserm, Université de Lille

### **Examineurs :**

Pr. Bruno FÈVE, Professeur des universités – Praticien hospitalier, Centre de Recherche Saint-Antoine, Sorbonne Université - Campus universitaire Pierre et Marie Curie

Dr. Fabienne FOUFELLE, Directrice de recherche INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, Sorbonne Université

### **Directeur de thèse :**

Dr. Laurent YVAN-CHARVET, Directeur de recherche INSERM, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, Université Côte-d'Azur

# Résumé

Les maladies cardiovasculaires, principale cause de mortalité dans le monde avec 17 millions de morts chaque année, représentent un problème majeur de santé publique. Malgré les thérapeutiques existantes visant à rétablir l'homéostasie lipidique, la prévalence de ces maladies ne cesse d'augmenter et de nouvelles cibles doivent être recherchées.

Récemment, de nouveaux facteurs ont été identifiés comme acteurs potentiels dans le développement des plaques d'athérosclérose. Parmi eux, la glutamine, un acide aminé conditionnellement essentiel, et son métabolisme ont été associés à l'incidence des maladies cardiovasculaires et à l'inflammation.

Au sein de notre organisme, deux enzymes majeures sont impliquées dans le contrôle des flux de cet acide : la glutaminase 2 (GLS2) qui métabolise la glutamine en glutamate et la glutamine synthétase (GS) qui permet la réaction inverse.

Au cours de notre étude, nous avons tout d'abord étudié l'effet du blocage de l'une ou l'autre de ces enzymes dans un modèle murin d'athérosclérose grâce à l'injection d'un virus adéno-associé (AAV) ou de méthionine sulfoximine (MSO). Alors que l'inhibition de la GS n'a que peu d'impact sur le développement des lésions, la déficience en GLS2 entraîne une augmentation de la taille de la plaque. Aucune modification majeure des facteurs de risque cardiovasculaires classiques ni même de l'inflammation n'a été associée à l'augmentation des niveaux de glutamine plasmatique en l'absence de GLS2.

En faisant des analyses du profil transcriptionnel du foie et des aortes des animaux déficients pour la GLS2, nous avons remarqué que de nombreux gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire et dans l'interaction cellules/matrice étaient dérégulés. Les diverses colorations et marquages immunofluorescents des plaques ont corroboré le séquençage et identifié des éléments supportant l'hypothèse d'une fragilisation de la matrice extracellulaire. La redistribution des flux de glutamine a en effet entraîné des modifications d'enzymes impliquées dans le remodelage matriciel. En particulier, l'activité de la transglutaminase 2 (TGM2), l'une des enzymes garantes de l'intégrité de la matrice, était augmentée.

D'un point de vue thérapeutique, nous avons étudié la surexpression hépatique de la GLS2. Dans nos modèles murins surexprimant l'enzyme, nous avons constaté une diminution de la taille des plaques ainsi qu'une baisse de la glutamine plasmatique.

La GLS2 semble alors être un nouvel acteur dans la prévention de l'athérosclérose non seulement en maintenant l'homéostasie des cellules mais aussi en garantissant l'intégrité du milieu dans lequel elles évoluent. Il serait intéressant d'explorer cette nouvelle cible à l'heure où les thérapeutiques semblent s'essouffler.

**Mots clés :** Athérosclérose, Glutamine, Glutaminase, Cardiovasculaire, Métabolisme, Foie

# Summary

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide with 17 million deaths each year and represent a major public health challenge. Despite existing therapies aimed at restoring lipid homeostasis, the prevalence of these diseases keeps increasing and new targets must be found.

Recently, new factors have been identified as potential actors in the development of atherosclerotic plaques. Among them, glutamine, a conditionally essential amino acid, and its metabolism have been linked to the incidence of cardiovascular disease and inflammation.

Two major enzymes are involved in controlling the flow of this amino acid within our body. Glutaminase 2 (GLS2) metabolizes glutamine into glutamate and the reverse reaction is mediated by glutamine synthetase (GS).

During our study, we first studied the effect of their inhibition in a mouse model of atherosclerosis with adeno-associated virus (AAV) injection or methionine sulfoximine (MSO). While GS inhibition has a little impact on lesion development, GLS2 deficiency leads to an increase in atherosclerotic plaque size. At the same time, plasma glutamine is increased. There was no major change in classical cardiovascular risk factors or even inflammation.

By performing analyzes of the transcriptional profile of the liver and aortas of GLS2 KO animals, we noticed that many genes involved in the remodeling of the extracellular matrix and in the cell/matrix interaction were deregulated. Dedicated stainings of the plaques corroborated the RNA sequencing and identified regulation of key matrix-modulating enzymes supporting the hypothesis of a weakening of the extracellular matrix. Especially, we found an increase in the activity of transglutaminase 2 (TGM2), one of the pivotal regulator of matrix integrity.

We next investigated the therapeutic opportunity by overexpressing hepatic GLS2. In our mouse model overexpressing the enzyme, we observed a decrease in atherosclerotic plaque size as well as a decrease in plasma glutamine.

GLS2 seems to be a new player in the prevention of atherosclerosis not only by maintaining cell homeostasis but also by guaranteeing the environment integrity in which they evolve. It would be interesting to explore this new target at a time when therapies seem to be running out of steam.

**Key words :** Atherosclerosis, Glutamine, Glutaminase, Cardiovascular, Metabolism, Liver

# Remerciements

La partie la plus difficile à écrire et je m'excuse d'avance pour les personnes que j'aurais oublié de citer.

*Aux membres du jury,*

Un travail ne peut être utile à la société que s'il est lu et évalué par ses pairs. Aussi, je tiens à remercier en premier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

**Dr. Muriel Laffargue, Dr. Delphine Eberlé et Dr. Fabienne Foufelle**, merci à vous d'user de votre temps afin d'examiner mon travail.

**Pr. Bruno Fève**, je suis très heureux de vous avoir connu à la table du congrès de la NSFA et j'espère vous revoir l'année prochaine. Merci à vous d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de juger ce travail.

Pour terminer, un grand merci au **Pr. Fanny Burel-Vandenbos** d'avoir accepté de présider mon jury et d'examiner mon travail de thèse.

Je suis très heureux de pouvoir vous exposer mes résultats et de pouvoir bénéficier de votre expertise et de vos conseils.

*A mon comité de suivi de thèse,*

**Dr. Thierry Huby**, merci pour vos conseils et vos idées qui m'ont guidé dans mon projet. **Béatrice**, un grand merci à toi pour ta bienveillance, tes conseils, tes idées et pour avoir relu ce manuscrit.

*A mon directeur de thèse,*

Monsieur, Docteur, Professeur...**Laurent**, merci mille fois. En trois années passées avec toi, tu m'as toujours épaulé. Tu m'as appris que rien n'était grave et qu'il y avait une solution à tout problème. Il y a eu des hauts et des bas, mais le projet a toujours avancé dans le bon sens et la bonne humeur. En plus d'avoir des qualités sociales indéniables, et je t'encourage à les maintenir, tu es aussi un puits de sciences. Encore merci de ton temps, de ton soutien, et j'espère que nous retravaillerons ensemble...dans un futur proche.

*A tous ceux que j'ai pu côtoyer dans l'équipe,*

**Coraline...** ou plutôt **Coraline et Thibault**, car vous formez un duo de choc. Merci pour votre participation à ce projet. Mais surtout, merci pour nos discussions scientifiques et non scientifiques, nos moments d'égarements et de détente. Je vous souhaite une bonne continuation, même si je pense que nous allons nous revoir prochainement.

**Nathalie...** mon bras droit, ou gauche, dans ce projet. A l'unanimité, tu es élue la personne la plus gentille. Il suffit juste de regarder les petits mots que l'équipe te laisse sur ton tableau pour le savoir. Merci encore pour ta pédagogie, ton expertise, tes conseils et nos discussions sur tout et n'importe quoi. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

**Saloua et Clara**, merci pour vos participations au projet et pour le temps que nous avons passé ensemble. Je vous souhaite le meilleur dans vos carrières respectives.

**François, Emma, Gaël, Stoyan, Rodolphe, Alexandre, Bastien, Julie, Adélie, Alexia, Marion S. et Johanna**...que de noms pour désigner les ex-membres de la team 13. Merci pour le temps qu'on a passé ensemble, pour ces réunions d'équipes et ces brainstormings entrecoupés de soirées improvisées. Merci de m'avoir formé à vos techniques, de m'avoir appris vos protocoles et votre rigueur scientifique.

**Marion J. et Marina**, les futures nouvelles ex-membres de cette équipe, merci pour votre bienveillance, votre bonne humeur et vos conseils. Vous êtes arrivées sur la fin, mais nous avons quand même pu partager de bons moments ensemble. Je vous souhaite le meilleur pour la suite.

*Aux personnes qui étaient de passage...*

les stagiaires de master bien sûr, **Alexandre, Fairouz, Mezhoura, Hyame, Pauline**, merci pour votre aide et la bonne humeur que vous avez apportées au quotidien. Bonne continuation dans vos cursus.

*Aux personnes du centre qui m'ont aidé au cours de ma thèse,*

Un grand merci au personnel de la gestion administrative. **Carole, Dominique et Jean**, merci pour votre bonne humeur au quotidien, vos blagues, et nos échanges matinaux. Et surtout...merci pour votre efficacité.

Merci au personnel des plateformes, en particulier **Marie** pour ses formations au microscope et **Véronique** pour celles de l'animalerie, **Frédéric L.** pour son aide en cytométrie.

Merci aux membres des équipes du centre : **Philippe G., Jérôme G., Mireille C., Jennifer J., Gregory, Thomas S.**...et j'en oublie certainement, avec qui nous avons pu collaborer, échanger des discussions et du matériel de laboratoire

*Aux membres et ex-membres du LCAP,*

Même si on va bientôt se recroiser, à toutes les techniciennes qui m'ont aidé en partie à colorer les lames, **Emmeline, Mahjouba, Magali** et **consoeurs**, merci pour votre temps.

A mes futurs chefs, co-internes, ex-cointernes, **Alex G., Samantha, Charlotte, Pierre, Paul, Jacques, Youta, Zoé, Vicky**...et j'en passe, merci d'avoir gardé un œil sur moi, même hors du service médical.

**Pr. Michiels**, un grand merci de m'avoir encouragé dans ce cursus, et de m'avoir permis d'effectuer ce travail. C'est un peu grâce à vous que j'ai commencé cette thèse et j'espère avoir la chance de travailler à vos côtés encore longtemps. Vos conseils me seront toujours utiles.

*A mes amis*

LA team, depuis mon arrivée ici, **Guigui, Antoine, Arnaud, Adrian, Yaman, Alex, Médéric, Seb**, merci pour tout : nos moments de joie, de peine, de fous rires, nos discussions intéressantes... tous ces moments de vie que l'on partage ensemble m'ont aidé au quotidien et resteront gravés.

*A mes proches,*

A **mes parents** qui m'ont toujours soutenu quels que soient mes choix et qui ont toujours été là pour moi, à **mes frère et sœurs chéris** tout le temps disponibles et que j'espère avoir rendu fiers, à **ma belle-famille** avec qui je passe d'agréables moments et à **mon âme sœur et ma petite voix**, qui, malgré mes moments de doute, me pousse à aller toujours plus loin avec une bienveillance incomparable...merci d'exister.

*A toi cher lecteur,*

Merci de prendre le temps de lire ce manuscrit.

# Valorisation

## A. Publications

- **Nanoscale Organization of Tetraspanins during HIV-1 Budding by Correlative DSTORM/AFM.** Dahmane, S.; Doucet, C.; Le Gall, A.; Chamontin, C.; Dosset, P.; **Murcy, F.**; Fernandez, L.; Salas, D.; Rubinstein, E.; Mougel, M.; Nollmann, M.; Milhiet, P.-E. *Nanoscale* 2019, *11* (13), 6036–6044. <https://doi.org/10.1039/c8nr07269h>.
- **Macrophage Ontogeny and Functional Diversity in Cardiometabolic Diseases.** Gautier, E. L.; Askia, H.; **Murcy, F.**; Yvan-Charvet, L. *Semin Cell Dev Biol* 2021, *119*, 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.06.023>.

## B. Communications orales

- **The role of hepatic glutaminolysis in atherosclerosis.** **Florent Murcy** and Laurent Yvan-Charvet. Séminaire doctorants/post doctorants. Avril 2021. Nice, France. ePoster
- **The role of hepatic glutaminolysis in atherosclerosis.** **Florent Murcy** and Laurent Yvan-Charvet. Journées de l'école doctorale (JEDNs). Avril 2021. Nice, France. ePoster
- **The role of hepatic glutaminolysis in atherosclerosis.** **Florent Murcy** and Laurent Yvan-Charvet. Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose (NSFA). Juin 2021 . Nice, France. Ma recherche en 180s.
- **The role of hepatic glutaminolysis in atherosclerosis.** **Florent Murcy** and Laurent Yvan-Charvet European Atherosclerosis Society (EAS). Mai 2022. Milan, Italie. ePoster

## C. Communication affichées

- **The role of hepatic glutaminolysis in atherosclerosis.** **Florent Murcy** and Laurent Yvan-Charvet. Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose (NSFA). Juin 2022. Biarritz, France. Poster

« Choisissez un travail que vous aimez et vous n'aurez pas à travailler un seul  
jour de votre vie. »  
-Confucius

« En faisant scintiller notre lumière, nous offrons aux autres la possibilité d'en  
faire autant. »  
-Nelson Mandela

« Ils ne savaient pas que c'était impossible, alors ils l'ont fait. »  
-Mark Twain

# Table des matières

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>14</b>
<b>LISTE DES TABLES.....</b>	<b>15</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>19</b>
<b>CHAPITRE I : UN PROBLEME MAJEUR DE SANTE PUBLIQUE .....</b>	<b>20</b>
A. Les maladies cardiovasculaires .....	20
1. Définition.....	20
2. Épidémiologie.....	21
B. L'athérosclérose : la maladie des parois artérielles.....	23
1. Définition.....	23
2. Le classement des différents stades de plaques d'athérosclérose.....	24
i. Les lésions de type I .....	24
ii. Les lésions de type II .....	25
iii. Les lésions de type III.....	25
iv. Les lésions de type IV et V.....	26
v. Les lésions de type VI.....	27
vi. Vers une nouvelle classification ? .....	28
3. Les différentes couches des vaisseaux.....	29
i. L'intima .....	30
a. Description générale .....	30
b. La couche endothéliale .....	32
c. La matrice extracellulaire (MEC) de l'intima.....	32
ii. La media .....	33
iii. L'adventice .....	33
4. La résistance de la paroi artérielle .....	35
5. L'initiation et la progression de la plaque .....	38
i. La dyslipidémie .....	38
a. La voie exogène .....	38
b. La voie endogène.....	40
c. Le transport inverse du cholestérol et les HDL .....	41
ii. La dysfonction endothéliale.....	43
iii. La phase pro inflammatoire .....	47
iv. La phase de stabilisation.....	52
v. La phase de fragilisation et de rupture.....	52
C. Le syndrome métabolique .....	55
1. Définition.....	55
2. Épidémiologie.....	58
3. Notions physiopathologiques dans le syndrome métabolique.....	58
4. L'inflammation dans le syndrome métabolique et les maladies cardiovasculaires.....	62
<b>CHAPITRE II : DE NOUVELLES CIBLES CONTRE LE DEVELOPPEMENT DE</b>	
<b>L'ATHEROSCLEROSE.....</b>	<b>65</b>
A. Les thérapies existantes contre le développement de l'athérosclérose.....	65
1. Les facteurs protecteurs et les thérapies non médicamenteuses .....	65
2. Les thérapies médicamenteuses.....	66
i. Les statines.....	66
ii. Les anticorps anti-PCSK9.....	67
iii. Les chélateurs des acides biliaires .....	68

iv.	L'acide nicotinique ou Niacine.....	68
v.	Les inhibiteurs de l'absorption intestinale du cholestérol .....	68
vi.	Les Fibrates.....	68
vii.	Les autres.....	69
B.	De nouvelles thérapies nécessaires .....	70
C.	Les modèles d'étude murins de l'athérosclérose.....	72
1.	Généralités .....	72
2.	Le modèle ApoE <sup>-/-</sup> .....	73
3.	Le modèle LDL-R <sup>-/-</sup> .....	73
4.	Le modèle PCSK9-AAV .....	74
5.	Le modèle ApoE*3-Leiden.CETP.....	74
6.	Les modèles de souris avec rupture de plaque.....	75
<b>CHAPITRE III : LA GLUTAMINE ET SES MECANISMES DE REGULATION.....</b>		<b>78</b>
A.	La glutamine : un acide aminé « conditionnellement essentiel ».....	78
1.	Description générale .....	78
2.	Les différents rôles de la glutamine.....	81
3.	Les voies métaboliques de la glutamine .....	82
i.	La voie des acides nucléiques.....	82
ii.	La voie des hexosamines .....	83
iii.	La synthèse protéique .....	83
iv.	La glutamylation et polyglutamylation.....	84
v.	La Transglutaminase 2.....	84
vi.	Le cycle de Krebs .....	85
vii.	Autres voies .....	85
B.	Le glutamate et le cycle de Krebs .....	86
C.	Les enzymes métabolisant la glutamine et le glutamate .....	89
1.	La glutamine synthétase (GS).....	89
i.	Description générale .....	89
ii.	Structure.....	90
iii.	Fonction .....	90
iv.	Régulation.....	90
2.	La glutaminase 1 (GLS1).....	93
i.	Description générale .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
ii.	Structure.....	93
iii.	Fonctions.....	93
iv.	Régulation.....	94
3.	La glutaminase 2 (GLS2).....	95
i.	Description générale .....	95
ii.	Structure.....	96
iii.	Fonction .....	97
iv.	Régulation.....	98
D.	Les outils du blocage d'une activité enzymatique .....	101
1.	La place des virus adéno-associés dans la thérapie génique.....	101
i.	Généralités .....	101
ii.	Définition, avantages et inconvénients .....	102
iii.	Sérotypes.....	104
2.	Les ARNs interférents .....	104
3.	La méthionine sulfoximine .....	106
E.	La glutamine dans le cadre de l'athérosclérose.....	107
1.	La glutamine : un acide aminé impliqué dans l'amélioration des paramètres cardiovasculaires ? .....	107

2. La glutamine : un acide aminé impliqué dans la survenue des évènements cardiovasculaires ? .....	108
3. Les glutaminases et la glutamine synthétase : de nouvelles cibles thérapeutiques ?.....	109
<b>OBJECTIFS DE MES TRAVAUX DE THESE.....</b>	<b>111</b>
<b>PAPIER.....</b>	<b>112</b>
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>160</b>
1. Le rôle de la glutamine et du ratio glutamine/glutamate dans l'athérosclérose .....	160
2. Le rôle de la glutaminase 2 dans la prévention de l'athérosclérose .....	162
3. Une modification des flux d'acides aminés à l'origine d'un remodelage de la matrice extracellulaire .....	165
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>169</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>170</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>182</b>

# Table des illustrations

Figure 1 : Les causes de mortalité dans le monde selon l'OMS en 2019. ....	20
Figure 2 : Les causes de mortalité parmi les maladies cardiovasculaires entre 2017 et 2019	21
Figure 3 : Evolution de la mortalité par maladie cardiovasculaire entre les années 2000 et 2016 en fonction des catégories d'âge .....	22
Figure 4 : Mortalité par cardiopathie ischémique ou AVC selon les catégories d'âge et en fonction du sexe en 2016 en France .....	22
Figure 5 : Evolution des plaques d'athérosclérose en fonction du temps.....	23
Figure 6 : Strie lipidique (lésion de type I ; grossissement x40).....	24
Figure 7 : Pré-athérome (lésion de type III ; grossissement x40) .....	25
Figure 8 : Athérome avancé (lésions de type IV et Vb).....	26
Figure 9 : Rupture (Lésion de type VIa) .....	27
Figure 10 : Représentation schématiques des différentes couches vasculaires.....	30
Figure 11 : Histologie de la paroi aortique d'une souris.....	34
Figure 12 : Métabolisme des lipoprotéines .....	43
Figure 13 : Mécanismes de la dysfonction endothéliale .....	45
Figure 14 : Développement de la plaque (Phase pro-inflammatoire) .....	48
Figure 15 : Développement de la plaque (Phase de stabilisation).....	50
Figure 16 : Développement de la plaque (Phase de fragilisation et de rupture) .....	54
Figure 17 : Notions physiopathologiques dans le syndrome métabolique.....	60
Figure 18 : Mécanisme d'action des statines et des anticorps anti-PCSK9 .....	67
Figure 19 : Régulation de la glutamine dans des conditions normales ou cataboliques .....	80
Figure 20 : Récapitulatif des voies métaboliques de la glutamine.....	86
Figure 21 : cycle de Krebs et métabolisme du glutamate .....	88
Figure 22 : Structure crystallographique de la glutamine synthétase.....	89
Figure 23 : Réaction médiée par la glutamine synthétase (GS) .....	91
Figure 24 : Structures crystallographiques des glutaminases.....	92
Figure 25 : Structure de la glutaminase 1 (GLS1) .....	95
Figure 26 : Structure de la glutaminase 2 (GLS2) .....	100
Figure 27 : Mécanisme d'infection des virus adéno-associés .....	103
Figure 28: Mécanisme d'action des ARN en épingle à cheveux (shRNA).....	105
Figure 29 : Mode d'action de la méthionine sulfoximine.....	106
Figure 30 : Schéma récapitulatif des effets du blocage de GLS2 .....	168

## Liste des tables

Table 1 : Classification des stades des plaques d'athérosclérose .....	28
Table 2 : Représentation schématique des lipoprotéines et composition.....	39
Table 3 : Principales définitions du syndrome métabolique .....	56
Table 4 : Caractéristiques des modèles murins ApoE <sup>-/-</sup> et LDL-R <sup>-/-</sup> .....	77
Table 5 : Exemples d'apport en glutamine de divers aliments du quotidien .....	79
Table 6 : Tableau des caractéristiques des différents vecteurs viraux en thérapie génique..	101
Table 7 : Tropisme préférentiel des virus adéno-associés en fonction du sérotype.....	104

# Liste des abréviations

## A

$\alpha$ KG : Acide  $\alpha$ -cétoglutarique  
 $\alpha$ KGM : Acide  $\alpha$ -cétoglutamique  
 $\alpha$ -MHC : Chaîne lourde de myosine- $\alpha$   
 $\alpha$ SMA : Actine  $\alpha$  des cellules musculaires lisses  
AAV : Virus adéno-associé  
ABCA1 : ATP-binding cassette A1  
ABCG1 : ATP-binding cassette G1  
ADAM : A disintegrin and metalloprotease  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
AGE : Produits terminaux de glycation  
Ago : Argonaute (protéine)  
AHA : American heart association  
ALAT : Alanine aminotransférase  
ALK1 : Activin receptor-like kinase 1  
Aln : Alanine  
AMP : Adénosine monophosphate  
AngII : Angiotensine II  
Arg : Arginine  
ARN : Acide Ribonucléique  
ASAT : Aspartate aminotransférase  
Asn : Asparagine  
ASNS : Asparagine synthetase  
Asp : Aspartate  
ATG7 : Autophagie Related 7  
ATLO : Artery tertiary lymphoid organ  
ATP : Adénosine triphosphate  
AVC : Accident vasculaire cérébral

## B

BCAA : Acide aminé à chaîne latérale ramifiée  
BCAT : Aminotransférase d'acide aminé à chaîne latérale ramifiée

## C

CAG : Cytomegalovirus-Actine-Globine  
CARD10 : Caspase Recruitment Domain Family member 10  
CatG : Cathepsine G  
CCL-2 : Ligand 2 de la chimiokine (motif C-C)  
CCP : Cytoplasmic Carboxypeptidase  
CD36 : Cluster de différenciation 36  
CD47 : Cluster de différenciation 47  
CD68 : Cluster de différenciation 48  
CETP : Protéine de transfert des ester de cholestérol  
CML : Cellule musculaire lisse

CMV : Cytomégalovirus  
COX-2 : Cyclo-oxygénase-2  
CRP : Protéine C-réactive  
CXCL13 : Ligand 13 de la chimiokine (motif CXC)  
Cys : Cystéine

## D

DAMP : Motif moléculaire associé aux dégâts cellulaires  
DGCR8 : DiGeorge syndrome critical region 8  
DHA : Acide docosahexaénoïque  
DNMT3A : DNA méthyltransférase 3a  
DOCK4 : Deducator of cytokinesis 4  
Drosha : Ribonucléase

## E

EGIR : Groupe européen d'étude de l'insulinorésistance  
Ela-2 : Elastase  
EPA : Acide eicosapentaénoïque  
ET-1 : Endothéline-1

## F

Fbn1 : Fibrilline 1  
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes  
FOXO1 : Forkhead Box protein O1  
FT : Facteur tissulaire

## G

GAB : Glutaminase B  
GABA : Acide gamma-aminobutyrique  
GAC : Glutaminase C  
GAM : Glutaminase M  
GFAT : Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransférase  
GLS1/2 : Glutaminase 1/2  
Glu : Glutamate  
Glucose 6-P : Glucose-6-phosphate  
GLUD : Glutamate déshydrogénase  
GLUL : Glutamate amonia-ligase  
Gly : Glycine  
GOT1 : Glutamic-oxaloacetic transaminase 1  
GPT1 : Glutamic-pyruvic transaminase 1  
GS : Glutamine synthetase  
GSH : Glutathion  
GWAS : Etude d'association pangénomique

## H

HDAC9 : Histone désacétylase 9

HL : Lipase hépatique

HMG-CoA : Hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A

HSP : Protéine de choc thermique

## I

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule

IDF : Fédération internationale du diabète

IDL : Lipoprotéine de densité intermédiaire

IFN $\gamma$  : Interféron gamma

IGF-1 : Facteur de croissance de l'insuline-1

IL-10 : Interleukine-10

IL-1 $\beta$  : Interleukine-1 $\beta$

IL-6 : Interleukine-6

IL-7 : Interleukine-7

IL-8 : Interleukine-8

## K

KLF : Krüppel-like factor

## L

l'IL-13 : Interleukine-13

LCAT : Lécithine-cholestérol acyltransférase

LDL-R : Récepteur aux LDL

LGA : Liver-Type glutaminase

LOX : Lysyl oxydase

LOXL-1 : L'homologue 1 de la lysyl oxydase

LPL : Lipase des lipoprotéines

LRP1 : Protéine 1 liée au récepteur des lipoprotéines de basse densité

LXR : Récepteur nucléaire des oxystérols

Lys : Lysine

## M

MAC2 : Antigène MAC2 ou galectin-3

MAC3 : Antigène MAC3

MEC : Matrice extracellulaire

merTK : Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase

Met : Méthionine

mir181b : Micro-ARN 181b

MMP : Métalloprotéinase

MSO : Methionine sulfoximine

mTORC1 : Mammalian target of rapamycin 1

## N

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide réduit

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit

NAFL : Non alcoholic fatty liver

NCEP-ATP III : National Center Education Program-Adult Treatment Program III

NET : Neutrophil extracellular trap

NF $\kappa$ b : Nuclear factor-kappa B

NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NO : Oxyde nitrique

Nos3 : Nitric Oxyde Synthase 3

## O

OLR-1: Oxidized low-density lipoprotein receptor-1

OMS : Organisation mondiale de la santé

OXPHOS : Phosphorylation oxydative

## P

PAI-1 : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1

PCSK9 : Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9

PDGF : Platelet-derived growth factor

PEP : Phosphoénolpyruvate

PLTP : Protéine plasmatique de transfert des phospholipides

Polyglu : Polyglutamylatation

PPAR $\alpha$  : Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes

PR-3 : Protéinase-3

PRR : Pattern recognition receptor

Pro : Proline

Pur : Purine

Pyr : Pyrimidine

## R

RCT : Reverse cholesterol transport

Rela : Gène RELA

RER : Réticulum endoplasmique rugueux

RHOJ : Ras Homolog Family Member J

RISC : RNA-induced silencing complex

ROS : Reactive Oxygen Species

## S

Ser : Sérine

SERPINA9 : Serpin A9

Sirt1: Sirtuine 1

SLC1A5 : Solute Carrier Family 1 Member 5

SLC7A5 : Solute Carrier Family 7 Member 5

SPM : Médiateurs spécialisés de la résolution de l'inflammation

SR-A : Récepteur éboueur A

SR-B1: Récepteur éboueur B1

SREBP2 : Sterol regulatory element-binding protein-2

SV40 : Promoteur virus simien 40

## **T**

TCA cycle : Cycle de Krebs (tricarboxylic citric acid cycle)

TET2 : Ten-eleven-translocation 2

TFPI : Inhibiteur de la voie du facteur tissulaire

TG : Triglycérides

TG2 : Transglutaminase 2

TGF $\beta$  : Facteur de croissance transformant  $\beta$

TGM2 : Transglutaminase 2 (TG2)

Thr : Thréonine

TICE : Transintestinal cholesterol excretion

TLR : Toll-like receptor

TNF $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale

t-PA : Activateur tissulaire du plasminogène

TTLL :Tubulin tyrosine ligase-like

Tub : Tubuline

TXa2 : Thromboxane A2

TXNRD2 : Thioredoxin Reductase 2

## **U**

UDP-GlcNac : Uridine diphosphate N-acétylglucosamine

## **V**

VCAM-1 : Vascular cell adhesion protein-1

# **Introduction**

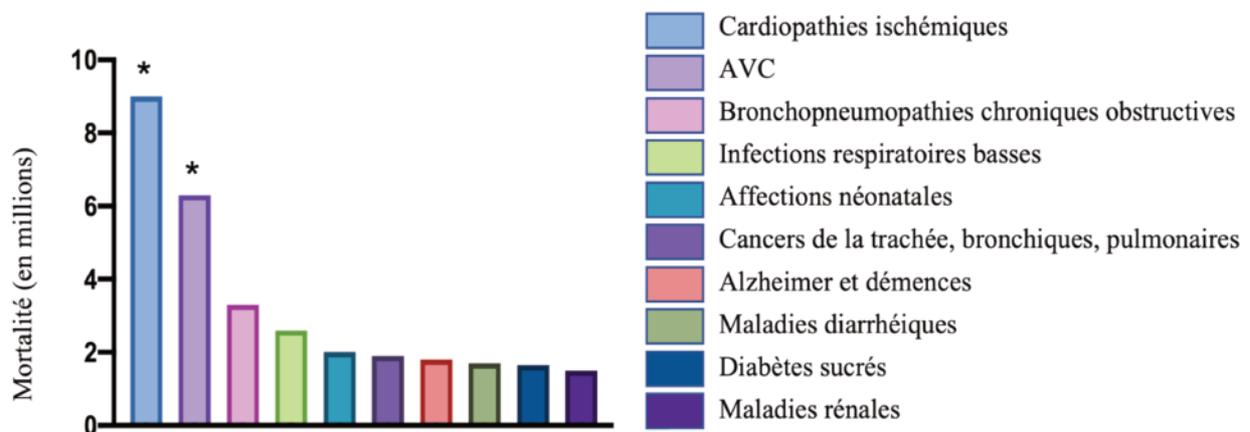
# Chapitre I : Un problème majeur de santé publique

## A. Les maladies cardiovasculaires

### 1. Définition

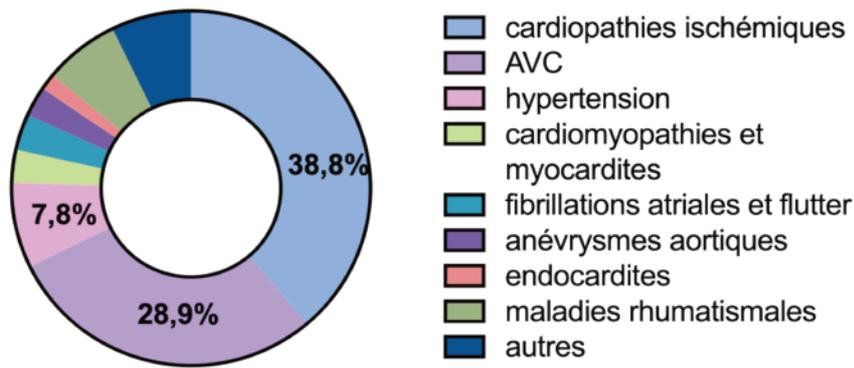
Les maladies cardiovasculaires regroupent toutes les pathologies touchant le cœur et/ou les vaisseaux, en affectant principalement l'endothélium, couche intérieure de la tunique vasculaire. Malgré les progrès significatifs diagnostiques et thérapeutiques de ces dernières décennies, elles sont encore responsables annuellement de plus de 17 millions de décès à travers le monde (Figure 1), représentant 32% de la mortalité toutes causes confondues, et restent un problème majeur de santé publique. Ce chiffre est élevé. Néanmoins, si on devait l'exprimer en pourcentage par rapport à la population mondiale, tout âge confondu, on noterait une baisse significative de plus de 20% depuis les années 2000 (Mendis et al., 2022).

En réaction à ce fort taux de décès, en 2013, l'OMS lance alors un plan global de réduction de mortalité des maladies cardiovasculaires, avec un objectif de 25% de baisse des morts prématurées (décès survenu avant l'âge de 75 ans). Plus de 95% des décès sont attribuables à six causes dont les deux principales sont les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et les cardiopathies ischémiques (Figure 1 et 2).



***Figure 1 : Les causes de mortalité dans le monde selon l'OMS en 2019.***

*Source : Base de données de l'OMS*



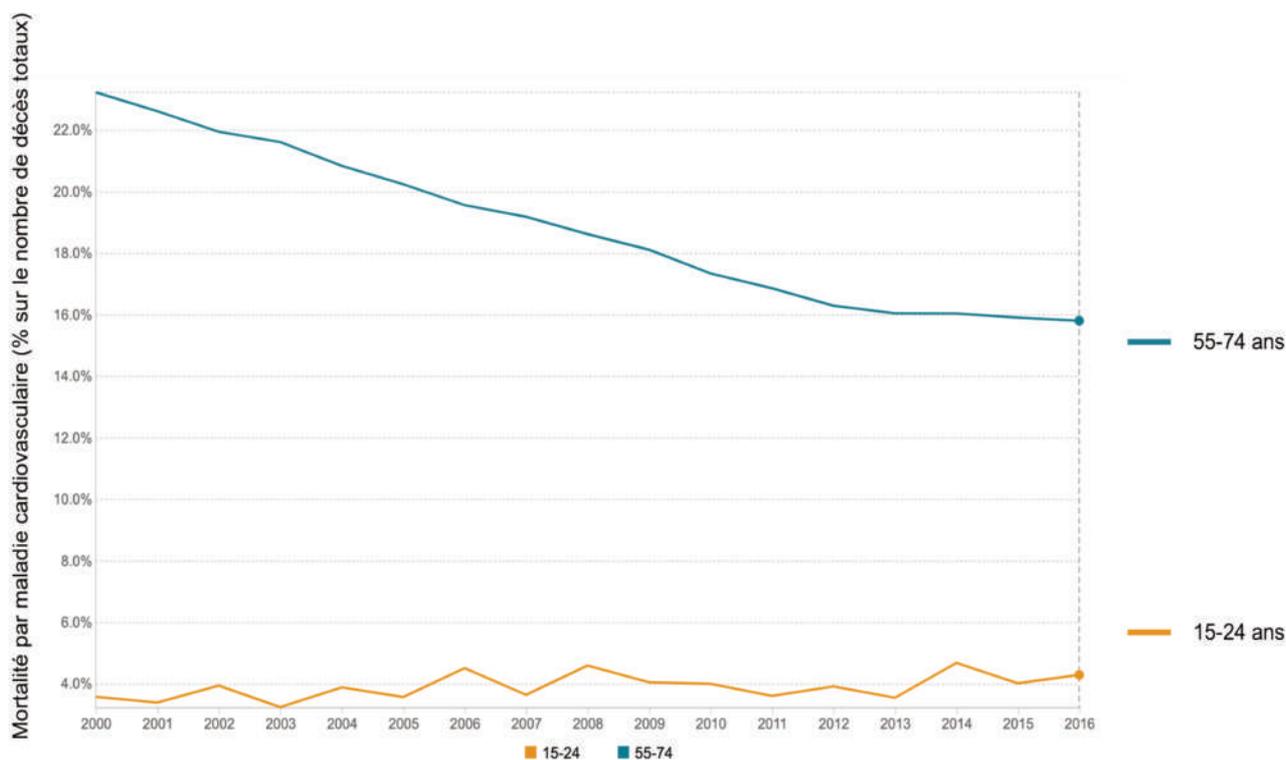
**Figure 2 : Les causes de mortalité parmi les maladies cardiovasculaires entre 2017 et 2019**  
*Source : Base de données de l'OMS*

## 2. Épidémiologie

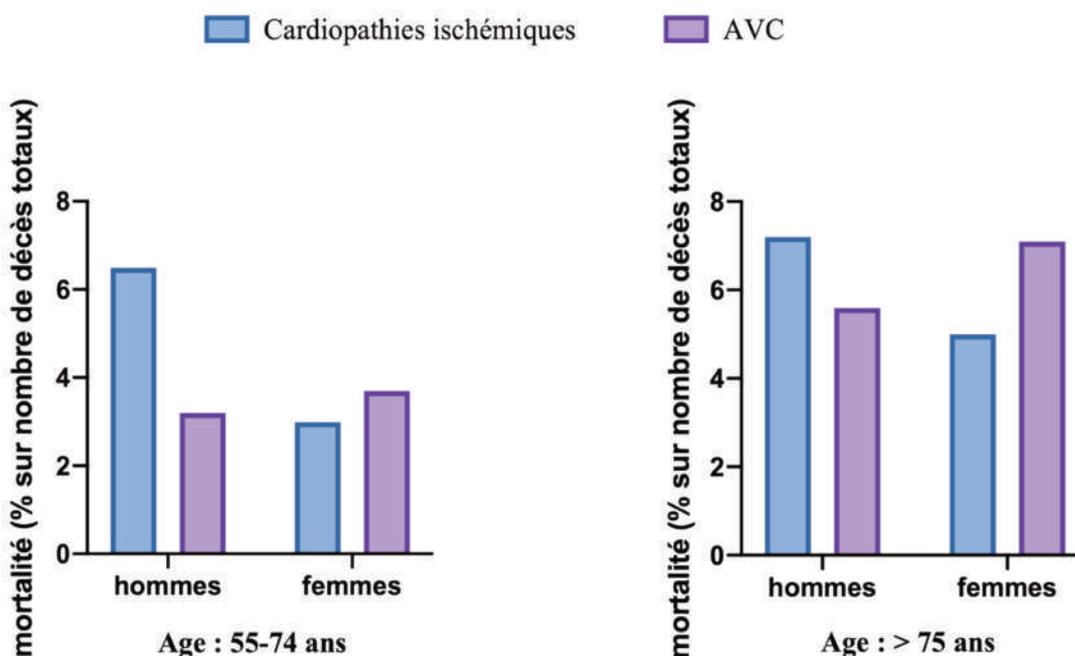
Depuis 30 ans, la prévalence des maladies cardiovasculaires ne cesse d'augmenter, passant de 271 millions de personnes touchées en 1990 à près de 523 millions en 2019 (Roth et al., 2020). Parmi les décès recensés, près des trois-quarts surviennent dans les pays les moins développés, principalement dans le sud et l'est de l'Asie, en partie du fait d'une démographie plus importante dans ces régions et d'une incidence élevée à un âge précoce de cardiopathies ischémiques (Joseph et al., 2017).

En tenant compte des différentes catégories d'âge, un contraste s'établit nettement entre la population dite « jeune » de moins de 30 ans et celle de plus de 50 ans. Alors que dans la première catégorie on note une stagnation, voire une légère augmentation des maladies cardiovasculaires depuis une vingtaine d'années avec des profils à risque sur la pente ascendante (obésité, diabète, tabac, psychotropes), la deuxième enregistre un déclin dans la plupart des pays (Figure 3) (Andersson & Vasan, 2018).

Les maladies cardiovasculaires sont présentes aussi bien chez les hommes que les femmes. Toutefois, l'âge de survenue et les sites touchés varient en fonction du sexe. Par exemple, la prévalence des AVC est plus forte chez les femmes et survient à un âge plus avancé, alors que les ischémies cardiaques touchent préférentiellement les hommes, à un âge plus jeune (Figure 4) (Bots et al., 2017; Leening et al., 2014; George et al., 2015).



**Figure 3 : Evolution de la mortalité par maladie cardiovasculaire entre les années 2000 et 2016 en fonction des catégories d'âge**  
 Source : Base de données de l'OMS



**Figure 4 : Mortalité par cardiopathie ischémique ou AVC selon les catégories d'âge et en fonction du sexe en 2016 en France**  
 Source : Base de données de l'OMS

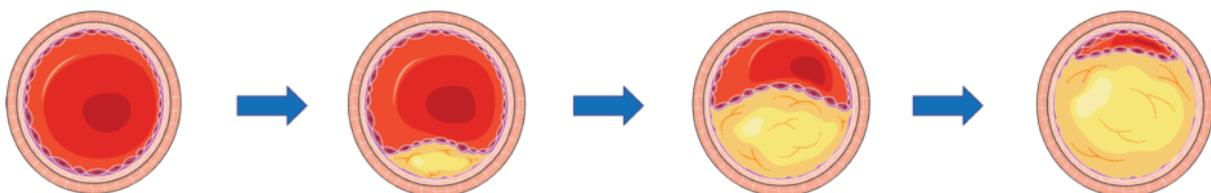
La pierre angulaire de l'incidence des maladies cardiovasculaires reste l'athérosclérose, définie comme des lésions de la paroi artérielle. Elle est l'un des principaux responsables des cardiopathies ischémiques et des AVC.

## B. L'athérosclérose : la maladie des parois artérielles

### 1. Définition

Elle vient du grec « *athêra* » bouillie, gruau (core lipidique nécrotique) et de « *scleros* » dur (chape fibreuse). C'est une maladie affectant la paroi artérielle des vaisseaux, consistant en un remodelage de ses couches les plus internes, à savoir l'intima puis la media (définies au Chapitre I, Partie B, section 3) (Libby et al., 2019).

Elle commence dès les premiers âges de la vie avec une infiltration de lipides au sein de la couche intimale entraînant l'apparition de petites voussures appelées « stries lipidiques » (Stary et al., 1994). Avec le temps, et l'accumulation d'autres facteurs de risque (âge, sexe, ethnie, privation de sommeil, tabagisme, cholestérol, sédentarisation, diabète, génétique, stress, etc.), des glucides complexes, des cellules inflammatoires et des minéraux s'y ajoutent formant des plaques, dites « plaques d'athérome ». Ces dernières grossissent, d'abord de manière latérale, c'est à dire dans la longueur du vaisseaux, puis de manière verticale, perpendiculairement à la paroi avec un épaissement de l'intima (Ikeda et al., 2021; Scipione & Cybulsky, 2022). Elles contribuent alors à l'apparition de la maladie, obstruant la lumière artérielle des grosses et moyennes artères et causant de multiples ischémies voire embolies dans les différents organes (Figure 5).



***Figure 5 : Evolution des plaques d'athérosclérose en fonction du temps***  
*La figure a été en partie créée en utilisant Servier Medical Art, fourni par Servier, placé sous licence Creative Common Attribution 3.0 unported License.*

En fonction du temps et de la rapidité d'évolution de la maladie, la plaque passe par plusieurs stades qui sont bien caractérisés.

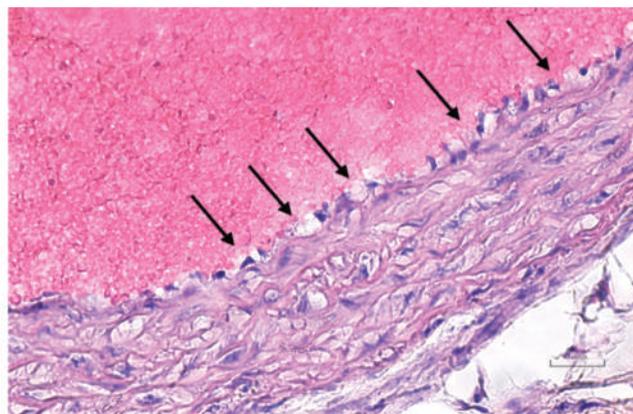
## 2. Le classement des différents stades de plaques d'athérosclérose

Selon l'état d'avancement de la plaque, les risques encourus ainsi que la prise en charge des patients peuvent varier. Ainsi, l'American Heart Association (AHA) a établi pour la première fois en 1994 une classification de l'athérome en différents stades (I à VI). Bien qu'une nouvelle classification ait vu le jour plus récemment en intégrant une composante inflammatoire (Lovett et al., 2004), celle de l'AHA reste largement utilisée (Table 1).

Les lésions avancées se distinguent des lésions précoces par un changement de la composition de leur matrice extracellulaire (MEC) avec une déformation de l'intima et un remodelage de la media et de l'adventice (i.e. les 3 couches anatomiques des vaisseaux définies au Chapitre I, Partie B, section 3) (Stary et al., 1994).

### i. Les lésions de type I

Les lésions de type I, dites microscopiques, sont composées de petits dépôts de lipides au niveau de l'intima, appelées stries lipidiques. Ces dépôts sont phagocytés par des macrophages qui deviennent alors des cellules dites spumeuses, contenant des gouttelettes lipidiques au sein de leur cytoplasme (voir Chapitre I, partie B, section 6-iii). Elles sont présentes dès le plus jeune âge et peuvent évoluer vers des lésions à risque avec le temps (Figure 6).



***Figure 6 : Strie lipidique (lésion de type I ; grossissement x400)***

Les flèches représentent les cellules spumeuses au niveau de l'intima de l'artère qui ont phagocyté les dépôts lipidiques en excès provenant de la circulation sanguine.

## ii. Les lésions de type II

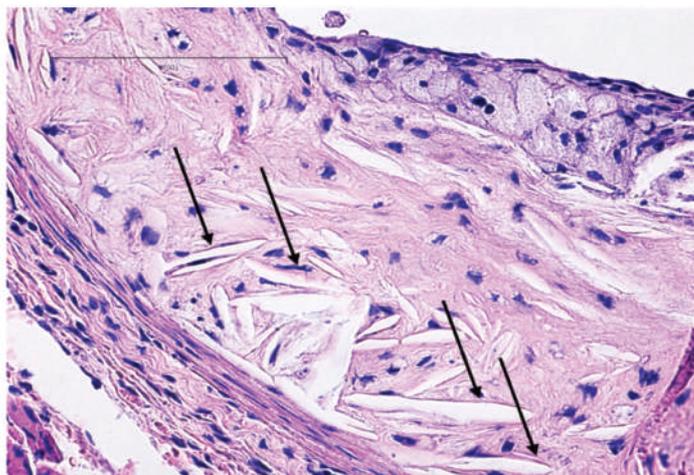
Les lésions de type II comprennent les mêmes dépôts lipidiques que précédemment. Ils sont cette fois macroscopiquement visibles sur la paroi artérielle.

Ces lésions sont divisées en 2 sous-groupes : IIa (lésions progressives) et IIb (lésions non progressives). En effet, parmi les lésions de type II, seule une petite proportion évoluera vers le type III. Leur localisation, la composition de la paroi artérielle, les contraintes mécaniques appliquées et le niveau de lipoprotéines de basse densité (Low Density Lipoprotein [LDL], définies au Chapitre I, Partie B, section 5-i) circulantes expliquent cette différence d'évolution.

La majorité des lésions se localise au niveau de l'aorte ascendante, près des valves ou au niveau des bifurcations artérielles (bifurcations carotidiennes, rénales, iliaques) (Stary et al., 1994).

## iii. Les lésions de type III

Les lésions de type III, « pré athéromateuses », sont des lésions intermédiaires entre celles dites « précoces » et celles dites « avancées ». Les lipides extracellulaires forment des agglomérats visibles au sein de l'intima, mais un core nécrotique (agglomérat de lipides et de débris cellulaires, défini au Chapitre I, Partie B, section 5-iii) ne s'est pas encore développé (Figure 7) (Stary et al., 1994).



***Figure 7 : Pré-athérome (lésion de type III ; grossissement x400)***

Les flèches représentent les agrégats lipidiques au sein de l'intima. Il n'y a pas encore de formation de core nécrotique. On note un épaississement endothélial et un amincissement de la média.

#### iv. Les lésions de type IV et V

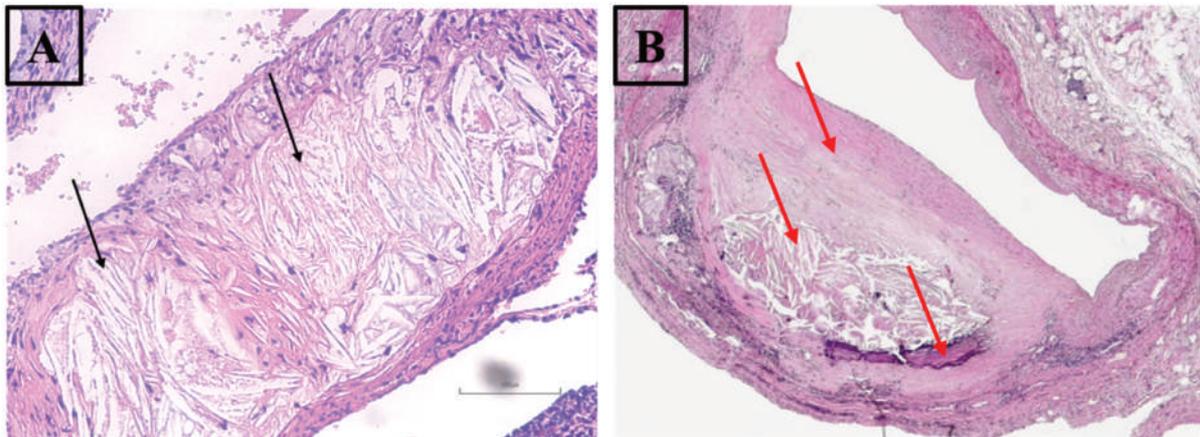
Les lésions de type IV contiennent un core nécrotique bien visible. C'est une lésion dite « athéromateuse ». Les LDL oxydées sont phagocytées par des macrophages ou endocytées par des cellules musculaires lisses et forment un agglomérat de lipides et de débris cellulaires nécrotiques. Elles remplacent petit à petit la matrice extracellulaire.

Lorsqu'une chape fibreuse est visible microscopiquement en périphérie de la lésion, cette dernière passe en type V (Stary et al., 1995).

Les lésions de type V sont classées en trois groupes :

- Va = fibro-athérome
- Vb = fibro-athérome avec calcifications
- Vc = lésion fibreuse sans gouttelettes lipidiques

Les lésions de type IV et V (Figure 8) sont particulièrement à risque de rupture et d'ischémie par déclenchement de la coagulation voire d'embolies. Une néovascularisation se met en place au sein de la plaque et la fragilise, créant parfois des microhémorragies intraplaques (Stary et al., 1995).



***Figure 8 : Athérome avancé (lésions de type IV et Vb)***

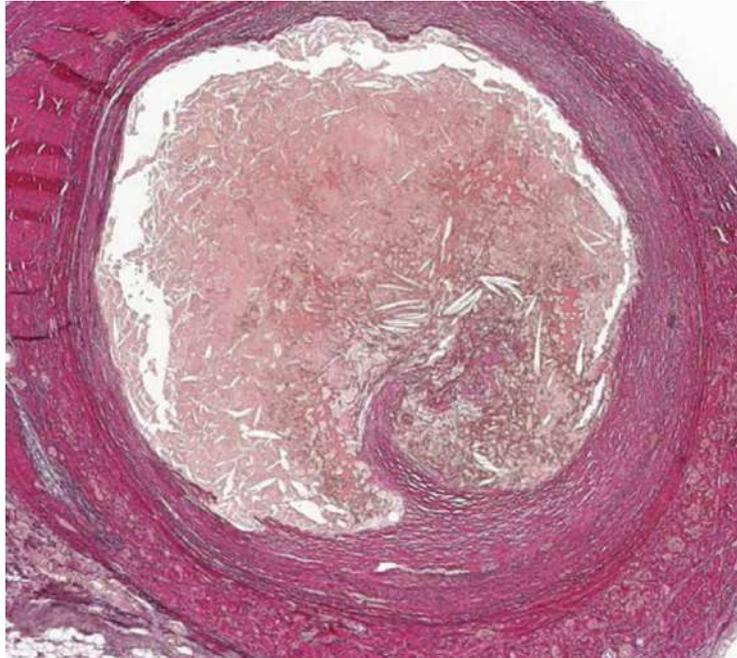
*Adapté de webpathology*

*Source : [pathorama.ch](http://pathorama.ch)*

- A. Lésion de type IV avec formation d'un core nécrotique (flèches noires) et naissance d'une chape fibreuse en surface. B. Lésion de type Vb avec élargissement du core nécrotique, calcifications et chape fibreuse épaisse (flèche rouges)

## v. Les lésions de type VI

Les lésions de type VI sont des lésions de type IV ou V compliquées de rupture (VIa), d'hémorragie (VIb) ou de thrombose (VIc) (Stary et al., 1995).



**Figure 9 : Rupture (Lésion de type VIa)**

Adapté de web pathology

Source : [pathorama.ch](http://pathorama.ch)

Plaque rompue avec exposition du matériel (collagène, lipides, protéoglycanes, glycosaminoglycanes) au sein de la lumière artérielle.

<b>Type I</b>	Macrophages isolés Cellules spumeuses	Croissance par accumulation de lipides	Survenue à partir de l'âge de 10 ans	Cliniquement silencieux
<b>Type II</b>	Inclusions lipidiques	Croissance par accumulation de lipides	Survenue à partir de l'âge de 10 ans	Cliniquement silencieux
<b>Type III</b>	Lésion type II avec petits agglomérats lipidiques	Croissance par accumulation de lipides	Survenue à partir de l'âge de 30 ans	Cliniquement silencieux
<b>Type IV</b>	Lésion de type II avec core lipidique (athérome)	Croissance par accumulation de lipides	Survenue à partir de l'âge de 30 ans	Cliniquement silencieux ou symptomatique
<b>Type V</b>	Core lipidique simple ou multiple avec chape (s) fibreuse (s) avec/sans calcifications, ou exclusivement fibreuse (fibroathérome)	Prolifération des CML avec synthèse de collagène	Survenue à partir de l'âge de 40 ans	Cliniquement silencieux ou symptomatique
<b>Type VI</b>	Rupture, hématome, hémorragie intraplaque, thrombus	Évolution sur thrombose et hématome	Survenue à partir de l'âge de 40 ans	Cliniquement silencieux ou symptomatique

**Table 1 : Classification des stades de plaques d'athérosclérose**  
*Adapté de Stary et al., 1995*

#### vi. Vers une nouvelle classification ?

Les caractéristiques des plaques peuvent varier en fonction du sexe. Par exemple, les femmes, plus fréquemment celles en ménopause précoce, ont des plaques plus stables, plus diffuses et moins propices à la rupture spontanée que les hommes. Mais, in fine, pour chaque individu, la combinaison des facteurs de risques génétiques et épigénétiques, des comorbidités ainsi que des habitudes alimentaires et comportementales entraîne une susceptibilité singulière au développement des plaques d'athérome et à la survenue d'un événement cardiovasculaire. En effet, chaque plaque à chaque stade possède une combinaison génétique, transcriptionnelle et protéomique, particulière qui va conduire à une rupture et une éventuelle ischémie. Il convient donc de l'étudier afin de proposer des modèles diagnostiques et thérapeutiques particuliers (Buono et al., 2021). C'est sur cette base que se sont développées les sciences dites «-omiques» et le séquençage à grande échelle, notamment les analyses en cellule unique (single cell analysis). De nouvelles manières de caractériser les plaques sont alors apparues.

Il est maintenant possible d'identifier des loci génétiques associés aux risques de développer des plaques, des ischémies cardiaques ou des AVC (e.g. HDAC9, SERPINA9, TET2, DNMT3A) mais aussi des profils transcriptomiques relatifs à chaque type cellulaire

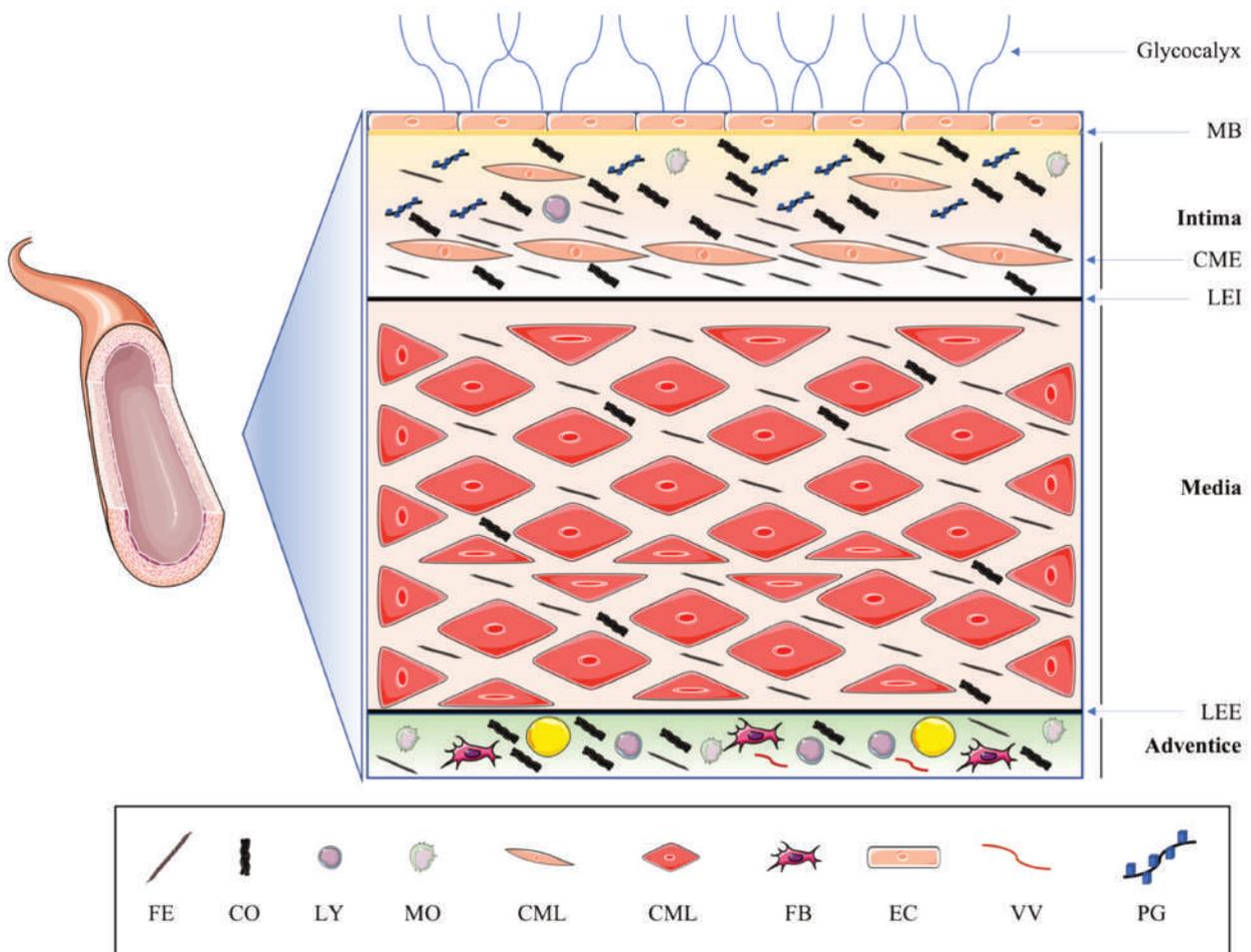
présent au sein des plaques. Ces études génétiques sont appelées études d'association pangénomique (GWAS) et sont complétées de séquençages d'ARN en cellule unique (single cell RNAseq). Elles nécessitent un nombre considérable d'échantillons (Pasterkamp et al., 2022). De même, afin d'obtenir un phénotype plus précis de chaque plaque à un stade différent, on peut identifier sa composition cellulaire, l'origine clonale de ses cellules ainsi que leur caractéristiques, leur plasticité ou encore leur localisation au sein de la lésion (Slenders et al., 2022).

Ces études prometteuses vont permettre au final de mieux caractériser les composants de la paroi vasculaire, de comprendre plus précisément les mécanismes d'évolution des plaques largement explorés jusqu'à présent et de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces nouvelles données doivent toutefois se baser et s'interpréter en fonction des notions fondamentales d'anatomie et de physiopathologie des vaisseaux et de l'athérosclérose connues jusqu'à présent.

### **3. Les différentes couches des vaisseaux**

La paroi des vaisseaux est constituée de trois couches successives : l'intima, la media et l'adventice (Figure 10 et 11). L'épaisseur de chaque couche dépend de la nature du vaisseau (artériole, artère de moyen calibre, artère de gros calibre). De plus, en fonction de la localisation et des contraintes mécaniques appliquées, l'intima peut adapter son épaisseur (Stary et al., 1992).

Les vaisseaux de gros calibre comportent des lames élastiques permettant par exemple le maintien d'une certaine pression sanguine dans la circulation. Ceux de moyen et petits calibres comportent essentiellement des cellules musculaires lisses qui adaptent rapidement le diamètre de la lumière artérielle afin de réguler le débit sanguin (Tegos et al., 2001).



**Figure 10 : Représentation schématiques des différentes couches vasculaires**

*La figure a été en partie créée en utilisant Servier Medical Art, fourni par Servier, placé sous licence Creative Common Attribution 3.0 unported License.*

FE : Fibre élastique ; CO : Collagène ; LY : Lymphocyte ; MO : Monocyte/Macrophage ; CML : Cellule musculaire lisse ; FB : Fibrinogène ; EC : Cellule endothéliale ; VV : Vasa Vasorum ; PG : Protéoglycane ; MB : Membrane basale ; CME : Couche musculo-élastique ; LEI : Limitante élastique interne ; LEE : Limitante élastique externe

### i. L'intima

#### a. Description générale

L'intima forme la première couche de la paroi artérielle au contact de la circulation sanguine. Elle est formée de l'endothélium qui constitue une monocouche de cellules polygonales recouvertes d'un glycocalyx (Figure 10 et 11).

Le glycocalyx joue un rôle important dans la protection de la paroi vasculaire. En effet, il constitue une barrière contre les pathogènes et permet de réguler la perméabilité de l'endothélium. Il est constitué de protéoglycanes, de glycolipides, de glycoprotéines et de

polysaccharides. Ces molécules sont chargées négativement et repoussent en temps normal les plaquettes, les érythrocytes et les leucocytes de la barrière endothéliale ([Buonassisi, 1973](#); [Pries et al., 2000](#); [van den Berg et al., 2006](#)). Dans l'athérosclérose, cette barrière est moins épaisse et la perméabilité est ainsi augmentée ([Xu et al., 2021](#)).

Les cellules endothéliales reposent sur une lame basale composée de fibres de collagène de type IV et V. Au contact de cette dernière se trouve une couche sous endothéliale dont la composition n'est pas vraiment bien définie à ce jour. Basées en majorité sur l'analyse d'images en microscopie électronique sur des aortes ou coronaires humaines, des études relatent que cet espace sous endothélial serait lui-même divisé en deux sous-parties ([Orekhov et al., 2014](#); [Vanderlaan & Reardon, 2005](#); [Stary et al., 1992](#)). Directement sous la lame basale s'étendrait une matrice extracellulaire contenant des protéoglycanes, du collagène, de rares fibres élastiques, quelques cellules musculaires lisses (CML) ainsi que plusieurs types de cellules immunitaires dont des macrophages. En dessous de cette matrice, se trouverait une couche musculo élastique (CME) s'étendant jusqu'à la lame élastique interne et contenant des CML en plus grand nombre, des fibres élastiques ainsi que quelques fibres de collagène (Figure 10 et 11). Les CML de cet espace sous endothélial auraient des caractéristiques différentes de celles de la media, notamment en ce qui concerne leur capacité contractile ([Orekhov et al., 2014](#); [Vanderlaan & Reardon, 2005](#); [Stary et al., 1992](#)).

La lame élastique interne marque la séparation entre l'intima et la media. Cependant, elle n'est pas toujours présente (e.g. au niveau des bifurcations artérielles) ce qui rend alors difficile la distinction entre les différentes couches vasculaires.

L'épaisseur de l'intima n'est pas la même partout et varie en fonction des tensions exercées sur la paroi artérielle ([Paxton et al., 2003](#); [Stary et al., 1992](#)).

### *b. La couche endothéliale*

L'endothélium humain contient 10 milliards de cellules pour 1,5% de la masse totale du corps (Triggle et al., 2012). La cohésion et la communication entre les cellules endothéliales sont assurées par plusieurs jonctions (jonctions serrées, lâches, et adhérentes). Ces dernières sont composées de diverses protéines (e.g. claudines, occludines, E-cadhérines, intégrines, sélectines, desmosomes).

L'endothélium est un acteur clé du mécanisme inflammatoire survenant dans l'athérosclérose. Il peut exprimer à cet effet des molécules d'adhésion, des cytokines, des chimiokines, des facteurs hématopoïétiques ou encore des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH). Il peut jouer un rôle ambivalent dans divers domaines. Il est responsable par exemple de l'activation du complexe protéine C/protéine S (effet anti-coagulant) et de l'exposition du facteur tissulaire à la circulation (effet pro-coagulant) (Jaffe, 1987; Stary et al., 1992). Récemment, de nouveaux gènes ou protéines ont été impliqués dans la régulation des propriétés pro-thrombotiques de ces cellules endothéliales (TXNRD2, ATG7, Sirt1/FOXO1, mir181b et CARD10) (Medina-Leyte et al., 2021).

Pour finir, il module la contraction et la relaxation des CML en fonction des stimuli mécaniques et chimiques (contraintes de cisaillement, norépinéphrine, bradykinine, etc.). Ainsi, il est responsable de la sécrétion de prostacycline (facteur vasodilatateur), de facteurs myorelaxants ou encore de facteurs vasoconstricteurs (thromboxane A2, endothéline-1, oxyde nitrique, facteur d'hyperpolarisation dérivé de l'endothélium) (Medina-Leyte et al., 2021; Stary et al., 1992)

### *c. La matrice extracellulaire (MEC) de l'intima*

Les nutriments essentiels aux cellules endothéliales passent par la MEC de l'intima. Cette dernière est notamment composée de protéoglycanes à des proportions variables (dermatane sulfate, chondroïtine sulfate et héparane sulfate) qui sont importants dans les échanges et la filtration des éléments de la circulation plasmatique vers le reste de la paroi artérielle (Stary et al., 1992).

Les fibres de collagène permettent l'attachement des cellules endothéliales à la MEC. Elles sont classées en plusieurs types, en fonction de la nature et du nombre de chaînes  $\alpha$  qu'elles possèdent. Les plus abondants sont les collagènes de type I et III. Les collagènes de type IV et V se localisent en majorité dans la membrane basale. Le type IV permet la liaison entre les structures collagéniques et non collagéniques (Ricard-Blum, 2011; Stryer et al., 1992).

Enfin, la fibronectine et la laminine font aussi partie intégrante de cette MEC et participent au maintien de l'intégrité de la barrière endothéliale (interaction cellules/matrice ou cellules/cellules). La laminine permet notamment l'attachement des cellules endothéliales au collagène de type IV cité plus haut (Stryer et al., 1992).

## ii. La media

La media est formée de cellules musculaires lisses (CML) entourant les vaisseaux, permettant l'activité contractile et régulant la tension artérielle. Elle est bordée par les lames élastiques interne et externe (Figure 10 et 11).

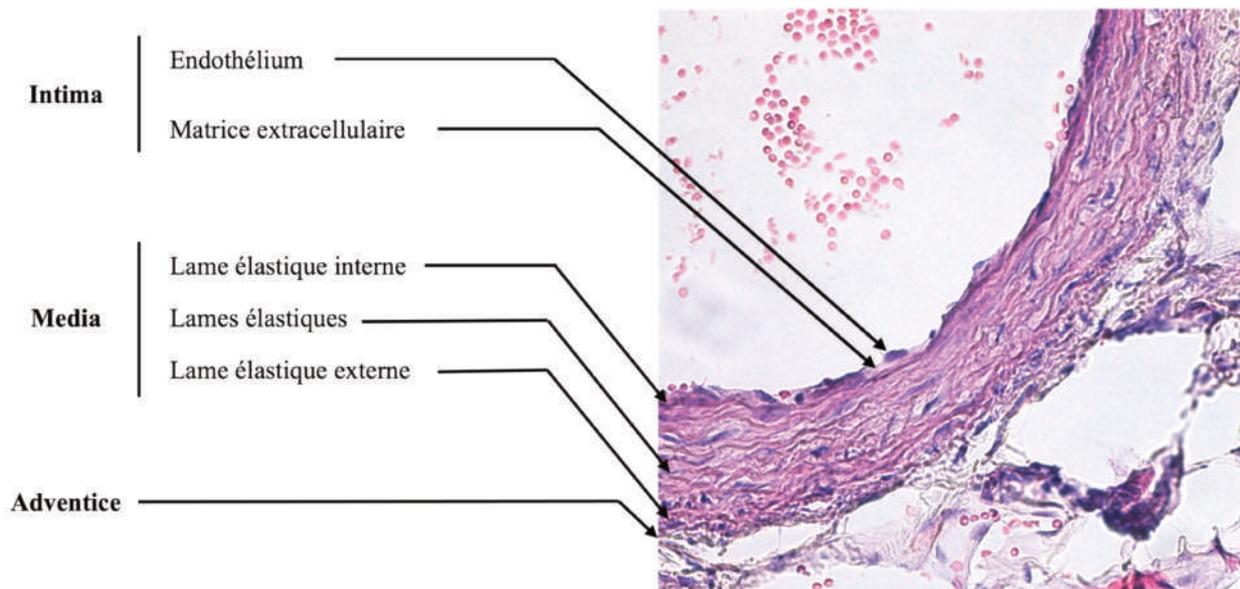
Au niveau des artères de gros calibre, cette media est entrecoupée de fibres de collagènes (de type I et III) ainsi que de nombreuses lames élastiques qui sont composées de tropoélastine sécrétée par les cellules endothéliales et les CML. Plus l'artère est grosse, plus les fibres élastiques sont nombreuses. Le nombre de couches de cellules musculaires varie de 1 à 7 en fonction du calibre de l'artère (Stryer et al., 1992; Tegoni et al., 2001).

## iii. L'adventice

L'adventice est un tissu conjonctif lâche, composé de fibres de collagènes, de fibres élastiques, de cellules adipeuses, de quelques fibroblastes ainsi que de cellules immunitaires (mastocytes, lymphocytes B, lymphocytes T, macrophages et cellules dendritiques). Elle contient le « vasa-vasorum », un réseau vasculaire particulier qui irrigue le tiers externe des vaisseaux et diffuse les éléments plasmatiques nécessaires aux échanges cellulaires. En effet, la paroi vasculaire en elle-même a besoin d'être vascularisée afin de garantir la survie des

cellules qui la composent. Les deux-tiers internes de la paroi sont suppléés par diffusion directe des éléments plasmatiques de la circulation principale (Figure 10 et 11).

Le réseau lymphatique se trouve également dans l'adventice afin d'acheminer rapidement des cellules immunitaires (Stary et al., 1992; Tegos et al., 2001). Il existe notamment un lien entre l'inflammation de cet adventice et le développement de l'athérosclérose. En effet, il a été montré que des leucocytes pouvaient former à ce niveau des structures dites organes lymphoïdes tertiaires aortiques (ATLO) chez la souris (Liu et al., 1997). Ces mêmes ATLO ont été trouvés chez l'humain, proches des coronaires, et ont été classés en 3 stades en fonction du type et de la quantité de cellules inflammatoires (Akhavanpoor et al., 2018; Gräbner et al., 2009). Ils contiennent une large population de lymphocytes T régulateurs ainsi que des lymphocytes B. Chez la souris ApoE<sup>-/-</sup>, un modèle d'étude murin d'athérosclérose (défini dans le Chapitre II, Partie C, section 2), les ATLO ne se développent qu'au niveau des plaques d'athérome de l'aorte abdominale mais leur réelle implication reste encore à documenter (Gräbner et al., 2009). Ils communiqueraient avec les CML via le récepteur à la lymphotoxine  $\beta$  et la sécrétion de diverses cytokines et chimiokines (CXCL13, IL-7, ligand de la chimiokine 21) afin de recruter des cellules inflammatoires. Ces dernières pourraient participer à la fragilisation des plaques en stimulant la néovascularisation du vasa-vasorum et en dégradant les fibres élastiques (Gräbner et al., 2009; Tinajero & Gotlieb, 2020).



***Figure 11 : Histologie de la paroi aortique d'une souris***  
*Coloration Hématoxyline/Éosine*

Les 3 couches vasculaires décrites ci-dessus s'articulent autour d'un réseau fibrillaire conférant à la paroi une certaine résistance afin de distribuer le flux sanguin aux divers organes en aval.

#### 4. La résistance de la paroi artérielle

L'une des particularités du tissu vasculaire, tout comme celui de la peau, est son élasticité, essentielle dans le maintien de la tension artérielle.

Les fibres élastiques font partie intégrante de la paroi des vaisseaux et jouent un rôle important dans la physiologie. Elles sont composées d'élastine et de microfibrilles formant des polymères résistants. Leur rôle est de permettre une légère déformation des artères pour maintenir une certaine pression sanguine vers les organes tout en évitant des dommages irréversibles aux cellules endothéliales. Elles contribuent alors grandement à la résistance de la paroi artérielle. Par ailleurs, elles participent aussi à la constitution de la membrane basale en entourant les cellules musculaires lisses tout comme le collagène de type IV (Adeva-Andany et al., 2021; Cocciolone et al., 2018).

L'élastine, composant essentiel des fibres élastiques, est une protéine de la matrice extracellulaire qui permet l'élasticité. Sa demi-vie est d'environ 70 ans et son stock n'a alors plus besoin d'être renouvelé à l'âge adulte. Elle est codée par un gène mesurant environ 45kb, qui contient 34 exons et qui est situé sur le chromosome 7 (Rucker & Tinker, 1977; Shapiro et al., 1991; Szabó et al., 1999). Ce gène est régulé négativement par diverses molécules telles que le  $TNF\alpha$ , l'AMP cyclique, la vitamine D, l'acide ascorbique ou encore le facteur de croissance des fibroblastes (FGF). Il est régulé positivement entre autres par le facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (IGF-1), le fer trivalent ou encore le facteur de croissance transformant  $\beta$  ( $TGF\beta$ ). Ce dernier joue aussi un rôle important dans le remodelage de la MEC et la progression des plaques d'athérosclérose (Arribas et al., 2006; Cocciolone et al., 2018).

La tropoélastine est le précurseur de l'élastine. Elle est produite par les CML de la media, les cellules endothéliales ainsi que par les fibroblastes de l'adventice. Cette protéine contient de nombreux domaines hydrophobes, avec des séquences « VGVAPG » (valine-

glycine-valine-alanine-proline-glycine) riches en valine et glycine qui sont les principales responsables de l'élasticité (Karnik et al., 2003). Elle comporte de la proline, toutefois en quantité moins importante que dans le collagène. Cette proline, comme nous le verrons plus tard, intervient dans le métabolisme du glutamate.

Grâce à ses propriétés hydrophobes et sous l'impulsion d'enzymes telles que les lysyl oxydases (LOX et LOXL-1), la tropoélastine peut former des polymères d'élastine et s'associer avec des microfibrilles qui sont composées en majorité de fibrillin-1 et 2. Cette association forme les fibres élastiques (Arribas et al., 2006; Cocciolone et al., 2018).

La dégradation des fibres élastiques se fait sous le contrôle d'une douzaine d'enzymes appelées élastases qui sont sécrétées par les neutrophiles, macrophages ou encore les CML (e.g. Ela-2, CatG ou PR-3). Par ailleurs, les métalloprotéinases (MMP), enzymes chargées en temps normal du remodelage de la MEC, peuvent aussi dégrader les fibres élastiques. Du collagène et des protéoglycanes vont alors remplacer ces fibres élastiques dégradées et la MEC va se rigidifier et se réorganiser (Cocciolone et al., 2018).

Le métabolisme des fibres élastiques fait particulièrement l'objet d'études dans le cadre des maladies cardiovasculaires et de l'athérosclérose (Adeva-Andany et al., 2021). La principale caractéristique retrouvée au niveau des lésions athéromateuses est la perte d'élasticité de la paroi avec fragmentation des fibres ainsi qu'un ratio élastine/collagène très bas, indiquant une rigidité plus importante des vaisseaux. Plus précisément, au niveau des plaques d'athérosclérose, on note une augmentation de la synthèse de tropoélastine parallèlement à une augmentation de son catabolisme. Ceci est certainement dû à l'activité macrophagique forte dans ces lésions. En effet, les macrophages sont capables par eux-mêmes de produire et de dégrader le précurseur de l'élastine. Toutefois, l'augmentation de synthèse de tropoélastine s'avère inefficace car l'assemblage final est défectueux. La desmosine, l'isodesmosine et la lysine, qui sont les molécules responsables des ponts formant les polymères élastiques, sont effectivement diminués dans les lésions athéromateuses. Ce processus est accéléré avec la sévérité de l'athérosclérose. La dégradation des fibres élastiques au niveau des plaques aura pour conséquence une exacerbation de l'inflammation avec une rigidification des parois artérielles ainsi qu'une infiltration facilitée des lipides. L'hypertension qui est un facteur de risque cardiovasculaire entraîne les mêmes effets sur l'élastine que l'athérosclérose en elle-même, i.e. une augmentation de synthèse inefficace avec perte qualitative des fibres par défaut en desmosine (Adeva-Andany et al., 2021; Krettek

et al., 2003). D'un point de vue plus clinique, chez les personnes obèses, on note une augmentation de l'activité des élastases et une baisse de l'activité des lysyl oxydases (LOX), ce qui suggère comme évoqué précédemment un catabolisme plus important des fibres élastiques ainsi qu'une altération de la qualité de ces fibres par défaut d'assemblage.

L'activité des élastases entraîne une surproduction de peptides dérivés de l'élastine, encore appelés élastokines. Or, ces peptides ont un rôle biochimique essentiel dans les maladies cardiovasculaires. Par exemple, chez la souris, une simple injection de ces peptides contribue à l'augmentation de la taille des plaques et joue un rôle dans l'inflammation et la diapédèse des macrophages (Arribas et al., 2006; Cocciolone et al., 2018; Fhayli et al., 2019; Krettek et al., 2003). De plus, ils sont aussi retrouvés chez des patients atteints d'hypertension, d'artériopathie des membres inférieurs, de diabète ou encore de cardiopathie ischémique. Ils semblent jouer un rôle dans la production de l'oxyde nitrique (NO) par les cellules endothéliales et de celle des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) qui contribuent notamment à l'oxydation des LDL. Par ailleurs, ils participent à la prolifération et à la migration des CML et des leucocytes, notamment de par leur effet chimio-attractif (Maurice et al., 2013).

La résistance artérielle aux contraintes exercées sur la paroi est due non seulement aux fibres élastiques mais aussi au collagène. L'aorte humaine normale contient 24% de fibre de collagène, dont les type I, III et IV représentent près de 99% (Adeva-Andany et al., 2021). Les collagènes de type I et III, les plus abondants, se localisent au niveau de la media, le type III se trouvant préférentiellement en périphérie des fibres élastiques. Les collagènes de type IV et V entourent les cellules musculaires lisses ainsi que les cellules endothéliales et forment une membrane basale. Enfin, le collagène de type II, très rare (1% des fibres) est aussi retrouvé au niveau de la media (Kuzan et al., 2017).

Les protéoglycanes et les glycoprotéines sont les derniers acteurs de la résistance de la paroi artérielle. Dans l'hypertension, on note alors non seulement une augmentation de la synthèse de collagène et d'intégrines mais aussi de protéoglycanes et de glycoprotéines ayant pour effet un épaississement pariétal. (Adeva-Andany et al., 2021).

Toutes ces caractéristiques anatomiques, physiques et chimiques de la paroi artérielle vont être modifiées sous l'influence de nombreux facteurs de risques qui font le lit du développement des plaques.

## **5. L'initiation et la progression de la plaque**

L'initiation et la progression d'une plaque se fait en plusieurs phases distinctes. La dyslipidémie, conjointement avec divers autres facteurs de risque cardiovasculaire va entraîner une dysfonction endothéliale. Ce processus induira le développement de l'athérome avec une phase pro-inflammatoire, une phase de stabilisation puis une phase de rupture qui entraînera une ischémie d'organe.

### *i. La dyslipidémie*

La dyslipidémie désigne un état pathologique où le métabolisme lipidique qualitatif et quantitatif est perturbé avec des taux de cholestérol, de triglycérides ou d'acides gras libres anormaux. Dans les maladies cardiovasculaires et dans le syndrome métabolique (défini au Chapitre I, partie C), cette dyslipidémie est caractérisée par une hypercholestérolémie à lipoprotéines de basse densité (LDL) et/ou une hypertriglycéridémie et/ou une hypocholestérolémie à lipoprotéines de haute densité (HDL). Elle est, la plupart du temps, due à un apport trop riche en lipides provenant de l'alimentation et à l'insulinorésistance qui se met en place (Figure 12).

Le métabolisme lipidique est complexe et comporte deux voies différentes : une voie exogène et une voie endogène.

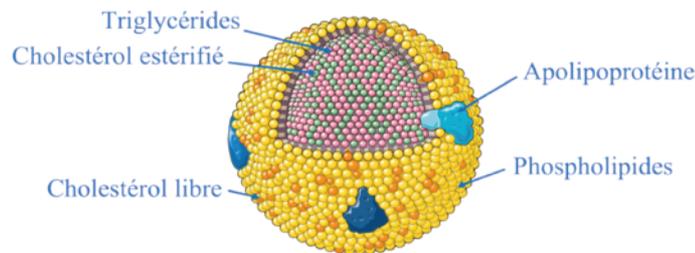
#### *a. La voie exogène*

Après l'ingestion alimentaire, lors du processus de digestion, et en présence de sels biliaires sécrétés par le foie, des acides gras libres, des vitamines liposolubles, du cholestérol et des phytostérols vont se regrouper sous forme de micelles afin d'être transportés dans la lumière intestinale. Ils vont par la suite être endocytés par les entérocytes.

En raison de leur caractère hydrophobe, les lipides doivent être transportés dans la circulation sanguine sous forme de lipoprotéines. Ces dernières sont des particules amphiphiles formées d'une membrane hydrophile et d'un cœur hydrophobe. Elles portent une ou plusieurs apolipoprotéines leur permettant d'interagir avec les différentes enzymes et organes à proximité (Breslow, 1996; Smith et al., 1978). Leur composition complexe est résumée dans la table 2.



	Chylomicron	VLDL	IDL	LDL	HDL
Densité (g/mL)	< 0,95	0,95-1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,210
Taille (nm)	75-1200	30-80	25-35	18-25	5-12
Lipides majoritaires	TG	TG-PL-CE	TG-CE	C-CE-PL	PL-CE
Apolipoprotéines	B48-AI-AII-AIV-C-E	B100-CI-CII-CIII-E-F-O	B100-CI-CII-E	B100-O	AI-AII-AIV-AV-CI-CII-CIII-LI-M-D-O-J



**Table 2 : Représentation schématique des lipoprotéines et composition**

*La figure a été en partie créée en utilisant Servier Medical Art, fourni par Servier, placé sous license Creative Common Attribution 3.0 unported License*

PL : Phospholipides ; CE : Cholestérol estérifié ; TG : Triglycérides C : Cholestérol

Les entérocytes sécrètent l'apolipoprotéine apoB-48. Celle-ci est associée aux lipides endocytés de la lumière intestinale et va former des « chylomicrons » qui sont les particules lipidiques essentielles de la voie exogène. Ces lipoprotéines contiennent en majorité des triglycérides ainsi qu'un peu de cholestérol estérifié et des vitamines liposolubles (Feingold, 2000). Les chylomicrons ne passent pas par la veine cave mais par le canal thoracique, ce qui

leur permet de contourner le foie et d'accéder directement à la circulation sanguine. A proximité du cœur, des muscles et du tissu adipeux, la lipoprotéine lipase (LPL) va hydrolyser les triglycérides de ces particules afin de libérer des acides gras libres et les distribuer aux organes d'intérêt. Les chylomicrons deviennent ainsi de plus en plus petits car leur cœur hydrophobe se réduit. Ils acquièrent une nouvelle apolipoprotéine, l'apoE, au cours d'échanges avec d'autres lipoprotéines circulantes (e.g. les HDL), qui va leur permettre d'être captés par le foie. Ils sont alors appelés remnants et vont être reconnus par les récepteurs hépatiques aux LDL (LDL-R) afin de distribuer leur contenu lipidique (Figure 12) (Feingold, 2000).

### *b. La voie endogène*

Dans le foie, une nouvelle apolipoprotéine est produite : l'apoB-100. Elle va s'associer en majorité avec des triglycérides et un peu de cholestérol estérifié hépatique afin de produire de nouvelles particules lipidiques appelées « lipoprotéines de très basse densité » ou VLDL. Ces lipoprotéines, tout comme les chylomicrons vont circuler vers les organes d'intérêt et distribuer leur contenu hydrophobe.

La LPL va hydrolyser le contenu de ces VLDL qui vont perdre leur taille initiale et être appelées des « lipoprotéines de densité intermédiaire » ou IDL (Olivecrona, 2016). Ces dernières vont être réduite en « lipoprotéine de basse densité » ou LDL par la lipase hépatique (HL). Les VLDL, tout comme les IDL et les LDL peuvent aussi échanger leur contenu en triglycérides et phospholipides contre du cholestérol estérifié provenant d'autres lipoprotéines tels que les HDL. Cet échange est médié par l'intermédiaire d'enzymes telles que la protéine de transfert des phospholipides (PLTP) ou la protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP) (Feingold, 2000; Ha et al., 1981). Cette dernière peut organiser de même un transfert de cholestérol estérifié entre les VLDL et LDL. Les lipases hydrolysent les triglycérides des lipoprotéines en acides gras libres qui vont être distribués le long du transport. Toutefois, elles ne métabolisent pas le cholestérol estérifié qui reste et se concentre au maximum dans les LDL finaux (Figure 12) (Feingold, 2000). Lorsque ces petites particules lipidiques vont être en concentration importante dans la circulation sanguine, elles vont pouvoir être captées par les cellules endothéliales et infiltrer l'intima des artères. Piégées par les protéoglycanes de la matrice extracellulaire, les LDL vont être oxydés et déclencher un stress oxydatif qui va entraîner une dysfonction endothéliale ainsi qu'une réaction inflammatoire (Feingold, 2000).

### *c. Le transport inverse du cholestérol et les HDL*

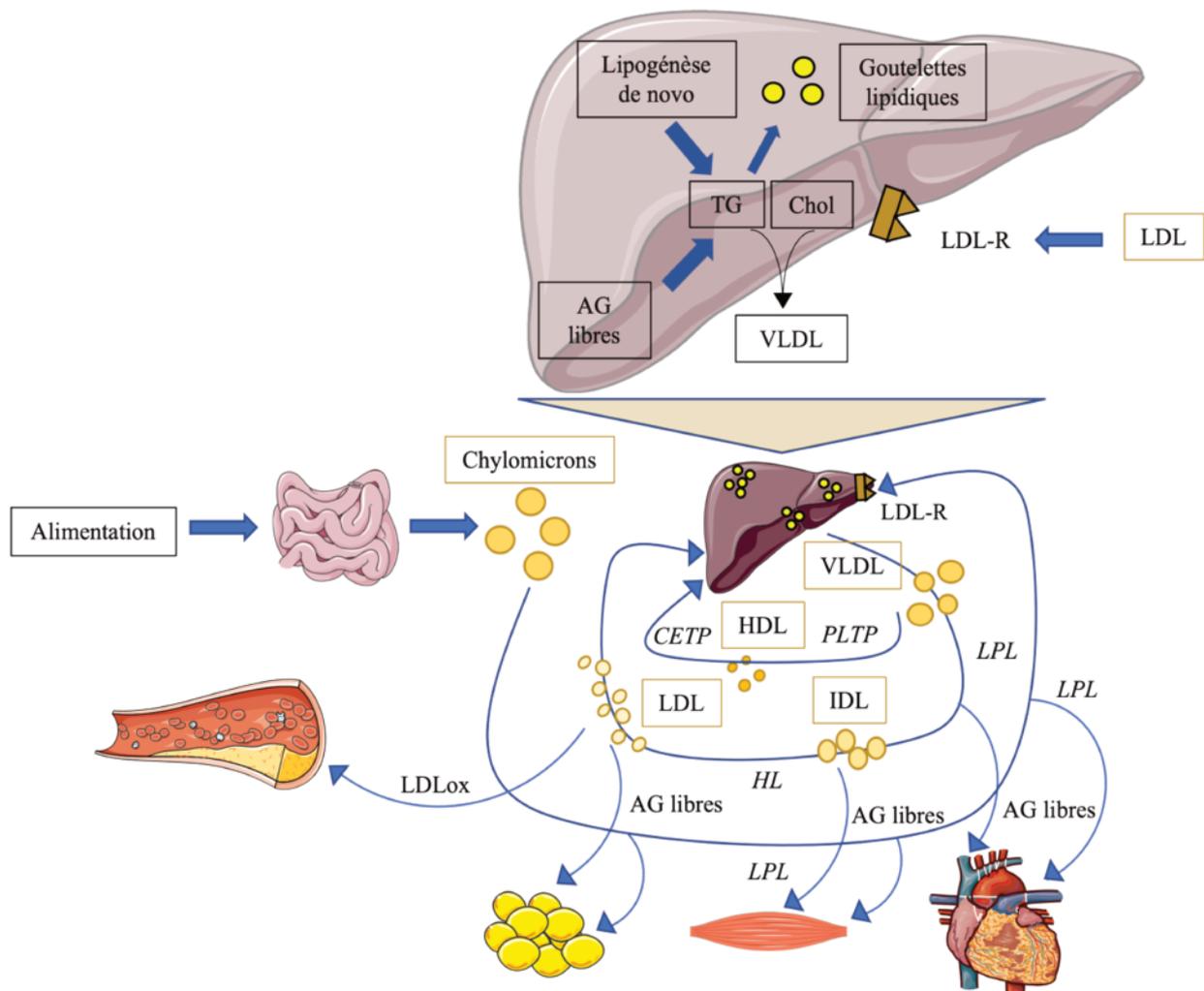
Le transport inverse du cholestérol (Reverse Cholesterol Transport, RCT) est un des éléments clés de la régulation de la lipémie. Il est médié en majorité par les HDL mais un mécanisme d'efflux par les entérocytes a aussi été mis en lumière. Le RCT est notamment dysfonctionnel chez les patients obèses ([Sasahara et al., 1998](#)).

Les lipoprotéines de haute densité (High density lipoprotein [HDL]) varient de 7 à 12 nm ([Wang & Smith, 2014](#)). Elles sont caractérisées par la présence d'une apolipoprotéine A1 (Apo-A1). Celle-ci est sécrétée par le foie ainsi que par les intestins. Après interaction avec un transporteur de la famille ABC (ATP-Binding Cassette A1 [ABCA1]) sécrété par les hépatocytes, les entérocytes et les macrophages, l'apo-A1 va s'enrichir en cholestérol libre pour former une particule discoïde appelée pré- $\beta$ HDL. Un second passage vers les récepteurs ABCG1 (ATP-Binding Cassette G1) et SR-B1 (Scavenger Receptor B1) sur les macrophages va permettre de renforcer l'efflux de cholestérol ([Tall & Yvan-Charvet, 2015](#)). Au contact d'une enzyme appelée lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT), qui convertit le cholestérol libre en cholestérol estérifié, la particule pré- $\beta$ HDL va former une HDL sphérique. En effet, l'estérification du cholestérol aura pour effet la formation d'un cœur hydrophobe ([Marques et al., 2018](#)). Cette nouvelle particule lipidique va au fur et à mesure de son passage dans la circulation moduler son contenu en triglycérides en interagissant avec la CETP et les autres lipoprotéines (VLDL, LDL et IDL) comme évoqué précédemment (Figure 12). En promouvant de plus l'efflux cellulaire de cholestérol au contact des adipocytes via ABCA1 ou SR-B1 ([Y. Zhang et al., 2010](#); [T. Zhang et al., 2019](#)), elle crée un équilibre dynamique contribuant à l'homéostasie du cholestérol. Retournée au niveau du foie et captée par les récepteurs SR-B1 hépatiques ([Acton et al., 1996](#)), elle va permettre au cholestérol d'être évacué par la sécrétion biliaire vers le système digestif, ce qui justifie sa fonction athéroprotectrice ([Zhang et al., 2019](#)). A l'inverse des LDL, le taux de HDL est corrélé négativement avec la survenue des maladies cardiovasculaires ([The Emerging Risk Factors Collaboration\\*, 2009](#)). En effet, en plus de leur fonction athéroprotectrice, les HDL possèdent des propriétés anti-inflammatoires, antithrombotiques et antioxydantes ([Pirillo et al., 2019](#); [Zhang et al., 2019](#)). Par ailleurs, il existe une hétérogénéité de composition entre les particules HDL ([Mendivil et al., 2016](#)). Ainsi le taux de cholestérol HDL (HDL-C) ne corrèle pas forcément avec le nombre de lipoprotéines en circulation. Il est ainsi évoqué de plus en plus

que le risque cardiovasculaire est relié aux nombre et à la qualité des lipoprotéines plutôt qu'au taux de HDL-C (He et al., 2018).

L'excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE) a été mis en lumière assez récemment à la suite de plusieurs travaux chez la souris (Le May et al., 2013; van der Velde et al., 2008). Ce mécanisme permet au cholestérol des HDL et LDL d'être excrété dans la lumière intestinale. Chez l'homme, ce mécanisme est responsable de 35% de l'excrétion du cholestérol et est fortement influencé par la prise d'Ézetimibe, un traitement hypolipémiant (Le May et al., 2013; van der Velde et al., 2008).

Lorsque l'homéostasie lipidique est perturbée et que la balance production/élimination des lipoprotéines n'est plus équilibrée, la dyslipidémie s'installe. Cette dernière, en présence d'autres facteurs de risque cardiovasculaire conduit à une dysfonction endothéliale.



**Figure 12 : Métabolisme des lipoprotéines**

*D'après Feingold et al., 2000 et Heeren et al., 2021*

*La figure a été en partie créée en utilisant Servier Medical Art, fourni par Servier, placé sous licence Creative Common Attribution 3.0 unported License.*

AG : Acides gras ; LDLox : LDL oxydées ; LDL-R : Récepteur aux LDL ; Chol : Cholestérol ; TG : Triglycérides

## ii. La dysfonction endothéliale

Lors de l'initiation de la plaque d'athérome, la dysfonction endothéliale est l'un des premiers éléments qui entre en jeu. Elle se produit lorsque l'on atteint un état de déséquilibre entre la production de vasodilatateurs/molécules anti-inflammatoires et les stimuli vasoconstricteurs/pro-inflammatoires de l'endothélium et des monocytes (Medina-Leyte et al., 2021; Xu et al., 2021). A cet effet, l'endothélium va rentrer dans un état pathologique et devenir plus perméable sous l'influence de nombreux facteurs extracellulaires :

- Hémodynamique (hypertension)
- Chimique (oxydation des LDL et des VLDL, glycémie sanguine élevée)
- Immunologique (complexes immuns)

- Infectieux (virus)
- Extérieurs (tabac)
- Hormonaux (ménopause)

Parmi les facteurs cités ci-dessus, les LDL circulants font partie des paramètres les plus importants car ils sont indispensables à la formation des plaques. Une concentration de LDL supérieure à 0,8 mmol/L commence par ailleurs à être délétère pour l'intima (Scipione & Cybulsky, 2022). Tous les autres facteurs vont néanmoins contribuer à créer un environnement avec un stress oxydatif délétère pour l'endothélium.

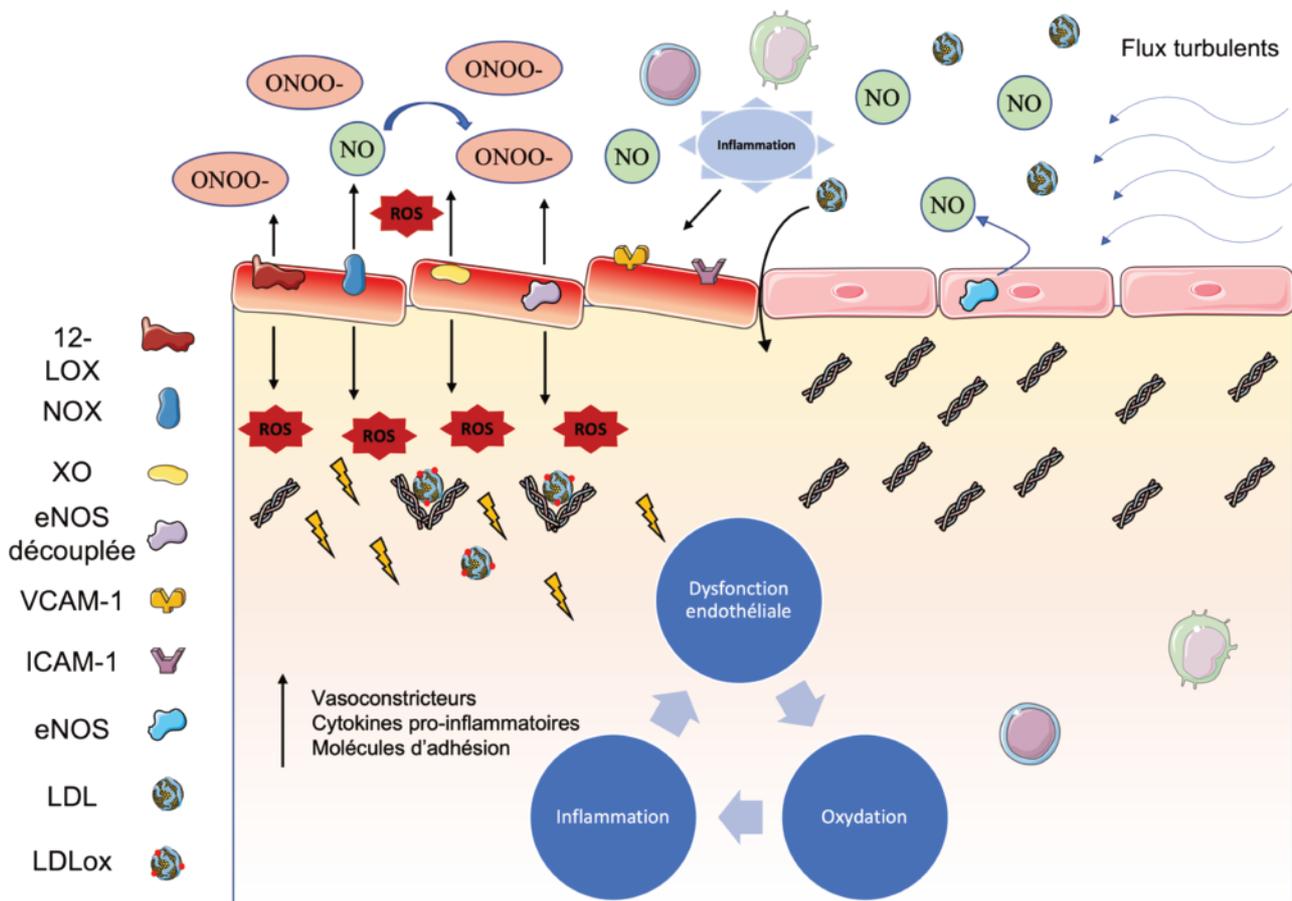
Les échanges au niveau de la barrière endothéliale se font par transcytose ou trafic intercellulaire et dépendent d'une multitude de paramètres (taille et charge des protéines, tension artérielle, localisation sur l'arbre vasculaire, tonus vasculaire, âge du sujet) (Stary et al., 1992). Les cellules endothéliales sont perméables aux protéines plasmatiques (Lampugnani, 2012; Michiels, 2003; Mundi et al., 2018), ainsi les LDL peuvent accéder à l'intima. Elles transitent alors soit par les jonctions intercellulaires, soit par transcytose par l'intermédiaire de plusieurs protéines (cavéoline 1, ALK1, DOCK4, LDL-R ou SR-B1) (Scipione & Cybulsky, 2022; Xu et al., 2021). Il a été montré à cet effet qu'une délétion conditionnelle de SR-B1 chez une souris hypercholestérolémique conduisait à la réduction de la taille des plaques (Huang et al., 2019; Scipione & Cybulsky, 2022).

Une fois le passage de la barrière effectuée, les LDL sont captées par les protéoglycanes, les fibres élastiques et le collagène de la matrice extracellulaire pour former des complexes. L'ApoB100 permet entre autres l'interaction électrostatique des LDL avec les protéoglycanes (Boren et al., 1998). Sous l'influence de l'accumulation de ces lipoprotéines et des autres facteurs de risques cardiovasculaires potentiellement associés, notamment l'hypertension artérielle, la barrière endothéliale va alors commencer à sécréter plusieurs enzymes. La lipoxigénase, l'oxyde nitrique synthase, la NADPH oxydase ou encore la xanthine oxydase endothéliale vont créer des espèces dérivées de l'oxygène (ROS) et oxyder les particules lipidiques présentes au sein ou au contact de l'intima. De plus elles vont transformer l'oxyde nitrique (NO) vasculaire en peroxynitrite (ONOO-) (Figure 13).

Le NO permet la vasodilatation des vaisseaux, inhibe l'adhésion leucocytaire, l'agrégation plaquettaire ainsi que la prolifération des cellules musculaires lisses. C'est

l'oxyde nitrique synthase, l'une des enzymes évoquée ci-dessus et sécrétée par l'endothélium qui permet sa production en temps normal (Morrow et al., 2003; Negre-Salvayre et al., 2020). Cependant, lors de l'accumulation des LDL dans l'intima, celle-ci va rentrer dans un processus dit de « découplage » et former des anions superoxydes qui vont participer à la production de ONOO<sup>-</sup> et à la baisse de synthèse du NO (Figure 13) (Incalza et al., 2018). Par ailleurs, d'autres molécules vasoconstrictrices (AngII, TXa2 et ET-1) vont être sécrétées par les cellules endothéliales et provoquer un déséquilibre avec des facteurs vasodilatateurs (H<sub>2</sub>S, CO, métabolites de l'acide arachidonique, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Incalza et al., 2018; Xu et al., 2021).

Pour finir, une partie des LDL oxydées peuvent aussi traverser la media des artères et former des inclusions lipidiques qui au fil du temps vont grossir et devenir visibles macroscopiquement.



**Figure 13 : Mécanismes de la dysfonction endothéliale**

*La figure a été en partie créée en utilisant Servier Medical Art, fourni par Servier, placé sous licence Creative Common Attribution 3.0 unported License.*

12-LOX : 12-lipoxygénase ; NOX : NADPH oxydase ; XO : Xanthine Oxydase ; eNOS : Oxyde nitrique synthase endothéliale ; LDLox : LDL oxydée ; VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1 ; ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule

La localisation sur l'arbre vasculaire est aussi un élément clé de la dysfonction endothéliale. Tout le processus décrit ci-dessus (de l'infiltration des LDL à la sécrétion des facteurs vasoconstricteurs) est facilité dans des zones dites « propices » au développement de l'athérome. Ces zones propices regroupent les régions accueillant des flux sanguins turbulents (bifurcations artérielles) ou au contraire complètement stagnants. Dans les zones stagnantes, ce sont probablement les forces de tension ainsi que le contact prolongé des LDL et d'éventuelles substances toxiques avec la paroi artérielle qui seront délétères et qui faciliteront tous les mécanismes vu précédemment (Tegos et al., 2001). En comparant les zones sujettes au développement de l'athérosclérose avec des zones résistantes, dans des conditions hypercholestérolémiques ou hypertriglycéridémiques, on constate notamment qu'il existe des différences en terme de métabolisme, d'épigénétique et de structure de l'endothélium. Par exemple, le glycocalyx est plus épais et moins perméable au niveau des zones résistantes. De plus on y trouve une expression augmentée des facteurs transcription Kruppel-like factors 2 et 4 (KLF2 et KLF4), impliqués dans nombre de processus homéostasiques cellulaires (prolifération, migration, etc.) (Atkins & Simon, 2013; Koo et al., 2013). Au contraire, dans les zones propices au développement de l'athérosclérose, c'est plutôt NF $\kappa$ B, impliqué dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 (défini à la partie C section 4 de ce chapitre), qui est exprimé au niveau des cellules endothéliales. L'apoptose et le renouvellement cellulaire y sont aussi plus importants (Tabas et al., 2015; Xu et al., 2021; Atkins & Simon, 2013). Il est à noter toutefois que même dans des conditions normales, sans dyslipidémie, une différence entre les deux types de zone s'observe déjà au niveau transcriptionnel dans les cellules endothéliales. Par exemple, dans les zones propices à l'athérosclérose, on a une régulation positive de Rela, VCAM-1, E-sélectine, de cytokines pro-inflammatoires comme TNF $\alpha$  ou Il1 $\beta$  alors que Nos3 est régulé négativement, ce qui n'est pas le cas dans les zones résistantes (Scipione & Cybulsky, 2022).

En synthèse, l'accumulation des lipoprotéines dans l'intima, combinée à des facteurs de risques cardiovasculaires dans les régions propices au développement des plaques, va entraîner un changement métabolique délétère dans les cellules endothéliales. Des molécules vasoconstrictrices et pro-oxydantes vont être produites en excès. La réponse vasodilatatrice et anti-oxydante ne va pas pouvoir compenser et un état de déséquilibre va se créer. L'endothélium va devenir plus perméable et entretenir une réaction inflammatoire. Cette dernière est médiée par l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de molécules

d'adhésion entraînant une diapédèse leucocytaire (Falk, 2006; Münzel et al., 2008). La barrière endothéliale est alors dysfonctionnelle.

Pour finir, les cellules vont changer de morphologie et de caractéristiques pour acquérir celles d'un autre type cellulaire appelé cellules mésenchymales : c'est la transition endothélio-mésenchymateuse. L'endothélium va alors perdre sa polarité et les jonctions vont être réarrangées.

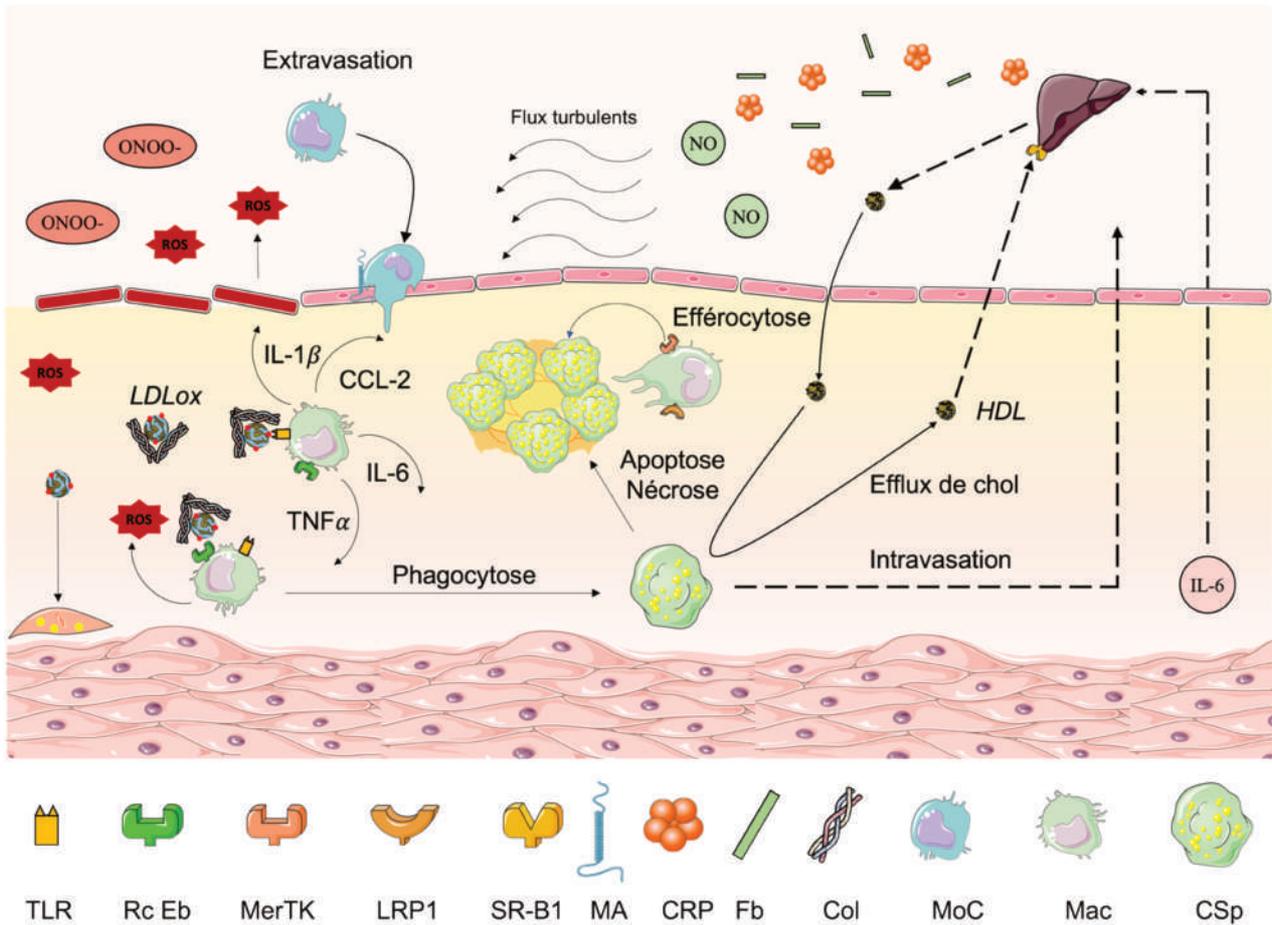
L'inflammation qui va être induite par l'oxydation des LDL vu plus haut est le composant essentiel de la progression de la plaque. Elle entre dans un cercle vicieux car elle aggrave et est elle-même entretenue par la dysfonction endothéliale.

### iii. La phase pro inflammatoire

La seconde phase qui suit la dysfonction endothéliale est marquée par une réaction inflammatoire engendrant petit à petit une progression des plaques. Elle est initiée en grande partie après l'oxydation des LDL vu précédemment (Figure 14).

En réalité, l'oxydation joue un rôle important dans l'homéostasie. Elle participe au métabolisme cellulaire, à la défense anti microbienne, à la prolifération et différenciation cellulaire, etc. Ce n'est que lorsque les ROS sont produits en excès, comme lors du processus de dysfonction endothéliale, qu'elle va devenir délétère (Incalza et al., 2018). L'oxydation des lipoprotéines va leur permettre de modifier leur conformation et d'exposer de nouveaux épitopes désignés sous le nom d'épitopes spécifiques de l'oxydation (OSE). Ces OSE sur les LDL oxydées sont reconnus en tant que motifs moléculaires associés au danger (DAMP) qui vont activer plusieurs récepteurs, dont ceux appelés notamment « Toll-Like receptors » (TLR) (Binder et al., 2016; Porsch et al., 2021). Ces derniers vont déclencher une réaction qui va conduire à l'expression de cytokines pro inflammatoires (IFN $\gamma$ , IL-6, IL-8, TNF $\alpha$ ), de chimiokines (CCL2) ainsi que de molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, E-selectines, P-selectines). Cette cascade inflammatoire est médiée par les cellules endothéliales et les macrophages en place et permet le recrutement et la diapédèse d'autres leucocytes (monocytes, neutrophiles, lymphocytes T, lymphocytes B). L'inflammation déclenchée est locale, mais aussi systémique. En effet, l'IL6 stimule notamment à distance les cellules hépatiques qui vont sécréter du fibrinogène et produire de la protéine C-réactive (CRP) (Xu

et al., 2021). Ce cercle vicieux mis en place va majorer et entretenir la dysfonction endothéliale déjà installée (Figure 14).



**Figure 14 : Développement de la plaque (Phase pro-inflammatoire)**

*La figure a été en partie créée en utilisant Servier Medical Art, fourni par Servier, placé sous licence Creative Common Attribution 3.0 unported License.*

LDLox : LDL oxydée ; Rc Eb : Récepteur éboueur ; MA : molécule d'adhésion ; Fb : fibrinogène ; Col : Collagène ; MoC : Monocyte ; Mac : Macrophage ; Csp : Cellule spumeuse

Les macrophages résidents de l'intima proviennent de la circulation sanguine. Comme vu précédemment, ils sont en majeure partie responsables de la réponse inflammatoire qui est mise en place. Ils constituent une réserve dans la paroi après la naissance et s'auto-renouvellent (Bäck et al., 2019; Swirski et al., 2006; Williams et al., 2018). Lors de l'inflammation, il y aura un recrutement de monocytes provenant de la circulation qui vont se différencier en nouveaux macrophages. Ces cellules phagocytent les LDL oxydées grâce aux récepteurs dits « éboueurs » (CD36, SR-A, SR-BI, OLR-1) (Greaves & Gordon, 2009; Bäck

et al., 2019). Les lipoprotéines vont être hydrolysées par les lysosomes macrophagiques et libérer leur contenu en triglycérides et cholestérol au sein du cytoplasme. Le cholestérol non estérifié qu'elles contiennent peut emprunter différentes voies :

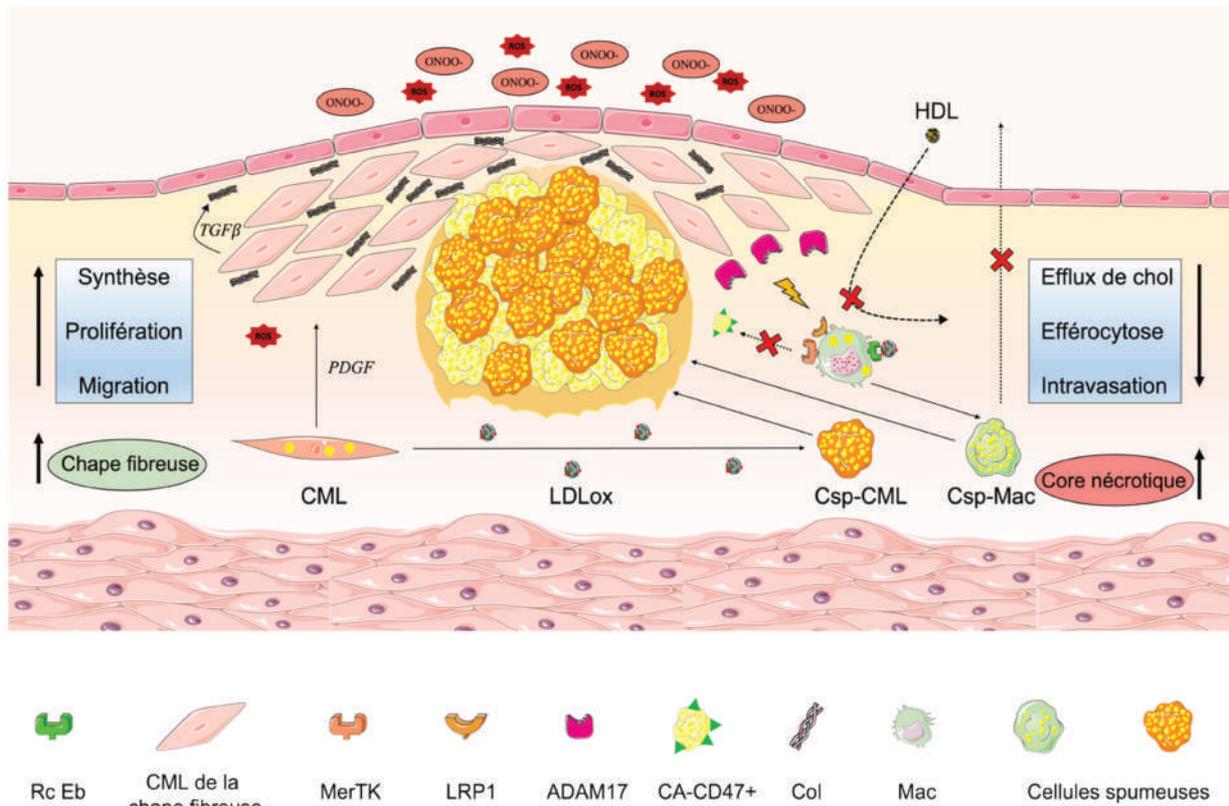
- formation de cristaux qui vont déclencher la sécrétion d'IL1 $\beta$  (chimio-attracteur des lymphocytes B et T) via la voie de l'inflammasome NLRP3 (défini au Chapitre I, Partie C, section 4)
- exportation hors de la cellule via le transporteur ABCA1 vers des HDL (efflux de cholestérol)
- transformation en oxystérol utilisé dans de nombreuses voies cellulaires
- estérification et formation de gouttelettes lipidiques (Bäck et al., 2019)

Dans le dernier cas, et avec l'accumulation des gouttelettes lipidiques, les macrophages changent de phénotype pour devenir des cellules spumeuses (Acton et al., 1996; Endemann et al., 1993; H. Suzuki et al., 1997). Ce changement implique une reprogrammation épigénétique et métabolique via divers facteurs de transcription (SREBP2, LXR) (Eberlé et al., 2004; Lacy et al., 2019). Au fur et à mesure, les cellules spumeuses grossissent et avec le temps se nécrosent. Le contenu cellulaire exposé va entretenir la réaction inflammatoire et de nouveaux macrophages peuvent alors phagocyter les débris : c'est l'efférocytose (Figure 14).

L'efférocytose est un processus crucial de résolution de l'inflammation destiné à éliminer les débris cellulaires. Elle est médiée par des macrophages qualifiés d'anti-inflammatoires (phénotype dit « M2 »), qui expriment des récepteurs efférocytiques (merTK et LRP1) (Mehrotra & Ravichandran, 2022). Il en résulte une production d'IL-10, de TGF $\beta$  mais surtout de médiateurs spécialisés dans la résolution de l'inflammation (SPM) qui vont contrebalancer la sécrétion d'autres facteurs inflammatoires, notamment la leucotriène B4 (Lechner et al., 2020; Kiss & Binder, 2022).

Dans un premier temps, lorsque les systèmes de l'organisme ne sont pas débordés, le cholestérol est éliminé correctement par 3 mécanismes : l'efflux hors du cytoplasme des macrophages médié par les HDL, la migration des cellules spumeuses hors de l'intima vers la circulation sanguine et l'efférocytose des débris cellulaires (Figure 14) (Bäck et al., 2019). Dès lors que les processus mis en place (efflux, migration ou efférocytose) ne sont plus fonctionnels, le cholestérol s'accumule. Notamment, lorsque les capacités d'efflux ne compensent plus l'influx de cholestérol des macrophages et que l'efférocytose n'est pas

effective, les cellules spumeuses deviennent de plus en plus nombreuses, puis se nécrosent et il n'y a plus d'élimination de lipides ni de débris (Scipione & Cybulsky, 2022). Ces derniers vont s'accumuler et former une zone que l'on appelle « core nécrotique ». La plaque grossit petit à petit (passe par les différents stades vus précédemment) et la réaction inflammatoire exacerbe ce processus et devient chronique (Figure 15).



**Figure 15 : Développement de la plaque (Phase de stabilisation)**

*La figure a été en partie créée en utilisant Servier Medical Art, fourni par Servier, placé sous license Creative Common Attribution 3.0 unported License.*

Csp-CML : Cellule spumeuse dérivée d'une cellule musculaire lisse ; Csp-Mac : cellules spumeuse dérivée d'un macrophage ; Rc Eb : Récepteur éboueur ; CA-CD47+ : Corps apoptotique portant le CD47 ; Col : Collagène ; Mac : Macrophage ; Chol : cholestérol

Sous régime hypercholestérolémique, la capacité d'efflux des macrophages est en effet altérée car le transporteur ABCA1 est régulé négativement. De plus leur efférocytose est aussi déficiente car les récepteurs merTK et LRP1 sont dégradés (merTK étant protéolysé par la métalloprotéinase ADAM17) (Mehrotra & Ravichandran, 2022). Par ailleurs, les corps apoptotiques cibles de ces macrophages expriment de manière aberrante une molécule membranaire appelée CD47 qui va inhiber leur phagocytose (Figure 15). De plus les

macrophages vont entretenir la dysfonction endothéliale en produisant des ROS tout comme l'endothélium via la myéloperoxidase (Cheng et al., 2019).

Les CML, présentes non seulement dans la couche musculo-élastique de l'intima mais aussi dans la media, sont importantes car elles jouent un rôle essentiel à toutes les étapes de la plaque d'athérome, comme nous le verrons dans les prochaines parties. Lors de cette phase pro-inflammatoire, elle peuvent changer de phénotype et perdre leur capacité contractile. Elles vont alors exprimer des marqueurs macrophagiques (MAC2, MAC3, CD68) et seront capables d'internaliser des lipides au sein de leur cytoplasme. Elle deviennent ainsi à leur tour des « cellules spumeuses dérivées de cellules musculaires » et vont avoir le même destin que les cellules dérivées des monocytes décrites précédemment (Figure 15) (Basatemur et al., 2019; Bennett et al., 2016). Il a par ailleurs été montré que chez la souris, dans les plaques, 30 à 70% des cellules spumeuses étaient dérivées de CML. Chez l'humain, ce pourcentage monte à 50% (Allahverdian et al., 2014; Chappell et al., 2016; Shankman et al., 2015). Il est à noter particulièrement que lors de leur nécrose, les CML entraineront des dépôts calciques qui seront visibles microscopiquement au sein de la lésion, à la différence des macrophages dérivés des monocytes.

Les lymphocytes B et T régulateurs (Treg) prennent part aussi au processus en modulant l'inflammation installée. Notamment, les lymphocytes Treg, en sécrétant de l'IL-13, permettent de freiner le recrutement leucocytaire, d'augmenter la capacité d'efférocytose des macrophages ou encore de produire du collagène afin de stabiliser la lésion (Porsch et al., 2021; Zhao & Mallat, 2019). Les lymphocytes B sont surtout présents au niveau des ATLO de l'adventice.

Enfin, des mastocytes ont été identifiés au sein des plaques. Il a été montré qu'ils étaient impliqués dans l'initiation, la progression et la déstabilisation des plaques. Ils sont capables d'exocytter leur contenu granulaire et de produire des cytokines permettant d'entretenir la réaction inflammatoire. Leur rôle reste toutefois beaucoup moins documenté que celui des macrophages (Sun et al., 2007; Wezel et al., 2015; Kovanen, 2019).

Avec le temps et les progrès scientifiques, le rôle d'autres types cellulaires et composants a été identifié et investigué (protéines du complément et cellules dendritiques) (Kiss & Binder, 2022; Lacy et al., 2019). Ce qui nous laisse à penser que l'environnement de

la plaque est extrêmement complexe et que les cibles thérapeutiques doivent être élargies afin d'enrayer ce mécanisme pathologique.

#### iv. La phase de stabilisation

La phase de stabilisation vient en réaction à la phase pro-inflammatoire décrite précédemment. Les cellules endothéliales, tout comme les macrophages et les cellules musculaires de la media vont sécréter du PDGF (Tegos et al., 2001).

Comme vu plus haut, les CML ont une certaine plasticité et peuvent changer de caractéristiques pour adopter celles d'un autre type cellulaire (e.g. cellules spumeuses). Ainsi, sous l'influence du PDGF et de l'induction du facteur de transcription KLF4, les CML vont passer cette fois d'un phénotype « contractile » à un phénotype dit « synthétique » (Tabas et al., 2015). En effet, elles vont perdre leur marqueur contractiles (e.g.  $\alpha$ SMA). Elles vont pouvoir migrer et proliférer au-dessus du core nécrotique constitué afin de contribuer au processus de réparation tissulaire. Elles vont alors sécréter non seulement des molécules pro-inflammatoires, mais aussi des cytokines permettant la synthèse de collagène (e.g. TGF $\beta$ ), de protéoglycanes et de glycoprotéines afin de favoriser la création d'une chape fibreuse stabilisatrice de la plaque, retardant ainsi sa rupture (Figure 15). Ces nouvelles cellules synthétiques possèdent une machinerie intracytoplasmique plus développée (RER, Golgi et ribosomes). Néanmoins, ce changement métaplasique et les voies cellulaires impliquées restent encore à préciser. Quelques molécules ont déjà été étudiés comme étant impliqués dans le cadre de cette plasticité (adénosine monophosphate cyclique, phosphoinositide 3 kinase  $\gamma$ ) (Lupieri et al., 2020).

#### v. La phase de fragilisation et de rupture

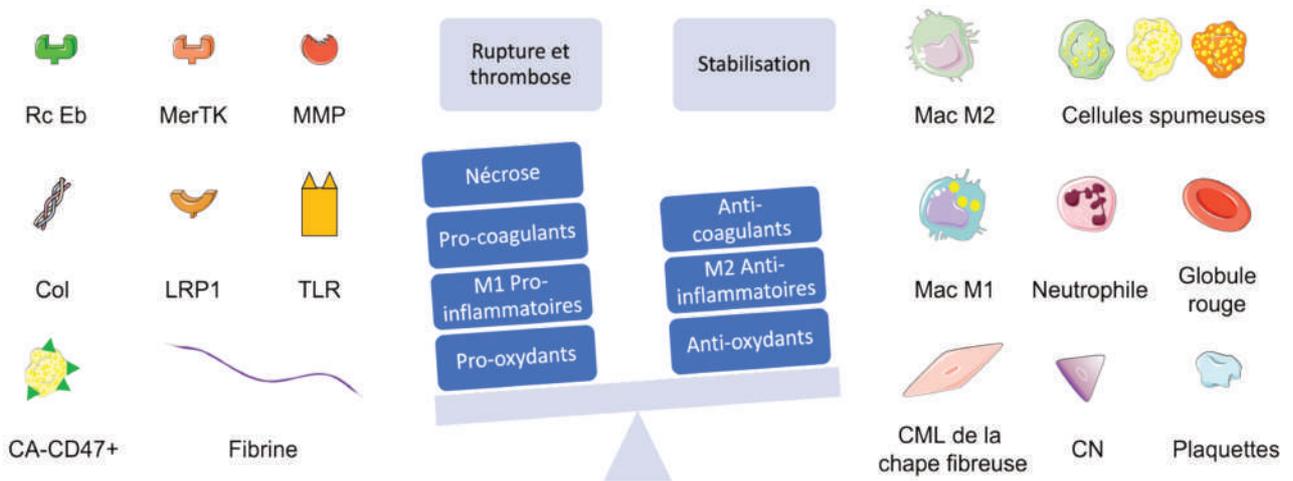
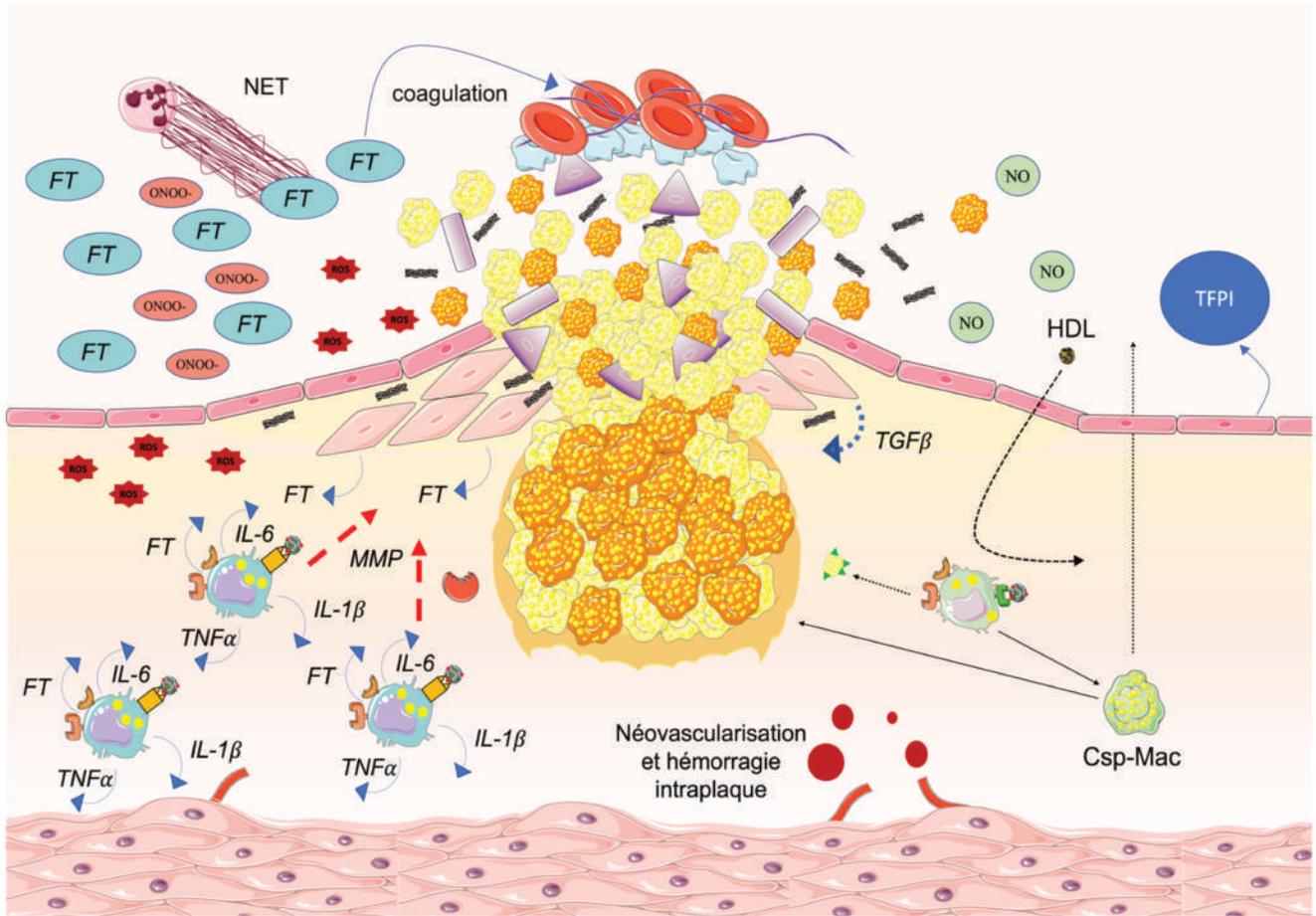
Lors de l'avancement de la plaque, la composition et les caractéristiques cellulaires vont évoluer. Les macrophages de type M2 vont être de moins en moins nombreux au sein de la plaque pour laisser place à des macrophages de type pro-inflammatoire (phénotype dit « M1 ») qui vont sécréter des MMP. Les cellules spumeuses qui n'ont plus de capacité d'efférocytose ni d'efflux effectif vont s'accumuler et se nécroser libérant leur contenu lipidique. Les CML et les cellules endothéliales en surface vont aussi rentrer en apoptose ou en nécrose et vont se raréfier dû au cercle vicieux inflammatoire chronique qui s'est installé.

Il en résulte un grossissement du core nécrotique avec un amincissement de la chape fibreuse : la plaque se fragilise (Figure 16) ([Lechner et al., 2020](#); [Basatemur et al., 2019](#)). Par ailleurs, une néovascularisation dérivée du « vasa vasorum » de l'adventice peut se mettre en place et entraîner des petites hémorragies et thromboses internes qui vont contribuer à faire grossir et déstabiliser la plaque ([Tegos et al., 2001](#)).

Comme décrit plus haut, l'amincissement de la chape fibreuse est notamment due à un déséquilibre entre sa synthèse par les CML et sa dégradation par les MMP ([Tabas et al., 2015](#)). Lorsque la plaque est à un stade suffisamment avancé, la grosseur du core nécrotique et l'amincissement de la chape fibreuse peuvent conduire à une rupture de cette dernière, qui expose le contenu de l'intima à la circulation sanguine (i.e. le collagène, le core nécrotique, les cellules musculaires lisses). Cet événement va induire une cascade de coagulation conduisant à la formation d'un caillot sanguin qui empêche le passage du flux circulatoire (Figure 16).

La coagulation résulte encore d'un déséquilibre cette fois entre la sécrétion de facteurs pro-coagulants (facteurs tissulaires [FT] provenant des macrophages et des CML) et anti-coagulants (inhibiteurs du facteur tissulaire [TFPI-1 et 2] provenant des CML et des cellules endothéliales). Lors de la rupture de la plaque, cette balance est largement en faveur d'un état pro-coagulant ([Grover & Mackman, 2020](#)).

Le facteur tissulaire est à l'origine de la cascade de coagulation. C'est une glycoprotéine de 47 kDa. Il est sécrété par les macrophages, les cellules musculaires ou encore capté par des NET (Neutrophil Extracellular Trap). Ces NET sont des fragments extracellulaires d'ADN et d'histone, servant à l'origine à la défense contre des micro-organismes pathogènes médiée par les neutrophiles. Ils peuvent contenir des cytokines inflammatoires, piéger des plaquettes, de la fibrine ou encore le facteur tissulaire. Ce dernier, une fois exposé à la circulation sanguine, active toute une série de facteurs (FVII, FIX, FX, FV, FII) aboutissant à la formation d'un thrombus ([Libby et al., 2018](#); [Viles-Gonzalez et al., 2004](#)).



**Figure 16 : Développement de la plaque (Phase de fragilisation et de rupture)**

*La figure a été en partie créée en utilisant Servier Medical Art, fourni par Servier, placé sous licence Creative Common Attribution 3.0 unported License.*

Csp-Mac : Cellule spumeuse dérivée d'un macrophage ; Rc Eb : Récepteur éboueur ; CA-CD47+ : Corps apoptotique portant le CD47 ; Col : Collagène ; Mac M2/M1 : Macrophage M2/M1 ; CN : Corps nécrotique ; FT : Facteur tissulaire ; TFPI : inhibiteur du facteur tissulaire ; NET : Neutrophil extracellular trap ; TLR : Toll like receptor

En se fracturant ou en se détachant, ce caillot forme des embolies capables d'obstruer de plus petits vaisseaux en aval causant diverses ischémies en fonction du site de l'organe. Ce sont les cellules endothéliales qui peuvent contrôler ce processus soit en sécrétant l'activateur du plasminogène (t-PA) responsable de la fibrinolyse soit en sécrétant son inhibiteur (PAI-1) (Viles-Gonzalez et al., 2004).

Enfin, d'autres facteurs peuvent néanmoins contribuer à une rupture de plaque comme les tensions appliquées à la paroi du vaisseau ou encore l'hémorragie intraplaque (petite hémorragie vasculaire survenant au sein de la lésion).

Avec le développement de nouvelles thérapies, il y a de moins en moins de rupture de plaque car ces dernières sont peu inflammatoires et plus fibreuses. Au contraire, un phénomène d'érosion se met en place et implique l'activation de l'immunité innée via les récepteurs TLR (Libby et al., 2019).

Tous les processus physiopathologiques vus jusqu'ici et qui s'enchainent, de l'initiation à la rupture des plaques, s'opèrent plus volontiers dans un contexte anormal mêlant divers désordres métaboliques. Ces derniers ont été caractérisés et regroupés sous le nom d'un syndrome appelé « syndrome métabolique ».

## C. Le syndrome métabolique

Avec des habitudes alimentaires et comportementales qui n'ont cessé d'évoluer depuis des décennies et l'augmentation de sa prévalence, le syndrome métabolique a été mis en lumière comme un des facteurs de risque majeur dans la survenue des maladies cardiovasculaires (Eckel et al., 2005).

### 1. Définition

En 1923, un chercheur Danois du nom de Kylin identifie plusieurs anomalies métaboliques associées chez des patients, à savoir une hypertension, une hyperglycémie et une hyperuricémie : le concept de syndrome métabolique fait alors son apparition (Kylin, 1923). Ce concept sera de mieux en mieux exploré au fil des années (en 1947 avec Jean Vague puis 1978 avec Gerald B. Phillips) pour aboutir au nom de syndrome X (en 1988 avec

Gerald Reaven) puis à celui de syndrome métabolique, dénomination la plus utilisée de nos jours. Avec le temps, les progrès de la médecine et l'augmentation du nombre de personnes touchées par ces anomalies, les premières définitions du syndrome métabolique apparaissent à partir de 1999 (Table 3), à l'initiative de plusieurs instances reconnues mondialement, telles que l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), la NCEP-ATP III (National Center Education Program-Adult Treatment Program III), l'EGIR (European Groupe for study of Insulin Resistance) ou encore l'IDF (International Diabetic Federation) (Cameron et al., 2004; Wang et al., 2020).

Instances	Diagnostic	Critère principal	Autres critères			
			Obésité	Dyslipidémie	Tension artérielle	Glycémie ou Microalbuminurie
<b>OMS (1999)</b>	Critère principal + au moins 2 autres critères	Diabète ou glycémie à jeun altérée ou insulino-résistance (dans des conditions euglycémiques ou hyper-insuliniques, définie par une absorption de glucose parmi les 25% des valeurs les plus faibles)	IMC > 30 kg/m <sup>2</sup> ou le rapport taille/hanche > 0,9 pour les hommes et > 0,85 pour les femmes	Hypertriglycéridémie > 1,7 mmol/L ou du HDL-C < 0,9 mmol/L pour les hommes et < 1 mmol/L pour les femmes	Tension > 140/90 mm Hg	Microalbuminurie : albuminurie > 20 g/min
<b>EGIR (1999)</b>	Critère principal + au moins 2 autres critères	Insulino-résistance (définie par une hyper-insulinémie parmi les 25% des valeurs les plus hautes dans la population non diabétique)	Obésité androïde (abdominale) : tour de taille >94cm chez les hommes et > 80cm chez les femmes	Hypertriglycéridémie > 2mmol/L ou HDL-C < 1mmol/L	Tension > 140/90 mm Hg et/ou traitement	Glycémie à jeun > 6,1 mmol/L
<b>NCEP ATP III, (2001)</b>	3 critères ou plus parmi les autres critères	Aucun	Obésité androïde (abdominale) : tour de taille >102 cm chez les hommes et > 88 cm chez les femmes	HDL-C < 1mmol/L pour les hommes ou < 1,3 mmol/L pour les femmes et/ou traitement Hypertriglycéridémie > 1,7 mmol/L	Tension > 135/85 mm Hg et/ou traitement	Glycémie à jeun > 6,1 mmol/L et/ou traitement
<b>IDF (2005)</b>	Critère principal + au moins 2 autres critères	Obésité androïde et au moins 2 autres critères parmi ceux des colonnes suivantes	Obésité androïde (abdominale) : IMC > 30 kg/m <sup>2</sup> tour de taille >94cm chez les hommes et > 80cm chez les femmes	Hypertriglycéridémie > 1,7 mmol/L ou HDL-C < 1 mmol/L pour les hommes et < 1,3 mmol/L pour les femmes	Tension > 130/85 et/ou traitement mm Hg	Diabète ou glycémie à jeun altérée (> 100mg/dL) et/ou traitement
<b>AHA (2009)</b>	3 critères ou plus parmi les autres critères	Aucun	Obésité androïde (abdominale) : tour de taille >102 cm chez les hommes et > 88 cm chez les femmes	Hypertriglycéridémie > 1,7 mmol/L ou HDL-C < 1 mmol/L pour les hommes et < 1,3 mmol/L pour les femmes	Tension > 130/85 et/ou traitement mm Hg	Diabète ou glycémie à jeun altérée (> 100mg/dL) et/ou traitement

***Table 3 : Principales définitions du syndrome métabolique***

Bien que l'on s'accorde sur le fait qu'il représente un facteur de risque majeur pour le développement des maladies cardiovasculaires en augmentant considérablement le risque de morbidité et de mortalité (Isomaa et al., 2001), le syndrome métabolique est difficile à caractériser car les critères pris en compte ne sont pas toujours les mêmes au niveau international, comme le montre le tableau précédent (Cameron et al., 2004).

Néanmoins, il est reconnu de manière consensuelle que les personnes présentant une association d'au moins trois des facteurs de risque ci-dessous sont atteints d'un syndrome métabolique, à savoir :

- Une hypertriglycéridémie, avec un taux supérieur ou égal à 1,5g/L
- Une hyperglycémie à jeun, avec un taux supérieur ou égal à 1,1g/L
- Une hypertension, avec une mesure systolique supérieure à 135 mm Hg ou diastolique supérieure à 85 mm Hg
- Un tour de taille élevé (obésité viscérale), pour les hommes : supérieur à 102 cm et pour les femmes : supérieur à 88 cm
- Un faible taux de HDL cholestérol à jeun, à savoir un taux inférieur à 0,4g/L pour les hommes et inférieur à 0,5 g/L pour les femmes

Parmi les critères proposés, l'insulino-résistance est certainement l'un des plus importants et est présent chez la majorité des patients. Certaines études suggèrent même qu'elle serait à l'origine des autres perturbations du syndrome métabolique sans toutefois que cela n'ait été clairement confirmé (Cameron et al., 2004). Les premières définitions de l'OMS, ainsi que celle de l'EGIR la place en tant que critère majeur. La NCEP- ATP III utilise une définition plus facile d'utilisation lors de la pratique clinique. L'IDF quant à elle met en condition principale l'obésité androïde. L'AHA reprend les mêmes critères que l'IDF sauf pour l'obésité androïde.

De nombreuses comorbidités peuvent également se surajouter (cancers, dépression, syndrome des ovaires polykystiques, etc...), handicapant grandement la qualité de vie des malades (Poithiwala et al., 2009).

## 2. Épidémiologie

La probabilité de développer un syndrome métabolique repose sur plusieurs facteurs : génétiques, épigénétiques, comportementaux et environnementaux. Parmi ces facteurs, l'ingestion alimentaire calorique et la sédentarité s'avèrent être les plus importants (Fahed et al., 2022).

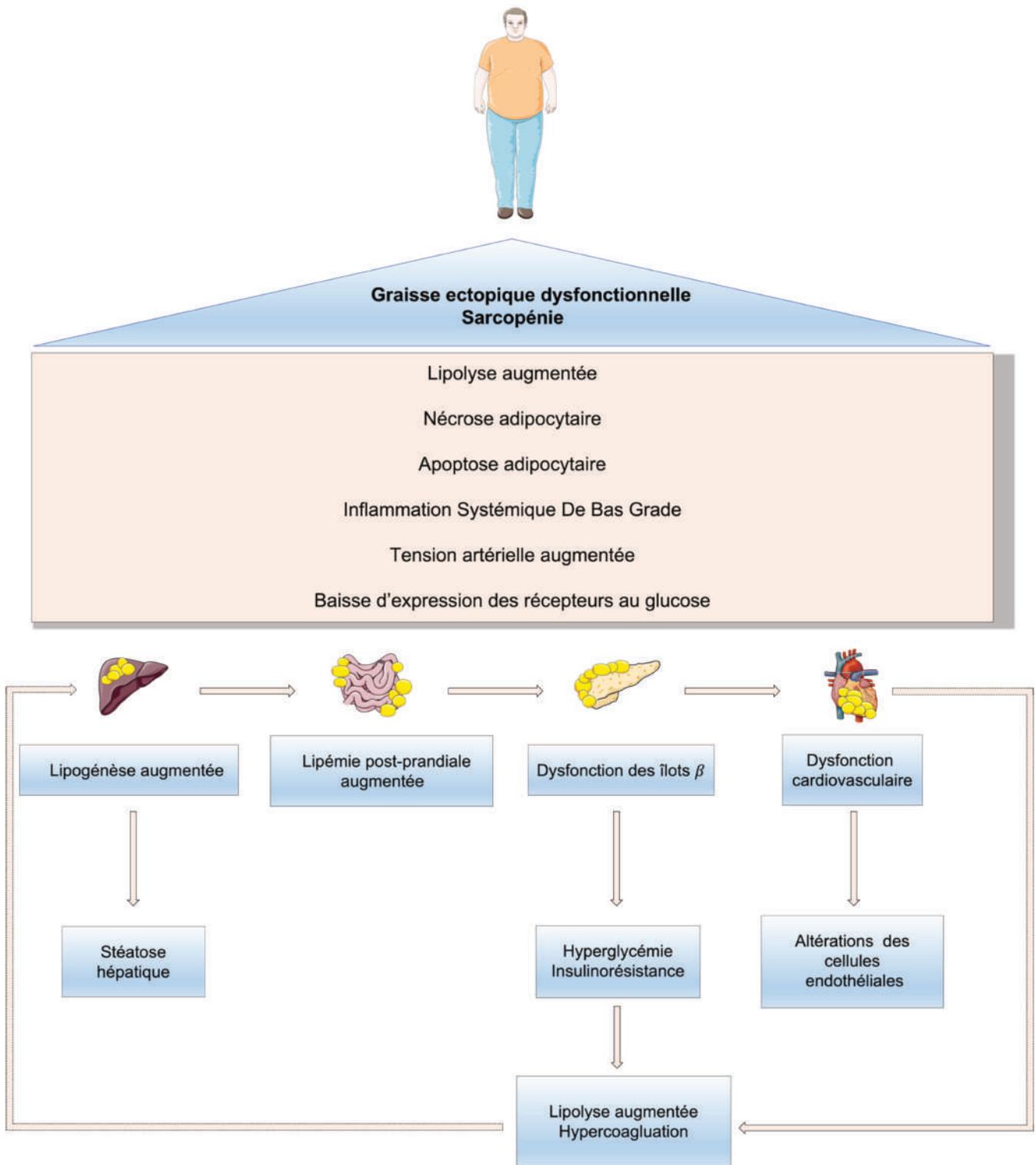
Tout comme les maladies cardiovasculaires évoquées précédemment, le syndrome métabolique touche aussi bien les hommes que les femmes. Mais, du fait de la variabilité des critères pris en compte dans sa définition au niveau international, sa prévalence n'est pas aussi précise et peut varier de 10 à 60% selon les régions du globe. Cet écart n'est pas seulement dû à l'absence d'une définition consensuelle et peut aussi s'expliquer par des caractéristiques démographiques différentes entre chaque pays (Cameron et al., 2004; Eckel et al., 2005). Toutefois on s'accorde à dire que la prévalence augmente un peu partout dans le monde (USA, Europe, Asie). Notamment, aux Etats-Unis, on enregistre une augmentation de près de 35% des diagnostics de syndrome métabolique entre 1980 et 2012.

Il est d'autant plus nécessaire d'enrayer ce phénomène qu'il multiplie par deux le risque de développer des maladies cardiovasculaires et par cinq le risque de développer un diabète de type 2 (Wang et al., 2020). Quelques notions physiopathologiques s'avèrent être alors indispensables dans la compréhension de ce syndrome.

## 3. Notions physiopathologiques dans le syndrome métabolique

Tout le monde possède des plaques d'athérome, mais elles restent le plus souvent asymptomatiques. Les personnes à haut risque de développement de plaques symptomatiques possèdent un phénotype caractérisé par une accumulation de graisse ectopique dysfonctionnelle (viscérale, pancréatique, péricardique et hépatique). Cette dernière va conduire à une série de perturbations métaboliques et inflammatoires caractérisées au niveau clinique sous le nom de syndrome métabolique (Oikonomou & Antoniadis, 2019; Shulman, 2014). En effet, sous l'influence de ce changement de composition du corps combiné aux divers facteurs de risque génétiques et comportementaux évoqués plus haut, une inflammation chronique et une insulino-résistance vont se mettre en place (Oikonomou & Antoniadis, 2019; Shulman, 2014). Des organes clés de l'homéostasie lipidique et glucidique vont être perturbés

et vont rentrer dans un état pathologique. Plus précisément le tissu adipeux ectopique dysfonctionnel, sous l'influence de l'accumulation des acides gras libres, va augmenter sa lipolyse et modifier la sécrétion de ses adipokines, qui sont des hormones essentielles notamment impliquées dans l'inflammation, la tension artérielle ou encore, au niveau cellulaire, l'apoptose ([Lechner et al., 2020](#); [Fève et al., 2016](#)) (Figure 17).



***Figure 17 : Notions physiopathologiques dans le syndrome métabolique***  
*La figure a été en partie créée en utilisant Servier Medical Art, fourni par Servier, placé sous licence Creative Common Attribution 3.0 unported License.*

La lipolyse accrue va non seulement entretenir un cercle vicieux (lipolyse-inflammation-altérations), mais aussi perturber l'homéostasie glucidique (Lechner et al., 2020). Un état d'insulinorésistance va s'installer, marqué par une dysfonction des cellules  $\beta$  pancréatiques due à l'accumulation d'acides gras libres et une hyperglycémie chronique (Figure 17) (Lechner et al., 2020; White et al., 2016). Cette dernière va, par ailleurs, induire la formation de produits terminaux de glycation (AGE). Ces AGE sont des protéines ou lipides liés à des carbohydrates (sucres) et dont les fonctions sont modifiées. Ils vont entraîner une réaction pro-inflammatoire avec une augmentation du stress oxydant ainsi qu'une dysfonction endothéliale et cardiaque (Fournet et al., 2018). Ils promeuvent entre autres la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses (Hwang et al., 2018; Mao et al., 2022).

Par ailleurs, le foie va récupérer l'excès d'acides gras libres circulants et accélérer sa production endogène de lipides, conduisant sur le long terme à une dyslipidémie marquée et à une stéatose hépatique non alcoolique (NAFL) qui va s'avérer délétère (Figure 17) (Fiuza-Luces et al., 2018; Lechner et al., 2020; Pedersen & Febbraio, 2012). De plus, la lipémie post prandiale (hypertriglycéridémie après apport alimentaire), qui est un facteur de risque conséquent dans les maladies cardiovasculaires, va être aussi augmentée (Figure 17). En effet, la combinaison des acides gras libres provenant de l'alimentation avec ceux provenant de la circulation et de la lipolyse accrue va permettre aux entérocytes de sécréter plus de chylomicrons. Ces particules lipidiques en excès en post prandial vont rentrer en compétition avec des VLDL dans le processus de catabolisme par les lipases. Les VLDL plasmatiques seront alors moins hydrolysés au profit des chylomicrons et s'accumuleront dans la circulation sanguine (Brunzell et al., 1973; Cifarelli & Abumrad, 2018).

Toutes ces modifications vont s'accompagner d'une sarcopénie (diminution de la masse des muscles) qui va perturber le sécrétome musculaire et altérer en contrepartie le métabolisme du tissu adipeux et cardiaque (Fiuza-Luces et al., 2018; Lechner et al., 2020; Pedersen & Febbraio, 2012). En sus, de la graisse épigardique va s'accumuler et entraîner plusieurs dysfonctions cardiovasculaires (fibrillation atriale, ischémie coronarienne, dysfonction ventriculaire gauche) conduisant in fine à des altérations des cellules endothéliales et des organes en aval (Packer, 2018). Enfin, un état d'hypercoagulation accompagne l'insulinorésistance (Figure 17). Il est dû à la baisse du taux de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) et à la glycation de la fibrine qui est alors plus résistante à la fibrinolyse (Anand et al., 2003; Lechner et al., 2020; Meigs et al., 2000).

Ces changements physiopathologiques contribuent à former un environnement délétère pour l'intima des parois vasculaires. Les mécanismes compensatoires mis en place afin de pallier les altérations engendrées ne suffisent plus et des plaques d'athérosclérose se développent. L'inflammation chronique de bas grade engendrée est l'une caractéristique essentielle dans la progression du syndrome métabolique et la survenue des maladies cardiovasculaires.

#### **4. L'inflammation dans le syndrome métabolique et les maladies cardiovasculaires**

Les maladies cardiovasculaires sont souvent associées à une inflammation chronique dite de bas grade. Plusieurs corrélations ont longtemps été établies par ailleurs entre le taux de monocytes plasmatiques et le risque d'évènement cardiovasculaire (Ganda et al., 2013; Imanishi et al., 2010; Ionita et al., 2010; Swirski et al., 2007). Comme vu précédemment, et même si elle ne fait pas partie précisément de sa définition, cette inflammation sous-jacente est aussi retrouvée chez les personnes ayant un syndrome métabolique. Ce concept a été résumé sous le terme de « meta-inflammation » ou « metabolic-inflammation » (Hotamisligil, 2006; Silveira Rossi et al., 2022).

Comme évoqué plus haut, la dyslipidémie est étroitement liée aux mécanismes inflammatoires. Il est par ailleurs admis depuis longtemps qu'une augmentation des acides gras libres plasmatiques peut entraîner une inflammation systémique de bas grade via la voie NF $\kappa$ b et IL-1 $\beta$  et créer un environnement oxydatif délétère pour les paroi vasculaires (Sloboda et al., 2012). En retour, cette inflammation altérerait la sécrétion de l'apo-A1 et l'efflux de cholestérol au contact des adipocytes, ce qui expliquerait la baisse du taux de HDL chez les patients (Zhang et al., 2019).

Dans le syndrome métabolique, sous l'effet de la dyslipidémie, on assiste à une infiltration macrophagique du tissu adipeux via la chimiokine CCL-2 (chemokine ligand 2) et une augmentation des cytokines pro-inflammatoires. Parmi elles, l'IL-6, la CRP, le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  en sont les plus importantes (Silveira Rossi et al., 2022; Zhang et al., 2019).

L'IL-6 est sécrété en majorité par les macrophages et le tissu adipeux. Il agit à distance et entraîne une sécrétion de CRP et de fibrinogène par le foie tout en augmentant l'expression de molécules d'adhésion (VCAM-1) au niveau des cellules endothéliales.

Le TNF $\alpha$  est un des acteurs majeur de l'insulino-résistance. Il est corrélé positivement à l'infiltration macrophagique du tissu adipeux et à sa masse (Weisberg et al., 2003; Zennaro et al., 2009). De plus, il entraîne via une sérine kinase l'inactivation des récepteurs à l'insuline. L'insulinorésistance induite majore alors la lipolyse déjà mise en place chez les patients, ce qui va entretenir le cercle inflammatoire.

Les DAMP, comme vu précédemment, comprennent les LDL oxydées, mais aussi beaucoup d'autres molécules (acides gras saturés, produits de dégradation de la MEC, produits de glycation avancés [AGE]). Augmentés chez les patients atteints de syndrome métabolique, ils sont capables d'activer des récepteurs (TLR2, TLR4, PRR) notamment sur les macrophages et déclencher divers mécanismes inflammatoires dont le plus important est celui médié par l'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3). Cet inflammasome est un complexe protéique oligomérique impliqué dans l'immunité innée et qui active une cascade inflammatoire médiée par des caspases aboutissant à la production d'IL-1 $\beta$ . Ce dernier va permettre notamment de mobiliser les précurseurs hématopoïétiques afin de recruter de nouveaux monocytes (Fahed et al., 2022; Silveira Rossi et al., 2022; Zhang et al., 2019).

Les organes impliqués dans l'inflammation ne se limitent pas qu'au tissu adipeux. Le foie participe à la réaction inflammatoire via les cellules de Kupffer qui sont des macrophages résidents (Christ et al., 2019). En contrepartie, une réaction anti-inflammatoire et anti-oxydante se met en place, notamment via l'augmentation de l'efflux de cholestérol par les macrophages ou la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes B (Christ et al., 2019; Rosenson et al., 2012). Cependant, ces mécanismes s'épuisent avec le temps et la maladie progresse.

En parallèle de cet état pro-inflammatoire chronique, des agents pro-coagulants sont également sécrétés participant à la survenue des maladies ischémiques (i.e. le facteur tissulaire, le facteur VII, le fibrinogène, thrombine) (Sutherland et al., 2004; Silveira Rossi et al., 2022).

La meta-inflammation est un mécanisme complexe et non complètement élucidé faisant interagir plusieurs types cellulaires et organes entre eux. De nouveaux marqueurs ont par ailleurs été identifiés. Parmi eux, la Fetuin-A, une hépatokine (cytokine produite par les hépatocytes) contribuerait notamment à l'insulinorésistance et au recrutement monocytaire vers le tissu adipeux ([Zhang et al., 2019](#)).

Ainsi, contrôler le profil lipidique seul ne serait pas suffisant à prévenir les événements cardiovasculaires. Il faudrait réduire les biomarqueurs inflammatoires qui sont des facteurs de risques prédictifs indépendants.

## Chapitre II : De nouvelles cibles contre le développement de l'athérosclérose

Avec l'augmentation de la prévalence du syndrome métabolique et des maladies cardiovasculaires, il est urgent d'établir une prévention primaire et secondaire adaptées. Toutefois ces dernières ne sont pas toujours respectées ou tolérées par les patients et il devient nécessaire de s'orienter sur de nouvelles cibles thérapeutiques afin de freiner la progression de l'athérosclérose.

### A. Les thérapies existantes contre le développement de l'athérosclérose

#### 1. Les facteurs protecteurs et les thérapies non médicamenteuses

Les thérapies non médicamenteuses (alimentation, alcool à dose modérée, activité physique, taux HDL cholestérol, apoA-I, arrêt du tabac) sont les bases essentielles du traitement de l'athérosclérose. Elles agissent sur plusieurs facteurs de risque en même temps et sont bénéfiques au microbiote intestinal et à la vascularisation. Adopter un mode de vie sain dès l'enfance implique des effets bénéfiques à l'âge adulte ([Libby et al., 2019](#)).

L'alimentation est un point essentiel dans l'amélioration du phénotype androïde. Non seulement la quantité, mais aussi la qualité des aliments (acides gras insaturés, fibres, phytostérol, oméga-3) vont contribuer à modifier le profil lipidique des patients et le microbiote intestinal ([Libby et al., 2019](#)), comme en atteste l'essai PREDIMED ([Mach et al., 2020](#)).

L'exercice physique reste l'un des facteurs les plus importants dans le traitement de l'athérome et la réduction des événements ischémiques car il permet d'améliorer plusieurs paramètres tels que la pression artérielle et la fréquence cardiaque, le poids, les taux de HDL et de LDL cholestérol, l'agrégation plaquettaire, la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose. Il permet non seulement d'empêcher la progression des plaques mais aussi d'induire sa régression en modulant les particules responsables du transport inverse du cholestérol ([Sacco et al., 1997](#); [Tani et al., 2010](#)). Il participerait à la baisse de l'inflammation de bas grade en inhibant la voie médiée par NLRP3 ([Lechner et al., 2020](#)).

L'alcool à dose modérée (<10g/jour) fait partie des facteurs protecteurs des maladies cardiovasculaires, avec une réduction de la mortalité. Il serait corrélé à une augmentation des particules HDL (Falk, 2006; Mach et al., 2020; Sacco et al., 1997; Tegos et al., 2001).

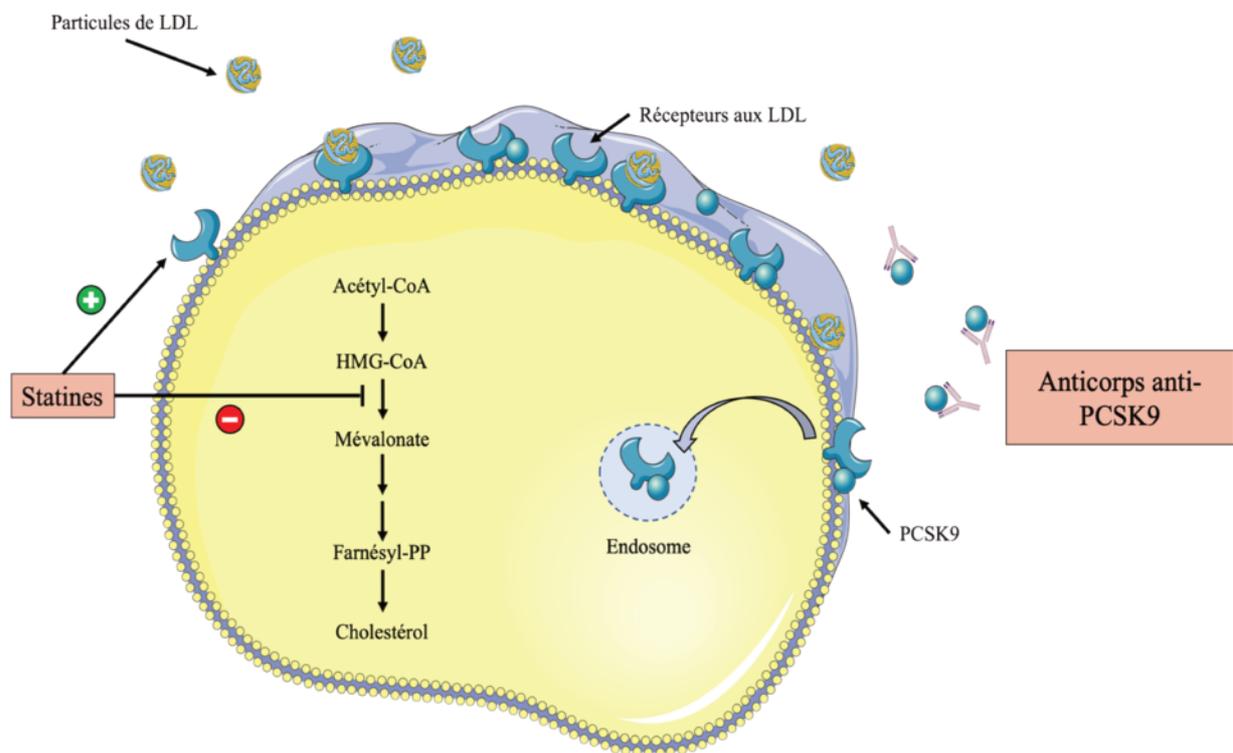
Le taux de base de HDL et son apolipoprotéine majeure apoA-I, ainsi que l'arrêt du tabac sont par ailleurs aussi impliqués dans la réduction des événements cardiovasculaires (Lewis & Rader, 2005; Tegos et al., 2001).

## 2. Les thérapies médicamenteuses

De nombreuses thérapies médicamenteuses existent. La plupart ayant pour premier objectif la baisse du taux de LDL plasmatiques des patients. Elles peuvent être combinées afin d'augmenter leur efficacité (National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), 2002).

### i. Les statines

Les statines vont inhiber l'HMG-CoA réductase et faire baisser le cholestérol endogène, donc le taux de LDL circulantes, tout en stimulant l'expression hépatique des récepteurs aux LDL (figure 18). C'est la thérapeutique médicamenteuse la plus pratiquée en clinique et la plus efficace (22% de réduction du risque cardiovasculaire) (Libby et al., 2019). Elle fait baisser les risques d'évènements cardiovasculaires aussi bien chez les hommes que chez les femmes. Il y a très peu d'effets secondaires graves. Toutefois il arrive qu'il y ait des élévations des transaminases, des myopathies ou encore des perturbations de l'homéostasie glucidique (Mach et al., 2020). Elles peuvent faire baisser les LDL jusqu'à 55%, les TG jusqu'à 30%, et monter les HDL jusqu'à 15%. Par ailleurs elles possèderaient de même des propriétés anti-inflammatoires et anti-oxydantes.



**Figure 18 : Mécanisme d'action des statines et des anticorps anti-PCSK9**

*La figure a été en partie créée en utilisant Servier Medical Art, fourni par Servier, placé sous licence Creative Common Attribution 3.0 unported License.*

Les statines bloquent l'HMG-CoA réductase et empêchent la synthèse de cholestérol endogène. Ils induisent alors une augmentation de synthèse des récepteurs aux LDL qui vont capter les lipoprotéines circulantes. Les anticorps anti-PCSK9, sous forme d'anticorps injectables vont bloquer la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9) et permettre la rétention des récepteurs aux LDL au niveau de la membrane des cellules.

## ii. Les anticorps anti-PCSK9

Les anticorps anti-PCSK9 (évolocumab et alirocumab) permettent d'éviter l'internalisation et la dégradation des récepteurs aux LDL du foie par la PCSK9 (décrite au Chapitre II, Partie C, section 4) conduisant à une augmentation de la captation des LDL circulants (Figure 18). Ils constituent une nouvelle classe thérapeutique, et en combinaison avec des statines, ils peuvent faire baisser le cholestérol plasmatique jusqu'à 60%. Ils sont réservés aux patients les plus à risque, le coût financier du traitement étant très important. Une thérapie ciblant la PCSK9 avec un ARN interférent (inclisiran) est par ailleurs à l'étude (Libby et al., 2019).

### iii. Les chélateurs des acides biliaires

Les chélateurs des acides biliaires (e.g. cholestyramine) employés seuls ont un effet moindre. C'est pourquoi ils sont généralement associés aux statines. En empêchant la recirculation des acides biliaires, le foie va réutiliser son propre contenu en cholestérol afin de resynthétiser ces acides, puis capter les LDL circulants du plasma afin de reconstituer son stock. *In fine*, ceci entraîne une baisse du taux de cholestérol plasmatique.

### iv. L'acide nicotinique ou Niacine

L'acide nicotinique empêche la synthèse des lipoprotéines et la mobilisation des acides gras libres, entraînant une baisse de production des VLDL par le foie. On note cependant beaucoup plus d'effets secondaires qu'avec des statines.

### v. Les inhibiteurs de l'absorption intestinale du cholestérol

Ils empêchent comme leur nom l'indique l'absorption du cholestérol provenant de l'alimentation (e.g. ézétimibe), et augmentent les récepteurs aux LDL au niveau du foie. On peut les combiner avec les statines. En effet dans l'étude IMPROVE-IT, chez les patients avec antécédents d'infarctus et traités par combinaison statines/ézétimibe, il a été montré une réduction de 6,5% dans la survenue d'évènements cardiovasculaires majeurs (Libby et al., 2019).

### vi. Les Fibrates

Ils permettent une activation du récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosome (PPAR $\alpha$ ), un facteur de transcription impliqué dans le catabolisme des acides gras, et une baisse du taux de l'apoC-III qui va entraîner une diminution des triglycérides sanguins. Leur impact est néanmoins beaucoup plus limité sur la survenue des maladies cardiovasculaires contrairement aux statines.

## vii. Les autres

Les principaux traitements hypolipémiants décrits plus hauts sont associés à d'autres thérapeutiques car bon nombre de facteurs de risque contribuent conjointement au développement de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires.

Parmi les autres thérapies mises en place, nous pouvons citer les anti hypertenseurs (anticalciques, inhibiteurs de l'enzyme de conversion, antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II, diurétiques thiazidiques, bêta-bloquants, dérivés nitrés), l'insulinothérapie pour les diabétiques, les omega-3 (EPA et DHA) qui à fortes doses peuvent réduire la sécrétion de VLDL par le foie, les anti agrégants plaquettaires (aspirine) ou encore quelques thérapies anti-inflammatoires telles que les inhibiteurs de COX-2 (Libby et al., 2019; National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), 2002).

Ces médicaments visent à limiter la progression de l'athérosclérose avec une efficacité variable selon les patients mais ne sont souvent pas suffisants afin d'éviter les événements cardiovasculaires sur le long terme. De nouvelles cibles thérapeutiques efficaces mériteraient d'être envisagées afin de compléter l'arsenal déjà existant.

## B. De nouvelles thérapies nécessaires

Les thérapies mises en place souvent sous forme d'associations, en plus des mesures hygiéno-diététiques, visent à réduire l'impact des facteurs de risque définis plus haut. Alors que certains traitements conventionnels sont mal tolérés ou ne peuvent être mis en place correctement, de nouvelles thérapies semblent voir le jour.

Malgré de nombreuses voies explorées (thérapies épigénétiques, anti-oxydants et inhibiteurs pharmacologiques, anticorps anti-oxLDL, inhibiteurs de la CETP, anti ANGPTL3, anti-apoCIII), aucun de ces nouveaux traitements ne possède à l'heure actuelle une balance bénéfice/risque aussi favorable que celle des statines (réduction des événements cardiovasculaires/effets secondaires entraînés) ([Libby et al., 2019](#); [Mach et al., 2020](#); [Lacy et al., 2019](#); [Yvan-Charvet & Cariou, 2018](#))

Récemment, les thérapies anti-inflammatoires sont sorties du lot en mettant en lumière l'importance de ce mécanisme dans le développement des plaques. L'essai CANTOS (The CANAKINUMAB anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study) est une grande étude prospective multicentrique internationale, randomisée en double aveugle. Elle est basée sur le constat que les patients sous statines et qui ont des antécédents de cardiopathies ischémiques ont une CRP ultrasensible élevée par rapport à leur contrôle. Ainsi, plus de 10 000 patients coronariens avec un âge moyen de 61 ans ont été inclus et répartis en 4 groupes traités tous les 3 mois avec un placebo ou différentes doses (50mg, 150mg ou 300mg) d'anticorps monoclonal anti-IL-1 $\beta$  (CANAKINUMAB). Ils ont été suivis durant un peu plus de 3 ans. Seule la dose de 150mg a été concluante. Cette dernière a été associée tout d'abord à une baisse de 39% de la CRP ultrasensible sans effet sur le profil lipidique (LDL, VLDL, HDL) des patients. Une diminution significative des événements cardiovasculaires (décès, angor instable, AVC et infarctus non fatals) de 15% a aussi été constatée. Cependant, l'efficacité du traitement est dépendante du taux d'autres cytokines pro-inflammatoires présentes chez les patients, ce qui implique qu'il faille mieux cibler les profils des personnes. Par ailleurs, le traitement a entraîné une réelle augmentation des décès par infection et il n'y a pas eu d'amélioration sur la mortalité toute cause confondue chez ces patients. De plus, avec un coût très élevé de plusieurs centaines de milliers d'euros, ce traitement par anticorps reste difficilement applicable dans ces conditions. Il est alors encore nécessaire de préciser l'indication de ce traitement dans le cadre des maladies cardiovasculaires afin d'obtenir une

balance bénéfique/risque optimale. Toutefois, cet essai a eu le mérite de mettre au premier plan l'importance des marqueurs inflammatoires dans la survenue des événements cardiovasculaires ([Ridker et al., 2017](#)).

Dans la même lignée, l'essai CIRT (Cardiovascular Inflammation Reduction Trial) a testé une faible dose (15-20 mg/semaine) de méthotrexate chez 4700 patients à haut risque cardiovasculaire ou avec des plaques stables. Ce traitement est un inhibiteur de l'acide folique à effet cytostatique et est utilisé contre certains cancers et maladies auto-immune. Il possède en général un spectre anti-inflammatoire plus large (CRP, IL-6, TNF $\alpha$ ). Malheureusement, il n'y a pas eu d'effet constaté sur la survenue des événements cardiovasculaires ([Ridker et al., 2019](#)).

D'autres études cliniques ciblant des intermédiaires de la réponse inflammatoire ont par ailleurs été testés sans plus de succès ou avec des effets secondaires significatifs ([Deroissart et al., 2021](#)).

Lorsque les traitements médicamenteux ne sont plus suffisants, ou lors d'une évolution trop rapide de la maladie, des interventions plus invasives peuvent être envisagées (endartériectomies, pose d'un stent, fibrinolyse, pontage artériel, chirurgie valvulaire, transplantation cardiaque) (Lawton et al., 2022). Cela vient impacter en premier lieu la qualité de vie du patient.

L'utilisation de nouvelles techniques et thérapies chez les patients passe préalablement par des études cliniques et précliniques qui vont impliquer l'utilisation de modèles animaux pertinents dans le cadre de l'athérosclérose.

## C. Les modèles d'étude murins de l'athérosclérose

### 1. Généralités

L'athérosclérose est une maladie faisant intervenir divers facteurs et met en relation plusieurs organes dans un environnement défini. C'est pourquoi il est difficile de l'étudier dans des modèles *in vitro*. Plusieurs modèles animaux (souris, lapins, primates) ont alors été mis au point afin de pouvoir tirer des conclusions probantes sur cette maladie. Ignatowski a été le premier à développer un modèle animal en étudiant les plaques d'athérome de l'aorte chez des lapins soumis à un régime hypercholestérolémique et hyperprotéique (Ignatowski, 1909). Malgré le développement de ces modèles, aucun n'est parfait et ne reproduit exactement toutes les caractéristiques de la maladie chez l'humain. Bien que les primates non humains constituent le modèle le plus proche de celui de l'humain, les problèmes éthiques, financiers, temporels et statistiques en terme de nombre d'individus posent problème dans l'étude de l'athérosclérose (Emini Veseli et al., 2017).

La souris est un modèle bien moins coûteux, et plus facilement exploitable. Chez ces animaux, plus de 80% du cholestérol est transporté par les HDL et éliminé par le foie. Il ne s'accumule donc pas au sein des parois vasculaires. Au contraire de l'humain, la souris ne possède pas non plus la CETP qui permet via son interaction avec des VLDL et HDL de former les LDL nécessaires au développement de l'athérome (Barter et al., 2003). Il faut alors modifier génétiquement ces animaux afin d'obtenir un développement de plaques sur des sites définis (valves, bifurcation carotidienne, bifurcation iliaque). La combinaison de ces modifications génétiques et de l'emploi de régimes modifiés hypercholestérolémiques permet le développement de la maladie (Oppi et al., 2019).

Les plaques d'athérome chez la souris se concentrent en majorité au niveau de l'aorte proximale, autour des valves (Breslow, 1996). Elles ne développent généralement pas de maladie coronaire, et il n'y a pas de rupture de plaques (Oppi et al., 2019).

## 2. Le modèle ApoE<sup>-/-</sup>

L'apoE, est une apolipoprotéine qui, comme vu précédemment, permet la fixation des VLDL, des remnants de chylomicrons ainsi que des HDL sur leurs récepteurs au niveau du foie. Dans ce modèle déficient pour la protéine ApoE, il n'y a donc plus de clairance du cholestérol par les lipoprotéines. En résulte une augmentation drastique de son taux plasmatique, qui peut atteindre six fois celui d'une souris non mutée, avec une moyenne de 600 mg/dL contre 100 mg/dL pour une souris sauvage sous régime normal (Nakashima et al., 1994), et jusqu'à même plus de 1000 mg/dL sous régime riche en graisse (Oppi et al., 2019). Ces souris développent des lésions d'athérosclérose même sous régime normal. Le régime gras permet juste d'accélérer le processus. C'est surtout l'augmentation des VLDL, des remnants de chylomicrons et des IDL qui va caractériser le profil lipidique de ces animaux, ce qui est légèrement différent de celui des humains où c'est en majorité les LDL qui vont augmenter. De plus leur taux plasmatique de HDL est aussi abaissé (Table 4) (Emini Veseli et al., 2017; Plump et al., 1992; Zhang et al., 1992).

Quelques limites ont pu être constatées pour ce modèle : apparition d'une inflammation qui va aussi influencer le développement des plaques (Murphy et al., 2011), augmentation des molécules d'adhésion des cellules endothéliales, prolifération et migration des cellules musculaires lisses, peroxydation des lipoprotéines et transport inverse du cholestérol par les macrophages (Getz & Reardon, 2009).

## 3. Le modèle LDL-R<sup>-/-</sup>

Ces souris sont mutées et n'expriment pas le récepteur aux LDL. Ni l'apoB, ni l'apoE ne peuvent donc se lier à celui-ci et les lipoprotéines restent en libre circulation dans le plasma. C'est un modèle plus proche de l'humain car leur profil lipidique s'en rapproche contrairement aux souris décrites précédemment. En effet, la majorité du cholestérol provient bien des LDL (Ishibashi et al., 1993, 1994). De plus, il existe déjà chez l'humain des mutations de ce récepteur induisant des hypercholestérolémies familiales. Il n'y a pas ou très peu de développement de plaques sous régime normal car le cholestérol en circulation est beaucoup moins élevé, i.e. 200-300 mg/dL de cholestérol contre 600 mg/dL pour les ApoE<sup>-/-</sup> (Ishibashi et al., 1994). Le taux plasmatique de HDL est aussi inchangé. Sous régime gras, le

cholestérol plasmatique se rapproche de celui des ApoE<sup>-/-</sup> et les plaques développées sont similaires (Knowles & Maeda, 2000). Par ailleurs, l'absence de récepteur aux LDL ne cause pas d'inflammation comme chez les ApoE<sup>-/-</sup>, ce qui évite éventuellement un biais (Table 4) (Emini Veseli et al., 2017).

Il est aussi possible, par mutation, de ne faire produire aux souris qu'un seul allèle de l'apoB (apoB-48 associée aux chylomicrons ou ApoB-100 associée aux LDL) en plus de la mutation LDL-R<sup>-/-</sup> ou même ApoE<sup>-/-</sup> déjà présente afin de moduler les taux de cholestérol plasmatique et d'influencer le développement des plaques (Young et al., 2008). Il est également possible de combiner les mutation LDL-R et ApoE chez une même souris. Cette dernière développera un profil lipidique semblable à celui des souris ApoE<sup>-/-</sup> mais avec des lésions plus sévères (Emini Veseli et al., 2017; Witting et al., 1999).

#### **4. Le modèle PCSK9-AAV**

La proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9), découverte en 2003, permet une internalisation ainsi qu'une dégradation lysosomale des récepteurs lipidiques associés aux lipoprotéines de faibles densité (LDL et VLDL). Elle est non seulement exprimée au niveau du foie, mais aussi au niveau des cellules intestinales ou pancréatiques où son rôle n'est pas encore clairement défini. C'est un régulateur de la lipémie et sa surexpression chez la souris permet de dégrader le profil lipidique plasmatique (Cariou et al., 2015; Garçon et al., 2020). La surexpression va être induite par l'injection d'un vecteur viral AAV (défini dans la partie D du chapitre III). L'avantage de ce modèle est qu'une seule injection du virus permet d'obtenir un phénotype cardiovasculaire sous régime gras. Il n'y a généralement pas d'inflammation et le modèle est plus rapidement obtenu que lors d'un croisement classique de souris (Bjørklund et al., 2014; Oppi et al., 2019; Roche-Molina et al., 2015).

#### **5. Le modèle ApoE\*3-Leiden.CETP**

L'ApoE3-Leiden est un variant mutant de l'apoE chez l'humain conduisant à une hyperlipidémie héréditaire. A l'origine développé afin d'étudier plus précisément l'impact *in vivo* de cette mutation, le modèle de souris ApoE3-Leiden possède un profil lipidique proche

de celui de l'humain, mais des taux de cholestérol plasmatiques sous régime normal moindre par rapport aux souris ApoE<sup>-/-</sup> et LDL-R<sup>-/-</sup> (Lutgens et al., 1999; Maagdenberg et al., 1993; Vlijmen et al., 1994).

La CETP, exprimée chez l'humain, organise le transfert ou l'échange d'ester de cholestérol des VLDL et HDL vers les LDL et participe donc à leur formation (Feingold, 2000; Ha et al., 1981).

La combinaison du modèle ApoE3-Leiden avec la mutation permettant aux animaux d'exprimer la CETP humaine a permis d'obtenir des souris ApoE\*3-Leiden.CETP développant de l'athérosclérose et capables de réduire l'efflux de cholestérol médié par les HDL tout en augmentant le taux de VLDL/LDL circulants (Westerterp et al., 2006). Ce modèle peut alors imiter le profil lipidique des patient atteints de syndrome métabolique sous régime riche en graisse en 6 mois, tout en s'affranchissant de l'effet inflammatoire induit par la perte d'apoE chez les souris mutées classiques (Gijbels et al., 1999; Kuhnast et al., 2015; Oppi et al., 2019; Paalvast et al., 2017).

## **6. Les modèles de souris avec rupture de plaque**

Dans les modèles vus précédemment, les plaques se développent bien mais les ruptures et les thrombus n'arrivent que très rarement même sous régime gras soutenu durant plusieurs semaines, au contraire de chez l'humain. Des modèles avec rupture de plaque ont alors été créés (Bentzon & Falk, 2010).

La plupart des modèles imposent une intervention chirurgicale afin de sténoser volontairement les artères ou de fragiliser la paroi. D'autres utilisent des mutations génétiques. Malheureusement, aucun de ces modèles n'arrive à reproduire les caractéristiques complètes de ce qui est observé chez l'humain et la temporalité classique marquée par une rupture de plaque suivi d'une thrombose n'a pas été obtenue chez la souris (Bentzon & Falk, 2010). Par ailleurs, les plaques d'athérome ne se développent presque pas au niveau coronarien (juste au début des ostiums), ainsi, les ischémies cardiaques ou les AVC ne se voient quasiment jamais dans les modèles murins d'athérosclérose connus jusqu'à présent (Bond & Jackson, 2010; Getz & Reardon, 2012; VanderLaan et al., 2004).

Dans le modèle génétique ApoE<sup>-/-</sup> Fbn1<sup>C1039G<sup>+/-</sup></sup>, la protéine Fibrilline 1 est modifiée. Cette dernière est essentielle dans le maintien et l'intégrité des fibres élastiques et de la matrice extracellulaire. La mutation hétérozygote C1039 entraîne une fragilisation des fibres élastiques et un syndrome de Marfan avec les conséquences qui en découlent (rigidité artérielle, hypertension, anévrismes cérébraux et aortiques) (Mariko et al., 2011; Medley et al., 2002; Van Herck et al., 2009). Chez la souris, ce modèle permet d'étudier la rupture des plaques d'athérome avancées. Ces dernières ont alors tendance à se rompre spontanément, sans intervention chirurgicale (Van der Donckt et al., 2015; Van Herck et al., 2009). De plus, on observe aussi une néovascularisation et des hémorragies intraplaques qui déstabilisent l'athérome, comme chez l'humain (Emini Veseli et al., 2017). Des ischémies cardiaques et des morts subites ont par ailleurs été décrites, ce qui rend intéressant ce modèle pour l'étude des plaques instables et avancées (Van der Donckt et al., 2015; Van Herck et al., 2009).

Modèle	Profil lipidique	Topographie des lésions et caractéristiques (20 semaines sous WD)	Avantages et limites du modèle
<p><b>Inhibition du gène ApoE</b></p>  <p><i>ApoE<sup>-/-</sup></i></p>	<p><b>Plasma cholestérol :</b> 400-600mg/dL sous CD &gt;1000mg/dL sous WD</p> <p><b>Lipoprotéines :</b> ↑↑ VLDL ↓ LDL ↓ HDL</p>	<p><b>Plaques fibreuses :</b> Cellules musculaires lisses Matrice extracellulaire Cellules inflammatoires Core nécrotique</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⊕ Développe de l'athérosclérose sous CD</li> <li>⊖ Profil lipidique différent de celui de l'humain</li> <li>⊖ ApoE joue un rôle dans l'inflammation → Influe sur le développement des plaques</li> <li>⊖ Pas de rupture de plaques spontanée, ni de thrombose ou de complications comme chez l'humain</li> </ul>
<p><b>Inhibition du gène du récepteur au LDL</b></p>  <p><i>LDLR<sup>-/-</sup></i></p>	<p><b>Plasma cholestérol :</b> 200-300mg/dL sous CD &gt;1000mg/dL sous WD</p> <p><b>Lipoprotéines :</b> ↓ VLDL ↑↑ LDL = HDL</p>	<p><b>Plaques fibreuses :</b> Cellules musculaires lisses Matrice extracellulaire Cellules inflammatoires Core nécrotique</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>⊕ Profil lipidique proche de celui de l'humain</li> <li>⊕ ApoE fonctionnelle → Pas d'impact sur l'inflammation</li> <li>⊖ Le développement de lésions complexe requiert un WD</li> <li>⊖ Pas de rupture de plaques spontanée, ni de thrombose ou de complications comme chez l'humain</li> </ul>

***Table 4 : Caractéristiques des modèles murins ApoE<sup>-/-</sup> et LDL-R<sup>-/-</sup>***  
*Adapté de Emini Veseli et al., 2017*

CD : régime normal ; WD : régime riche en graisse ; LDLR : récepteur aux LDL

## Chapitre III : La glutamine et ses mécanismes de régulation

Comme nous l'avons vu précédemment, l'athérosclérose est un processus complexe faisant intervenir nombre de voies métaboliques touchant notamment l'homéostasie lipidique, glucidique et l'inflammation. Même s'il existe un nombre conséquent de facteurs de risque cardiovasculaires, l'alimentation reste l'un des principaux coupables dans le développement de la maladie. C'est l'apport hypercalorique qui semble être délétère. Néanmoins, certaines études ont évoqué ces dernières années le rôle important que peuvent jouer les acides aminés dans divers mécanismes physiologiques et physiopathologiques (Cheng et al., 2012; DeBerardinis & Cheng, 2010; Durante, 2019; Paynter et al., 2018). Parmi eux, la glutamine ressort comme un candidat potentiellement intéressant dans le domaine cardiovasculaire.

### A. La glutamine : un acide aminé « conditionnellement essentiel »

#### 1. Description générale

La glutamine a un poids moléculaire de 146,15 kDa. C'est l'acide  $\alpha$ -aminé le plus abondant dans le corps humain (50% du total des acides aminés) (Chen et al., 2022; Spodenkiewicz et al., 2016). Plus précisément, dans le plasma, la glutamine représente à elle seule 20% des acides aminés circulants. Dans les tissus (foie et muscle notamment), ce pourcentage peut monter jusqu'à 60% (Cruzat et al., 2018). En synthèse, plasma et tissus confondus, sa concentration oscille entre 10 et 100 fois celle des autres acides aminés.

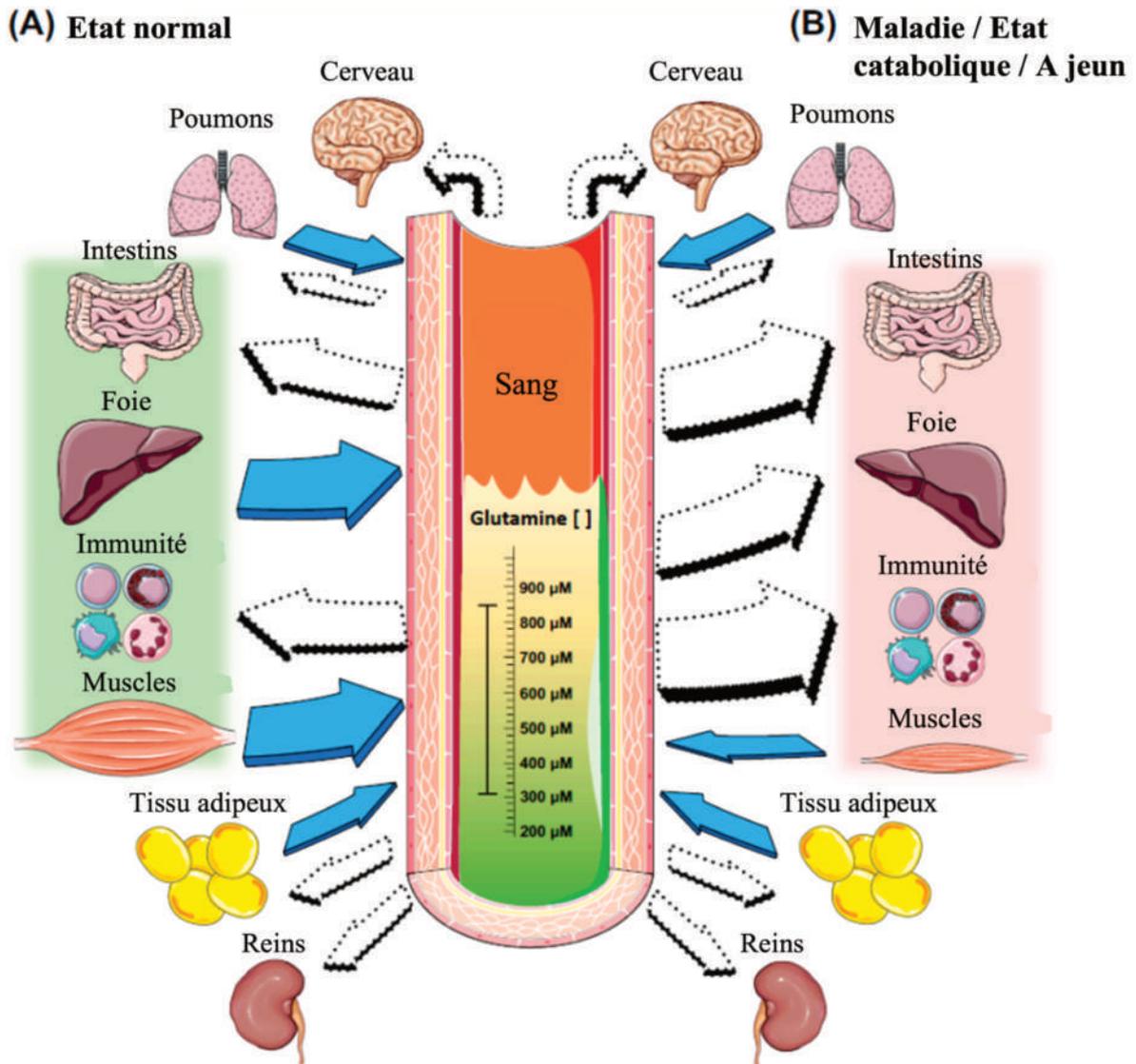
Un individu sain de 70 kg possède entre 70g et 80g de glutamine dans son corps, avec une concentration sanguine qui varie de 500 à 800uM (Figure 19). Chez l'Homme, sa synthèse se fait de manière endogène à partir de glutamate et de  $\text{NH}_4^+$  par une enzyme localisée principalement au niveau des muscles striés squelettiques (mais présente aussi de manière moins importante dans le foie, les poumons ou le tissu adipeux) et appelée glutamine synthétase (GS). 90% de la glutamine provient alors de cette enzyme (Figure 19) (He et al., 2010). Toutefois, la glutamine peut aussi être apportée par l'alimentation (Table 5) (e.g. viande, poisson, produit laitier, céréales, légumineuses). Lors de conditions particulières (e.g. traumatisme, exercice physique intense et prolongé, cancer, infection, etc.), le catabolisme de

la glutamine, médié en majeure partie par les glutaminases, est grandement accéléré. La production endogène diminue au profit de ce catabolisme et un apport exogène devient primordial afin de maintenir une réserve en glutamine optimale. C'est à cet effet que la glutamine est qualifiée d'acide aminé « conditionnellement essentiel » (DeBerardinis & Cheng, 2010; Cruzat et al., 2018) (Figure 19).

Selon le type de tissus, la glutamine peut donner différents produits finaux entrant dans de multiples voies intracellulaires, e.g. glutamate et aspartate dans les cellules immunitaires, alanine, proline et citrulline dans les entérocytes, acide gamma-aminobutyrique (GABA) dans le cerveau (Watford, 1993). Elle est de ce fait un acide aminé indispensable au bon fonctionnement cellulaire et tissulaire.

	Bœuf	Lait écrémé	Riz blanc	Maïs	Tofu	œuf
<b>g/100g Aliments</b>						
Protéines totales	25.9	3.4	2.7	2.5	6.6	12.6
Glutamine	1.2	0.3	0.3	0.4	0.6	0.6
Glutamate	2.7	0.4	0.2	0.05	0.7	1.0
Leucine	2.2	0.4	0.2	0.4	0.5	0.9

***Table 5 : Exemples d'apport en glutamine de divers aliments du quotidien***  
*Adapté de Cruzat et al., 2018*



**Figure 19 : Régulation de la glutamine dans des conditions normales ou cataboliques**

*Adapté de Cruzat et al., 2018*

Les flèches bleues repèrent les tissus qui ont une activité contributive de synthèse de glutamine par la GS. Les flèches blanches en pointillés repèrent les tissus qui ont une activité glutaminase contributive et qui consomment donc de la glutamine. **(A)** Dans des conditions normales, les réserves de glutamine sont en équilibre dans le plasma et les tissus et se maintiennent grâce à la synthèse endogène des muscles et du foie principalement. Le système immunitaire est dépendent de cette production de glutamine et de celle du glucose dans les conditions **(A)** et plus encore dans les conditions **(B)**. **(B)** Dans des conditions cataboliques, les intestins augmentent drastiquement leur consommation en glutamine, tout comme le foie qui passe de producteur à consommateur afin de maintenir une néoglucogénèse adéquate. Le maintien de la réserve en glutamine s'appuie alors presque exclusivement sur la synthèse musculaire. Cependant, cette dernière peut être mise à mal par une protéolyse, une cachexie ou une atrophie des muscles. Les poumons et le tissu adipeux ont une double activité de production et de consommation qui ne change pas quel que soit l'état. Les reins et le cerveau sont des consommateurs de glutamine et ne contribuent pas au maintien de la réserve de cet acide aminé dans l'organisme.

## 2. Les différents rôles de la glutamine

La glutamine possède de multiples rôles ([Cruzat et al., 2018](#); [Chen et al., 2020](#)) :

- Détoxification (transport d'ammoniac)
- Glycémie (néoglucogénèse)
- Homéostasie acidobasique (régulation du pH)
- Immunité (prolifération des cellules immunitaires, polarisation des macrophages, etc.)
- Anti-oxydation (production de glutathion)
- Neurotransmission (production de glutamate)
- Intégrité de la barrière intestinale
- Vasomotricité et angiogénèse

Parmi les éléments cités ci-dessus, le rôle le plus important de la glutamine reste celui du transport d'azote. En effet, elle permet, via les glutaminases, la détoxification de l'ammoniac et la production d'urée à partir des nutriments drainés par la veine porte ([Cruzat et al., 2018](#)). Ce rôle sera détaillé dans la partie C section 3-iii de ce chapitre.

Très importante au niveau du foie, elle participe au processus de néoglucogénèse qui permet de maintenir un taux de glucose sanguin adéquat lors des périodes de jeûne. La glutamine affecte de même la balance osmotique et donc le volume des hépatocytes, ce qui altère la production de bile, de glycogène et d'acides gras libres ([Häussinger et al., 1992](#); [Häussinger & Schliess, 2007](#)). Par ailleurs, elle intervient indirectement dans la régulation du pH. En effet, la synthèse d'urée à partir de glutamine entraîne la consommation et l'élimination d'ions bicarbonates. De plus, en réaction à une acidose, la glutaminolyse est augmentée au niveau rénal et les ions ammonium résultants sont excrétés dans l'urine permettant une ré-équilibration acido-basique (Curthoys & Watford, 1995).

La glutamine assure aussi la prolifération et la bonne fonction des cellules immunitaires (i.e. macrophages, neutrophile et lymphocytes) ainsi que leur différenciation. En effet, elle permet par exemple la production d'oxyde nitrique et de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages. De même on lui impute un rôle dans leur polarisation. Au contraire, la déplétion en glutamine réduit la prolifération lymphocytaire, induit l'apoptose cellulaire, et

perturbe l'expression des protéines de surface (Roth, 2008). Par ailleurs, elle est à l'origine de la production de glutathion (GSH). Ce dernier est le garant du potentiel d'oxydoréduction des cellules et lutte ainsi contre le stress oxydant (Durante, 2019). Au niveau cérébral, elle participe au maintien du pH intra et extracellulaire des neurones via les transporteurs membranaires et les échangeurs d'ions H<sup>+</sup> (acidification extracellulaire et alcalinisation intracellulaire). Elle est également à l'origine de la production d'acide gamma aminobutyrique (GABA) et de glutamate qui sont d'importants neurotransmetteurs. (Nissim, 1999). Au niveau intestinal, elle sert à la protection de la muqueuse gastrique (Ma et al., 2018). Enfin, elle permet grâce à l'asparaginase d'intervenir dans le processus d'angiogenèse et de vasomotricité avec la production d'oxyde nitrique (J. Chen et al., 2020; Durante, 2019).

Afin de remplir ces différents rôles, elle est impliquée dans plusieurs voies métaboliques essentielles à la cellule.

### **3. Les voies métaboliques de la glutamine**

La glutamine emprunte un nombre conséquent de voies métaboliques dont les principales sont listées ci-dessous (Figure 20) :

#### **i. La voie des acides nucléiques**

La glutamine, par son groupement amide, et en présence de glycine et d'aspartate, permet la synthèse des purines et pyrimidines, constituant les acides nucléiques. Une faible concentration de glutamine entraîne donc une faible production d'acide nucléiques. La prolifération cellulaire en est alors fortement impactée (DeBerardinis & Cheng, 2010; Durante, 2019; Jacque, 2015).

## ii. La voie des hexosamines

Elle entre aussi dans des voies de glycosylation. En effet, la glutamine peut être transformée directement dans le cytosol en glutamate par la glutamine fructose 6-phosphate amidotransférase (GFAT). Son groupement amide est utilisé avec le fructose 6-P dans la voie des hexosamines afin de produire l'uridine diphosphate N-acétylglucosamine (UDP-GlcNac) qui va servir à la N-glycosylation ou à la O-glycosylation (DeBerardinis & Cheng, 2010).

La N-glycosylation est réalisée dans le réticulum endoplasmique et consiste en l'apposition d'un carbohydrate (sucre) sur un résidu asparagine, tandis que la O-glycosylation dans le golgi en permet l'apposition sur une sérine ou une thréonine. Cette glycosylation est particulièrement importante car elle peut changer les fonctions transcriptionnelles des protéines ou encore leur localisation et leur activité catalytique (Gudelj & Lauc, 2018; Jacque, 2015). Par ailleurs la N-glycosylation aide aussi à la polarisation M2 des macrophages (Jha et al., 2015). L'altération de la glycosylation peut provoquer une dyslipidémie ou une inflammation et entraîner une dysfonction endothéliale. Elle facilite ainsi le développement de l'athérosclérose (Groux-Degroote et al., 2020; Pirillo et al., 2021; Shrikhande et al., 2010)

## iii. La synthèse protéique

La glutamine, seule, ou via le glutamate, est un donneur d'azote pour la synthèse de certains acides aminés tels que l'alanine, la sérine, la glycine ou encore l'aspartate. Elle permet en effet le transfert de son groupe azoté sur les cétoacides via des transaminases (alanine aminotransférase [ALAT], aspartate aminotransférase [ASAT], phosphosérine transférase, etc...). De même, elle permet la synthèse d'asparagine à partir de l'aspartate via l'asparagine synthase (Jacque, 2015).

Par ailleurs, elle semble aussi impliquée dans l'expression génique des protéines contractiles ( $\alpha$ -MHC ou  $\alpha$ -actine) ainsi que des Heat Shock Protein (HSP) (Cruzat et al., 2018).

#### iv. La glutamylation et polyglutamylation

La glutamine est le substrat principal du glutamate qui va servir à la glutamylation. La glutamylation, ou polyglutamylation est l'ajout d'un ou plusieurs résidus glutamate sur des tubulines, constituants des microtubules des cellules. L'enzyme qui permet une telle modification est la protéine ligase-like tubulin tyrosine (TTLL). A l'inverse, l'enzyme permettant une déglutamylation est la carbopeptidase cytosolique (CCP) (*group Janke, 2012*).

La glutamylation permet entre autres aux microtubules d'interagir avec des enzymes dans des organes ou des conditions spécifiques. Cette modification post-translationnelle du cytosquelette est importante et agit notamment sur les processus de mécano-transduction. En effet, elle aide au maintien de la forme cellulaire en stabilisant les microtubules. De plus, bien qu'elle ne soit pas impliquée dans l'adhérence des cellules avec la MEC, elle semble tout de même liée à sa rigidité (i.e. plus la MEC est rigide, plus l'activité glutaminase est augmentée et plus les microtubules sont glutamylés) (Torrino et al., 2021). Par ailleurs, elle semble aussi impliquée dans la motilité ciliaire (Wloga et al., 2017; Wang et al., 2021). Enfin, cette glutamylation est aussi nécessaire au transport axonale et au maintien de l'intégrité des centrosomes lors de la prolifération cellulaire. (Janke & Magiera, 2020).

#### v. La Transglutaminase 2

La transglutaminase 2 (TGM2 ou TG2) est exprimée de manière ubiquitaire. La réaction catalysée est la suivante : glutamine protéique + alkylamine  $\rightarrow$  N<sup>5</sup> alkylglutamine + NH<sub>3</sub>, ce qui permet la formation de liaisons covalentes entre deux protéines comportant des résidus lysines et des résidus glutamines. Cette enzyme est fortement exprimée dans les cellules endothéliales, les monocytes/macrophages ou encore les fibroblastes. Elle peut être aussi extracellulaire et retrouvée au niveau de la membrane plasmique ou de la matrice.

La TGM2 est impliquée dans bon nombre de voie intracellulaires (différenciation, adhésion et migration cellulaire, apoptose, autophagie, inflammation, réparation tissulaire, etc.). En fonction de sa localisation, et des stimuli perçus (stress oxydant), son activité biochimique sera différente. Par exemple, dans le noyau, elle sera impliquée dans la régulation de l'expression des gènes. Dans les cellules, elle permettra de maintenir la structure

cellulaire et ses propriétés contractiles (Nurminskaya & Belkin, 2012; Piacentini et al., 2014). Au niveau extracellulaire, elle permet entre autres le maintien de l'intégrité de la MEC en maintenant l'interaction des protéines entre elles. Ainsi, les polymères existants sont plus stables (e.g. les fibres de collagènes) (Keillor et al., 2015). Des différences d'expression de la TGM2 sont associés à un certain nombre de maladies chez l'humain, telles que la maladie cœliaque, la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson ou la dermatite herpétiforme. Elle pourrait jouer un rôle potentiel dans l'athérosclérose mais celui-ci n'est pas bien défini et les études se contredisent (Keillor & Johnson, 2021; Chen et al., 2022; Matlung et al., 2012; Nurminskaya & Belkin, 2012; Piacentini et al., 2014).

#### vi. Le cycle de Krebs

La glutamine est transformée en glutamate via la glutaminase dans la mitochondrie et entre dans le cycle de Krebs par l' $\alpha$ -cétoglutarate obtenu après transformation par la glutamate déshydrogénase (GLUD) ou par les transaminases (ASAT [GPT1] et ALAT [GOT1]). Ce cycle est le carrefour important de différentes voies métaboliques telles que la glycolyse, la synthèse des acides gras libres, la glutaminolyse, ou encore la synthèse de la proline. Le rôle du glutamate et le cycle de Krebs seront détaillés dans la partie B de ce chapitre.

#### vii. Autres voies

Elle permet entre autres l'import de la leucine dans le cytoplasme des cellules via l'échangeur SLC7A5. Cette dernière entre dans la voie mTORC1 importante pour la multiplication cellulaire mais aussi la taille et la masse des muscles (Cruzat et al., 2018).

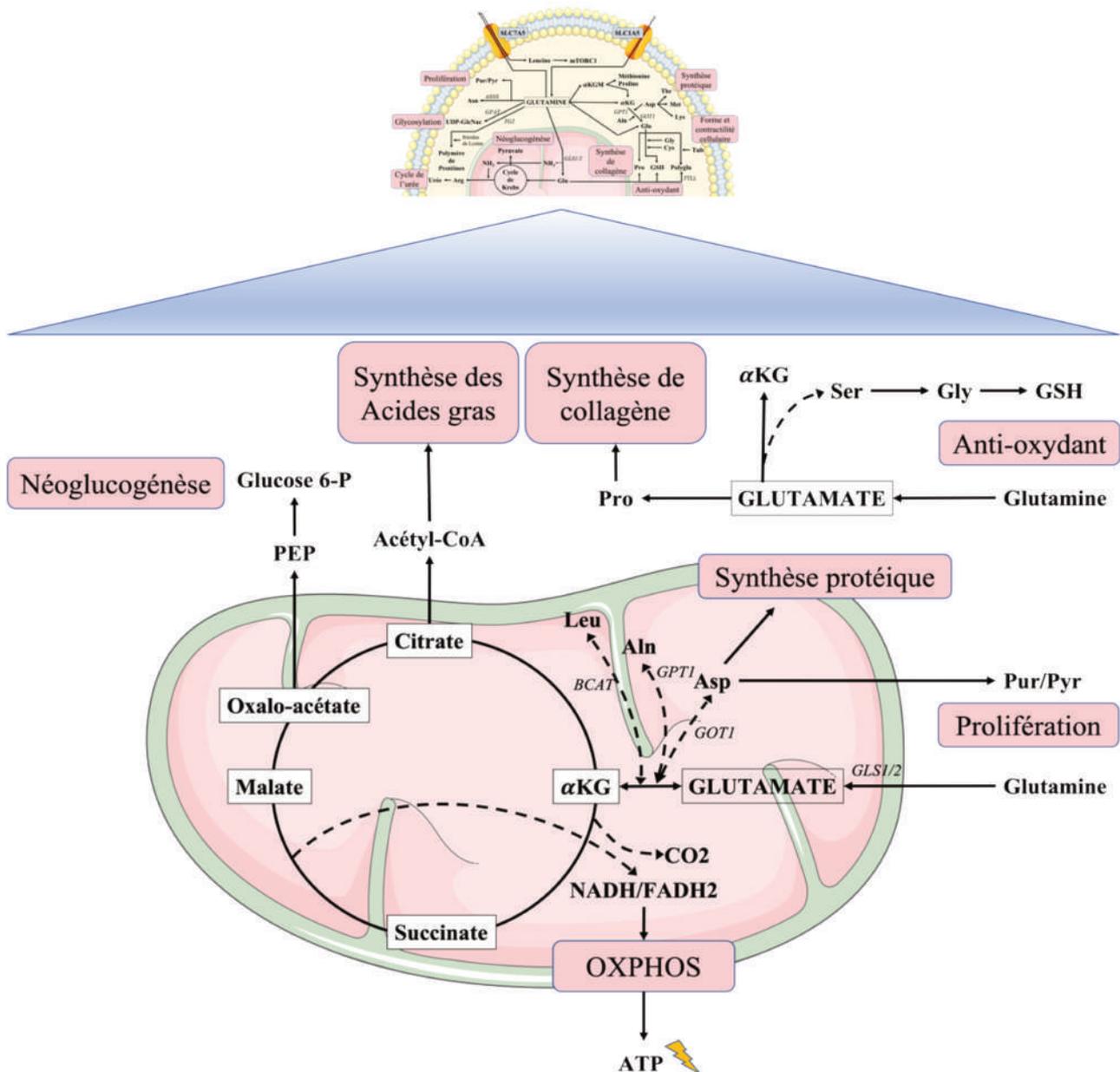


(GLUD). In fine, cela permettra d'aboutir à la production de CO<sub>2</sub> et de nombreuses molécules d'ATP via la phosphorylation oxydative mitochondriale (Altman et al., 2016; Stumvoll et al., 1999). Par ailleurs, l' $\alpha$ -cétoglutarate produit peut aussi servir à la production de citrate qui va être utilisé pour la synthèse des acides gras libres nécessaires à la formation des triglycérides (Altman et al., 2016). De même, dans le rein et le foie, il peut conduire à la formation d'oxaloacétate puis de phosphoénolpyruvate qui va être converti en glucose en empruntant la voie de néoglucogénèse (Stumvoll et al., 1999).

Les transaminases (ALAT et ASAT) peuvent de même, tout comme la GLUD, métaboliser aussi le glutamate en  $\alpha$ -cétoglutarate tout en produisant de l'alanine ou de l'aspartate. Cet aspartate est particulièrement intéressant car il permet la synthèse des bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques (Altman et al., 2016; Jacque, 2015) Il est à noter que d'autres acides aminés, tels que la sérine, la glycine, ou encore la proline dérivent directement de la transformation du glutamate dans le cytosol par des aminotransférases. Ceci permet la synthèse de protéines, de glutathion (anti-oxydant cellulaire) ou encore de fibres de collagènes, constituants de la MEC (Yoo et al., 2020).

A l'inverse, le glutamate peut être produit à partir du cycle de Krebs par les mêmes enzymes que décrites précédemment (Altman et al., 2016), mais aussi à partir des acides aminés à chaîne latérale ramifiée (BCAA) notamment la leucine.

En synthèse, le métabolisme glutamine/glutamate permet de faire fonctionner correctement le cycle de Krebs. Il peut emprunter nombre de voies métaboliques indispensables à la survie des cellules (production de NADH, d'ATP, de glucose, d'acides gras, de protéines, etc.). Il semble alors normal que la plupart des tissus possèdent les enzymes (glutaminases et glutamine synthétase) capables de moduler en fonction des stimuli la production ou la dégradation de la glutamine et du glutamate nécessaires au cycle de Krebs.



**Figure 21 : cycle de Krebs et métabolisme du glutamate**

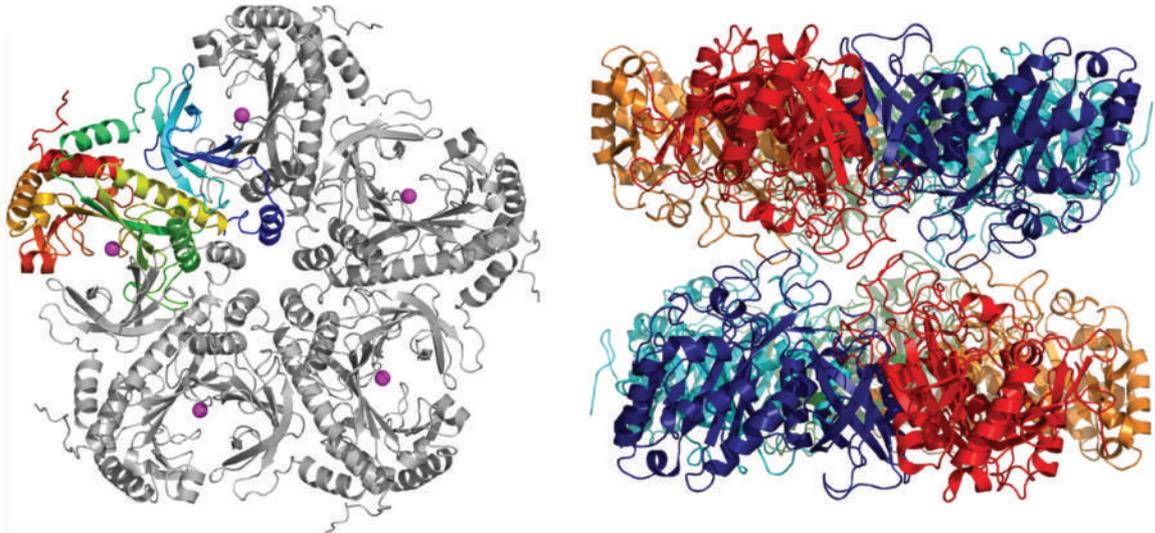
*La figure a été en partie créée en utilisant Servier Medical Art, fourni par Servier, placé sous licence Creative Common Attribution 3.0 unported License.*

Le glutamate peut être obtenu par l'activité de la glutaminase au niveau mitochondrial où il va rentrer dans le cycle de Krebs. Il va permettre ainsi de remplir diverses fonctions nécessaires à l'homéostasie cellulaire.

$\alpha$ KG :  $\alpha$ -cétooglutarate. Asp : Aspartate. BCAT : Transaminase des acides aminés à chaîne latérale. Glucose 6-P : Glucose 6-phosphate. GLS1/2 : glutaminase 1 ou 2. Gly : Glycine. GOT1 : transaminase glutamate-oxalo-acétate 1 (ASAT). GPT1 : transaminase glutamate-pyruvate 1 (ALAT). GSH : Glutathion. Leu : leucine. OXPHOS : phosphorylation oxydative mitochondriale. PEP : phosphoénolpyruvate. Pro : Proline. Pur : purines. Pyr : pyrimidines. Ser : sérine.

## C. Les enzymes métabolisant la glutamine et le glutamate

La production de glutamine se fait via une enzyme appelée glutamine synthétase (GS) au niveau des muscles principalement (Figure 22).



***Figure 22 : Structure cristallographique de la glutamine synthétase***

*D'après Krajewski et al., 2008*

Décimère de Glutamine Synthétase. A gauche, une sous-unité entière est colorée. La région bleue correspond à la région N-terminale, la rouge à la région C-terminale (site catalytique). Les ions magnésium sont colorés en violet.

### 1. La glutamine synthétase (GS)

#### i. Description générale

Codée par le gène *GLUL*, l'un des gènes les plus anciens, situé en 1q23 (Clancy et al., 1996), la glutamine synthétase (GS) existe sous trois types (Joo et al., 2018; Kumada et al., 1993) :

- Type I et III (exclusivement chez les procaryotes)
- Type II (chez les eucaryotes et les procaryotes)

Son gène est composé de 7 exons, séparés par 6 introns (Mill et al., 1991). Elle métabolise, en présence d'ATP et d'ion magnésium ou manganèse, le glutamate et

l'ammonium en glutamine (Figure 22 et 23) (Harth & Horwitz, 1999, 2003; Nilsson et al., 2009).

## ii. Structure

La GS est composée de plusieurs sous unités avec un site de fixation pour le glutamate, un pour l'ammonium et un pour l'ATP (Figure 22) (de Carvalho Fernandes et al., 2022; He et al., 2009; Unno et al., 2006). Elle s'organise en décamère et est la seule enzyme qui permet la formation de la glutamine (Eisenberg et al., 2000; Krebs, 1935). Elle est présente en grande majorité au sein des muscles striés et en moindre quantité dans de nombreux autres organes dont le foie, près des veines centrales. Au niveau cellulaire elle se localise dans le cytosol (Martinez-Hernandez et al., 1977). Il est à noter que les leucocytes ne possèdent pas cette enzyme et n'ont donc pas de pouvoir de synthèse endogène mais possèdent des glutaminases capables de glutaminolyse. Ils sont alors dépendants de la synthèse endogène de glutamine fournie par les muscles (Cruzat et al., 2018).

## iii. Fonction

C'est au niveau cérébral que la GS est la plus étudiée. Plusieurs équipes ont montré qu'elle était responsable d'épilepsies (Eid et al., 2004; van der Hel et al., 2005). Chez l'humain, elle est essentielle dans les astrocytes afin de réguler les concentrations d'ammoniac et de fournir les neurones en glutamine. De même, sur le plan hépatique, elle exerce encore un contrôle du taux d'ammoniac en captant les molécules de  $\text{NH}_3$  provenant de l'apport alimentaire et qui auraient échappées à la métabolisation en urée par les hépatocytes péri-portaux. Son activité est alors réduite durant le jeûne (Watford, 1993). En utilisant les ions ammonium pour synthétiser de la glutamine, elle participe au maintien de l'équilibre acidobasique et son expression peut être modifiée en cas d'acidose métabolique (Conjard et al., 2003; Watford, 1993).

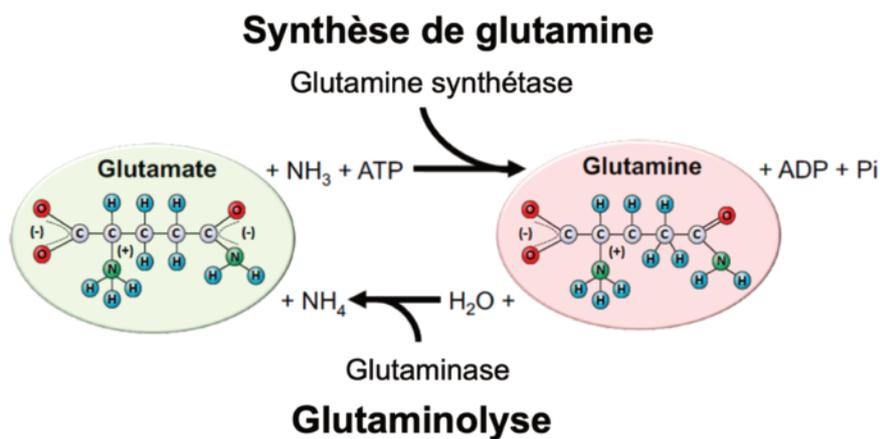
## iv. Régulation

Son expression ou son inhibition est étroitement corrélée au taux de glutamine tissulaire. Ainsi, en cas de stress aigu, de prise de glucocorticoïdes ou d'hormones de croissance, la GS est surexprimée (Gebhardt & Williams, 1995; Labow et al., 1999). Cette

augmentation d'expression vient en réponse à une augmentation de la consommation en glutamine des autres organes (foie, intestins) et à une baisse de la réserve en glutamine des muscles. Par ailleurs, elle est surexprimée par certains types de cancers non sensibles à la privation de glutamine, à savoir des cancers du sein de type luminal (Kung et al., 2011).

Sur le plan cardiovasculaire, peu d'études sont consacrées à la glutamine synthétase. On relate notamment qu'elle serait augmentée en cas de diabète et impliquée dans le processus d'angiogenèse (Eelen et al., 2018; Feng et al., 1990).

Enfin, un déficit enzymatique en GS entraîne une hyperammoniémie délétère (Navazio et al., 1961).



**Figure 23 : Réaction médiée par la glutamine synthétase (GS)**

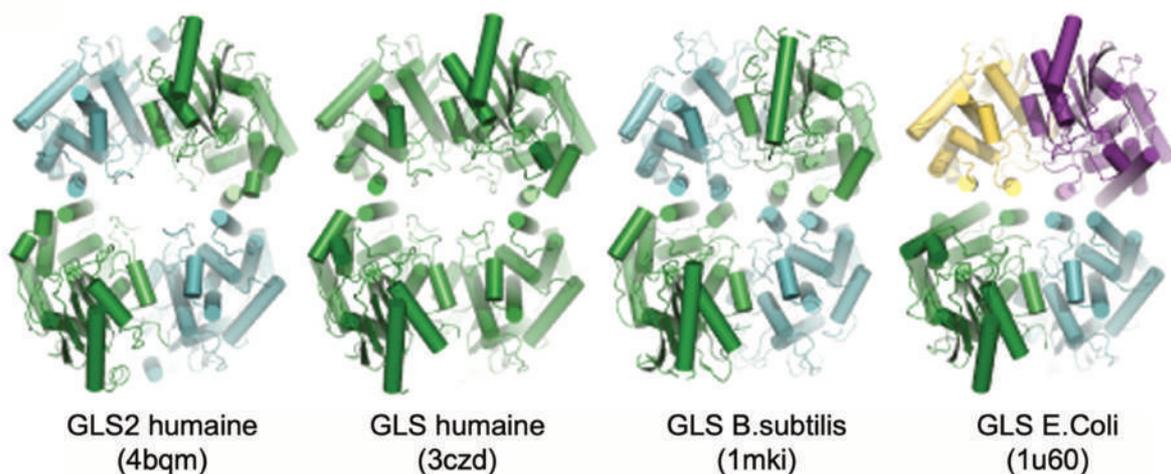
Adapté de Cruzat et al., 2018

A l'inverse, l'hydrolyse de la glutamine en glutamate est obtenue par deux types de glutaminases initialement découvertes par Krebs (Krebs, 1935) :

- la « Brain ou Kidney type » glutaminase (GLS1)
- la « Liver type » glutaminase (GLS2)

Ces dernières catabolisent toutes deux la glutamine par la même réaction mais leur localisation et leur activité est différente suivant la période de vie ou le tissu étudié (Figure 24). Ces enzymes sont dites intra-mitochondriales, cependant quelques études tendent à montrer qu'elles peuvent se retrouver aussi dans le cytosol (Cassago et al., 2012; Katt et al., 2017).

Bien que le rôle pro cancéreux de la GLS1 soit déjà documenté avec de nombreux inhibiteurs de glutaminases testés dans ce domaine, le rôle biologique de la GLS2, lui, reste encore à définir.



***Figure 24 : Structures cristallographiques des glutaminases***

*D'après Ferreira et al., 2021*

Comparaison des tétramères des domaines catalytiques de la GLS2, de la GLS1 et des glutaminases de deux bactéries (*B. subtilis* et *E.Coli*). On note une conservation de la structure entre espèces. Les différentes couleurs représentent les domaines équivalents.

## 2. La glutaminase 1 (GLS1)

### i. Description générale

La GLS1 a été identifiée en 1989 (Mock et al., 1989) mais ce n'est qu'en 1999 que ses 3 isoformes (la glutaminase C [GAC], la KGA et la GAM) dérivant d'épissage alternatif ont été identifiées (Elgadi et al., 1999). Son gène se trouve sur le chromosome 2 (Aledo et al., 2000), mesure 82kb et possède 19 exons, dont les 15 premiers forment la GAC (Matés et al., 2018).

La KGA et la GAC sont les 2 isoformes les plus longues (669 et 598 acides aminés respectivement). La GAM est l'isoforme la plus courte avec une longueur de 169 acides aminés mais les 72 premiers sont clivés dès l'entrée dans la mitochondrie. Elle n'a alors a priori pas de fonction glutaminase, et est seulement retrouvée dans le cœur et le muscle.

### ii. Structure

Les structures cristallographiques de la KGA et de la GAC ont été réalisées (Cassago et al., 2012; DeLaBarre et al., 2011; Ferreira et al., 2013; Thangavelu et al., 2014).

Toutes deux possèdent une structure commune, à savoir une séquence d'adressage à la mitochondrie, une séquence d'adressage au récepteur nucléaire (nuclear receptor box [NR box]) et un domaine enzymatique. Des différences existent sur la fin de la séquence : la KGA possède une répétition ankyrine suivi d'une KEN box et d'une Destruction box (D box). Ces séquences sont reconnues par une ubiquitine ligase (le complexe APC/C-Cdh1) qui va permettre une régulation de la protéine lors de certaines phases du cycle cellulaire. La GAC n'a pas de séquence particulière (Figure 25). Ces 2 isoformes sont actives sous forme de tétramères, formés à partir de la phosphorylation de 2 dimères (Figure 24) (Cassago et al., 2012; DeLaBarre et al., 2011; Ferreira et al., 2013; Thangavelu et al., 2014).

### iii. Fonctions

La GLS1 est essentielle chez le fœtus durant les premières semaines de vie. Elle contribue majoritairement à la formation de la plupart des organes mais aussi à la

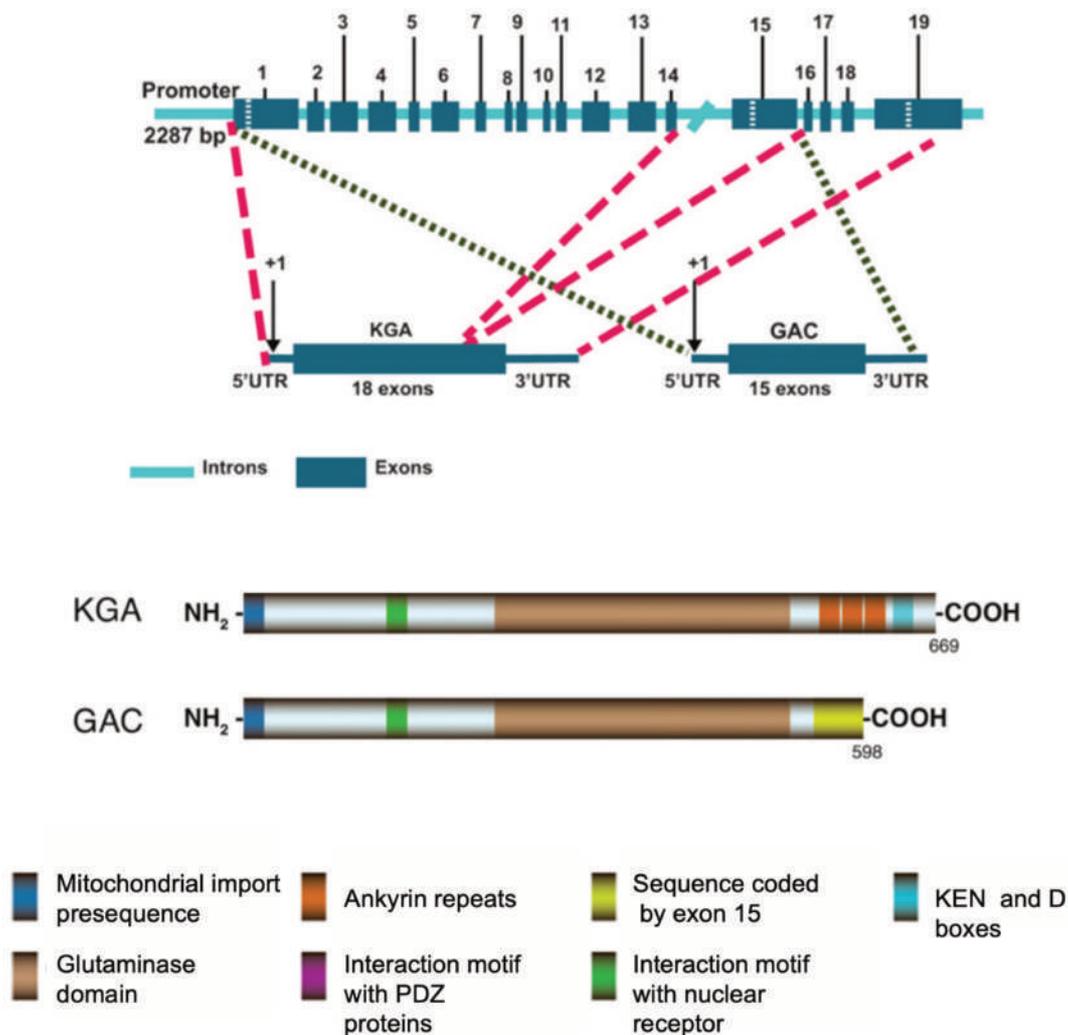
transmission glutamatergique dans les connexions synaptiques. Ainsi, une inhibition totale de cette protéine s'avère non viable chez la souris. A l'âge adulte, bien que présente dans la majorité des tissus, elle joue un rôle majeur dans le rein. En effet, elle permet le maintien de l'équilibre acido-basique en produisant de l'ammonium à partir de la glutamine ou la production de glucose par la voie de la néoglucogénèse (Watford, 1993). Elle possède un rôle important dans la division cellulaire car elle permet non seulement d'alimenter le cycle de Krebs mais elle permet aussi la synthèse de nucléotides, plus précisément des bases puriques et pyrimidiques.

#### iv. Régulation

Sur le plan physiologique, l'activité de la GLS1 est surtout modifiée en fonction de la modification du pH sanguin. En effet, l'expression de son ARNm va être modulée au niveau rénal en réponse à une acidose ou une alcalose de l'organisme. (Watford, 1993) (Laterza & Curthoys, 2000). Elle permet entre autres de produire des ions ammonium qui vont être excrétés dans l'urine et maintenir l'équilibre acido-basique plasmatique.

La GAC est par ailleurs surexprimée par bon nombre de cellules cancéreuses, i.e. cancers du sein, du colon, du cerveau (glioblastome et astrocytomes), ou encore du poumon. L'expression de la GAC est surtout régulée par l'oncogène c-Myc ou le facteur de transcription NF $\kappa$ B, exprimés fortement dans les cancers.

La KGA, elle, est retrouvée en majorité dans des tissus non tumoraux. Cette différence peut s'expliquer par le fait que la GAC possède une activité enzymatique plus prononcée que son homologue la KGA car son affinité pour la glutamine est plus grande en présence de phosphate inorganique.



**Figure 25 : Structure de la glutaminase 1 (GLS1)**  
*Adapté de Mates et al., 2011*

### 3. La glutaminase 2 (GLS2)

#### i. Description générale

La GLS2 est constituée de deux isoformes : La glutaminase B ou GAB et la LGA (de la Rosa et al., 2009; Martín-Rufián et al., 2012).

La « Liver type GlutAminase », soit LGA, a été clonée pour la première fois dans une lignée de cancer du sein ZR-75 (Gómez-Fabre et al., 2000). Son nom vient de son homologie avec la LGA du rat (Chung-Bok et al., 1997). En réalité, on sait maintenant que cette isoforme

qui a été découverte en 2000 n'est autre que celle qui est appelée actuellement GAB. Cette enzyme est codée par le gène GLS2, mesurant 18 kb, présent sur le chromosome 12 et comportant 18 exons et 17 introns. De nombreuses séquences sont en fait similaires avec l'isoforme KGA de la GLS1 (Pérez-Gómez et al., 2003). Parmi les deux transcrits fonctionnels, la GAB est l'isoforme la plus longue, composée de l'exon 1 à 18 et comportant 602 acides aminés. La LGA est la plus courte, étant transcrite à partir de l'exon 2, avec une longueur de 565 acides aminés (Figure 26) (de la Rosa et al., 2009; Martín-Rufián et al., 2012).

Bien que présente dans une multitude d'organes (foie, rein, cerveau, intestins, cœur, etc.), l'ARN messager de la GLS2 n'est retrouvé en majorité qu'au niveau du foie (Gómez-Fabre et al., 2000).

## ii. Structure

La GAB et la LGA, diffèrent non pas par leur extrémité C-terminale comme les isoformes de la GLS1 mais par leur extrémité N-terminale. C'est sur cette extrémité N-terminale que la GAB possède une séquence d'adressage à la mitochondrie et une NR box sur l'exon 1, indiquant ainsi que sa localisation pourrait ne pas être restreinte à la mitochondrie (Figure 26) (Gómez-Fabre et al., 2000; Márquez et al., 2006).

La GAB est obtenue en premier sous la forme d'un précurseur de 66 kDa qui après adressage à la mitochondrie et clivage de 38 à 39 résidus N-terminaux atteint 63 kDa. Quant à la LGA, elle ne dépasse pas les 58 kDa (Katt et al., 2017; Mates et al., 2011). Les deux isoformes possèdent un module PDZ ainsi qu'une répétition ankyrine à la fin de la séquence qui leur permettent d'interagir avec d'autres protéines (transporteurs d'ions, cytosquelette, régulateurs du cycle cellulaire, etc.) (Gómez-Fabre et al., 2000; Márquez et al., 2006).

Ainsi, même si l'homologie de séquence entre GLS1 et GLS2 semble importante, la différence majeure entre les deux types de glutaminase semble résider au niveau de l'exon 18 de la GLS2. Ce dernier est impliqué dans l'interaction protéine-protéine et l'adressage à d'autres types d'organelle (Olalla et al., 2001).

### iii. Fonction

Cette enzyme est essentielle à l'âge adulte, et sa production principale se situe au niveau du foie, après la naissance. En effet, elle n'est pas exprimée dans le foie fœtal, seule la GLS1 y est synthétisée (Watford, 1993).

Il existe une zonation des différentes enzymes au niveau hépatique. La GLS2 est exprimée par les hépatocytes péri-portaux (passage des nutriments provenant des intestins) tandis que la GS est présente proche des veines centrales (passage vers la circulation sanguine). Cette répartition corrèle avec leur fonction. En effet, dans le foie, la GLS2 métabolise, en présence d'ion magnésium ou manganèse, la glutamine en glutamate et en ammoniac. Ce dernier ressortira sous forme d'urée qui sera éliminée par les reins. L'ammoniac résiduel qui a court circuité le passage péri-portal sera capté par la GS dans les hépatocytes péri-centraux qui reformera de la glutamine. Cette glutamine retournera vers la GLS2, ce qui constituera un cercle fermé permettant une détoxification efficace de l'ammoniac (Cruzat et al., 2018). La GLS1 est par ailleurs aussi présente au niveau péri-central mais son rôle n'est pas très bien défini dans cet organe.

La GLS2 est aussi nécessaire au maintien de l'équilibre glucidique, tout comme la GLS1 à un moindre degré au niveau rénal. Comme vu précédemment, elle permet à la glutamine de rejoindre la voie de la néoglucogénèse en utilisant le cycle de Krebs via le glutamate et en formant du phosphoénolpyruvate à partir d'oxaloacétate (Mao et al., 2022). Elle pourrait par ailleurs jouer un rôle dans la protection contre le développement d'une stéatose hépatique non alcoolique (NAFL) (Simon et al., 2020). Dans les cellules tumorales, elle aurait plutôt un rôle de suppresseur de tumeur (cancer du côlon, hépatocarcinome, ou encore glioblastome) (Szeliga et al., 2005; Zhuang et al., 2019). Une surexpression de la GLS2 dans ces néoplasies entrainerait une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses (Márquez et al., 2016; Martín-Rufián et al., 2014; Szeliga et al., 2014). Ce rôle anti tumoral est toute de même controversé par certaines études dans les lignées HepG2 ou dans les cancers cervicaux résistants au traitement où elle y est surexprimée (Lee et al., 2014; Xiang et al., 2013). Sa fonction antioxydante, productrice des précurseurs de GSH permet la diminution des ROS.

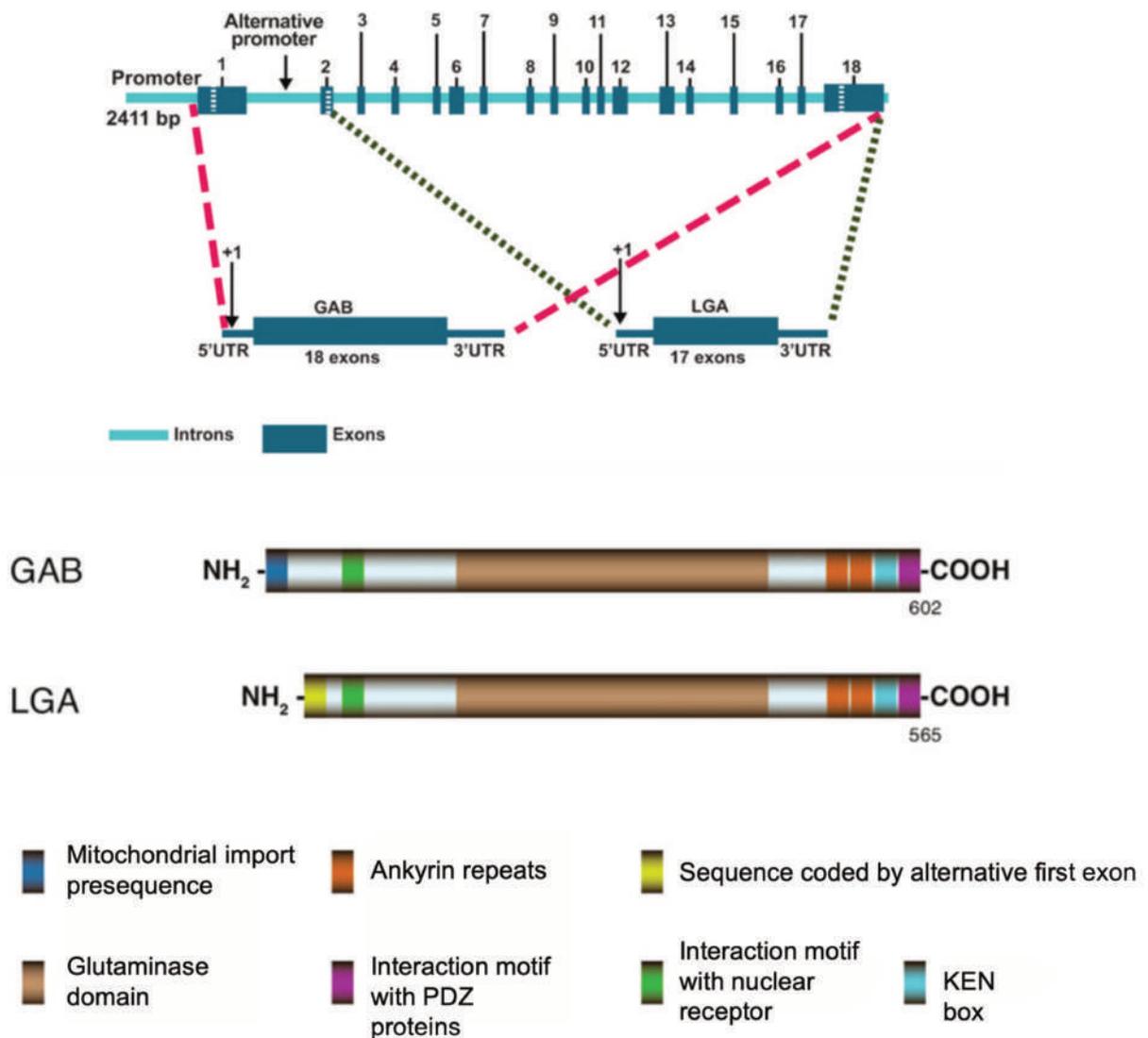
#### iv. Régulation

La GLS2 a été initialement qualifiée d'enzyme mitochondriale. Toutefois, il a été montré qu'elle pouvait être présente dans un nombre conséquent de compartiments cellulaires différents. A titre d'exemple, dans le système nerveux central, la GLS2 est localisée non seulement dans la mitochondrie mais aussi dans le noyau des cellules neuronales et astrocytaires (Cardona et al., 2015; Olalla et al., 2002). De même, dans les neutrophiles, elle peut être présente dans des granulations secondaires cytosoliques proches de la membrane cellulaire, renforçant l'hypothèse de son rôle anti bactérien (Castell et al., 2004). Plus précisément, si l'on s'intéresse à ses isoformes, plusieurs études et simulations évoquent des localisations différentes au niveau mitochondrial, cytosolique ou encore nucléaire (Katt et al., 2017; Olalla et al., 2002). Par ailleurs, sur le plan tissulaire, des explorations ont été menées chez le rat et l'isoforme LGA a été retrouvée en majorité dans le foie, et la GAB en majorité dans le cerveau. Chez la souris, c'est l'inverse qui est constaté. En sus, dans ce dernier modèle, le niveau d'expression de la KGA (isoforme de GLS1) est notamment quinze fois plus élevé que celui de la LGA (isoforme de GLS2) au niveau cérébral (Martín-Rufián et al., 2012). Cette répartition variable de la GLS2 et de ses isoformes met alors en lumière l'étendue encore inconnue de ses fonctions et le mécanisme de régulation complexe auquel elle est soumise.

La GLS2 effectue la même réaction enzymatique que son homologue la GLS1. Cependant, sa régulation semble totalement opposée. En effet, elle possède en premier lieu des propriétés biochimiques différentes car elle n'est pas dépendante du taux de phosphate inorganique de la cellule. De plus, elle n'est pas retro-contrôlée, ou très peu, par le niveau de glutamate (Mates et al., 2011). Pour finir, au contraire de la GLS1, elle est surexprimée lorsque le taux de  $\text{NH}_3$  plasmatique est élevé (Patel & McGivan, 1984). Dans la continuité de cette opposition entre les 2 types de glutaminases, il existerait finalement un phénomène de transposition au niveau du foie entre la GLS1 et la GLS2. Ce processus modulerait la production de VLDL et influencerait l'homéostasie lipidique mais interviendrait aussi dans la fibrose hépatique et la cirrhose (Simon et al., 2020). De même, il a été montré, que la GLS2 interagissait avec la protéine p53 connue pour être un suppresseur de tumeur, tandis que la GLS1 a été reliée à l'activité de c-Myc, un pro-oncogène (Hu et al., 2010). GLS1 serait donc associée à la tumorigénèse, alors que GLS2 serait liée à la différenciation cellulaire et la production d'antioxydants (production de GSH notamment) (Martín-Rufián et al., 2012;

Suzuki et al., 2010). Malgré leur régulation opposée, les deux enzymes GLS1 et GLS2 ne sont pas exclusives et se retrouvent exprimées dans les mêmes tissus normaux et cancéreux mais possiblement à des topographies différentes (Aledo et al., 2000; Olalla et al., 2002; Pérez-Gómez et al., 2005; Turner & McGivan, 2003).

Pour finir, sur le plan nutritionnel et cardiovasculaire, l'activité de la GLS2 est augmentée chez les diabétiques, ou durant les périodes de jeûne et les régimes hyperprotéiques. A l'inverse, elle diminue avec les régimes pauvres en protéines (Chung-Bok et al., 1997).



**Figure 26 : Structure de la glutaminase 2 (GLS2)**  
*Adapté de Mates et al., 2011*

En synthèse, la répartition extrêmement variable des GLS et de la GS ainsi que leur régulation différente que ce soit au niveau cellulaire ou tissulaire témoigne du spectre étendu de leur fonction. Même si ce dernier a été en partie exploré, il faut encore approfondir les connaissances à ce sujet, notamment dans le domaine cardiovasculaire. Des outils permettant l'inhibition de l'activité de ces enzymes *in vivo* ont été développés afin de mieux de préciser leur rôle dans un organisme.

## D. Les outils du blocage d'une activité enzymatique

### 1. La place des virus adéno-associés dans la thérapie génique

#### i. Généralités

Les vecteurs viraux sont très utiles afin de réaliser des thérapies géniques. Ils permettent de délivrer du matériel génétique (ADN, ARN), sans réplication, à un organisme ou organe afin de modifier l'expression d'un ou plusieurs gènes en particulier et en observer l'effet.

De nombreuses thérapies géniques via vecteur viraux sont en cours de développement ou sont déjà développées pour certaines dans les domaines de la cancérologie et des maladies rares (Nathwani et al., 2011; Santiago-Ortiz & Schaffer, 2016; Simonelli et al., 2010). Différents types de vecteurs (virus adéno-associés [AAV], lentivirus, etc...) peuvent être utilisés en fonction de la taille du gène que l'on veut transfecter, mais aussi en fonction du type d'expérience menée (*in vitro* ou *in vivo*) ou encore de l'efficacité que l'on cherche à avoir (capacité de transduction du gène dans les cellules hôtes) (table 5). La sécurité, l'absence de réaction inflammatoire et la possible intégration génomique des vecteurs dans les cellules hôtes sont aussi des aspects déterminants dans ce choix (Table 6) (Gonçalves & Paiva, 2017; Robbins & Ghivizzani, 1998).

Modèle	AAV	Lentivirus	Rétrovirus	Adénovirus
Taille du virus	≈25 nm	≈100 nm	≈100 nm	≈100 nm
Génome	ADN simple brin	ARN simple brin	ARN simple brin	ADN double brin
Taille de l'insert	≈4,7-4,8 kb	≈8-10 kb	≈10 kb	≈7-36 kb
Tropisme viral	Cellules en division ou non	Cellules en division ou non	Cellules en division	Cellules en division ou non
Efficacité de transduction	modérée	modérée	modérée	forte
Limites	Petite taille de l'insert	Intégration génomique et mutations potentielles	Intégration génomique et mutations potentielles	Réponse inflammatoire induite
Immunogénicité	Faible	Moyenne	Moyenne	Forte
Stratégie expérimentale	In vivo	Ex vivo	Ex vivo	In vivo

**Table 6 : Tableau des caractéristiques des différents vecteurs viraux en thérapie génique**

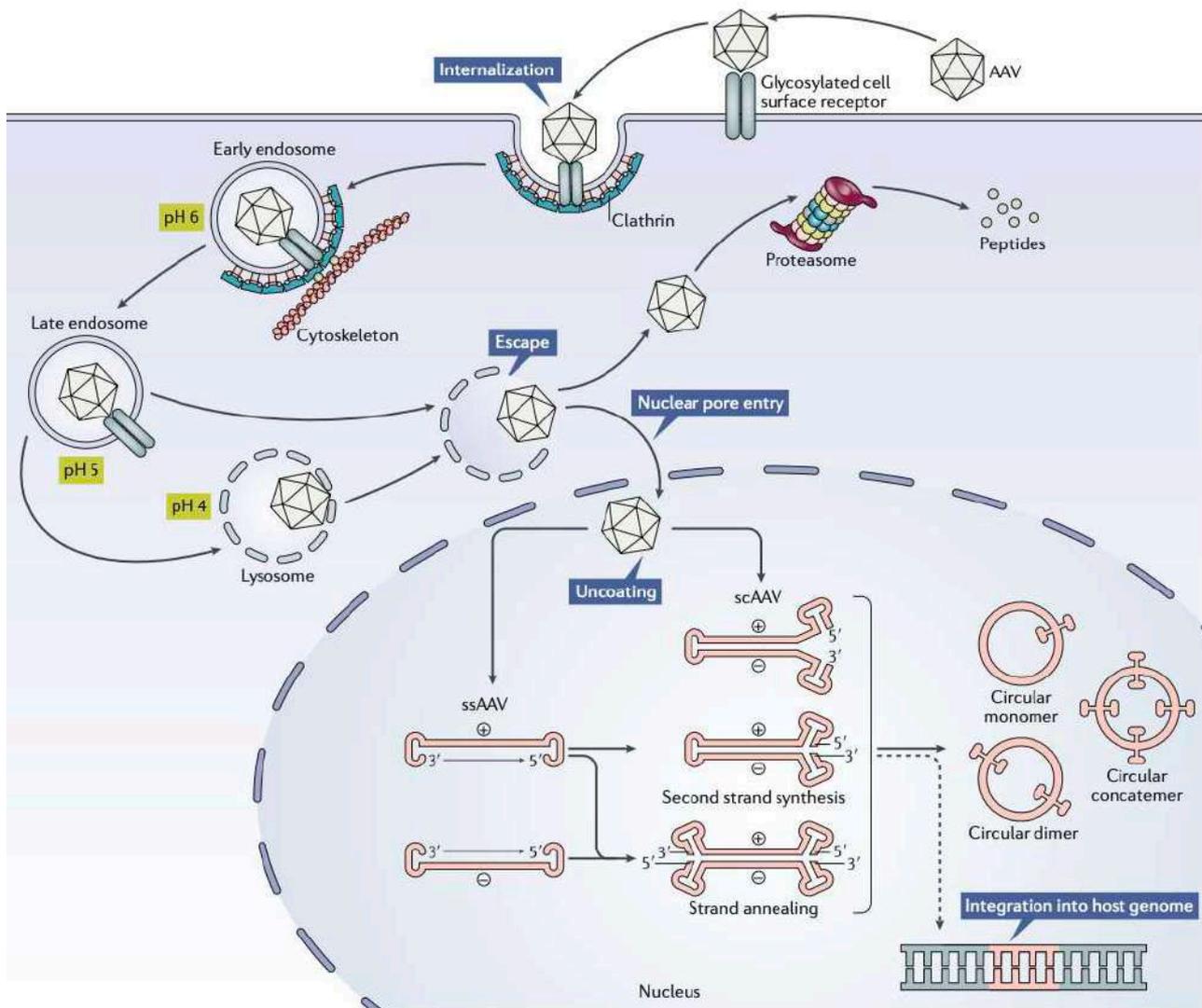
## ii. Définition, avantages et inconvénients

Initialement découverts en tant que contaminants de préparations adénovirales (Rose et al., 1966), les virus adéno-associés (AAV) sont des vecteurs viraux non enveloppés incapables de se répliquer sans virus helper (adénovirus ou herpes virus). Ils sont donc sans danger tant qu'il n'y a pas de co-infection. Ils infectent la cellule hôte afin d'y faire exprimer une séquence d'intérêt (transgène) qui ne s'intégrera généralement pas au génome, mais persistera sous la forme d'un épisode (ADN viral circulaire indépendant) au niveau du noyau. Ainsi, la probabilité de provoquer des mutations stochastiques est faible (Figure 27). Par ailleurs, en modifiant les protéines portées par la capsid du virus, on peut cibler son adressage à des organes spécifiques. Ainsi selon l'organe que l'on souhaite transfecter et le niveau d'expression du gène que l'on souhaite obtenir, le choix du promoteur peut être important (CMV, SV40, CAG, alpha1 anti trypsine, etc.) (McCarty et al., 2001; McCarty, 2008; Powell et al., 2015; D. Wang et al., 2019). Ces virus ne sont pas ou peu immunogènes, ce qui est un avantage car on enlève de possibles biais aux études (Hastie & Samulski, 2015; High & Roncarolo, 2019; Santiago-Ortiz & Schaffer, 2016). Leur capsid peut toutefois parfois arriver à déclencher des réponses immunitaires, mais cela reste minime comparé aux autres vecteurs tels que les adénovirus, les lentivirus ou encore les rétrovirus. En effet, les AAV ne contiennent pas de gènes viraux, et ne s'intègrent pas au génome. De plus, ils ne semblent pas avoir la capacité de transduire les cellules présentatrices d'antigènes (Mays et al., 2014).

L'insert génomique que peut porter le virus est relativement petit (4,7 kb) ce qui limite les gènes que l'on peut transfecter (D. Wang et al., 2019). Après migration du transgène dans le noyau de la cellule hôte, et avant la mise en forme de l'épisode, ce dernier doit être converti en ADN double brin. La machinerie cellulaire de l'hôte est employée afin de réaliser ce processus. Un moyen de contourner cet aspect limitant est l'emploi d'un transgène qui va se compléter lui-même pour former dès le départ un ADN double brin sans l'aide de polymérases : ce sont les virus adéno-associés auto-complémentaires (scAAV). Bien que l'expression du transgène soit plus rapide, la taille du gène que l'on y peut insérer est réduite (3,3 kb) (Figure 27).

Les méthodes de production des AAV sont diverses et sont effectuées à partir de lignées cellulaires stables ou d'autres virus (baculovirus). Ces techniques sont coûteuses et

chronophages, et il faut parfois passer par des étapes de purification afin d'avoir une quantité suffisante de virus fonctionnels (Naso et al., 2017; Samulski & Muzyczka, 2014; D. Wang et al., 2019)



***Figure 27 : Mécanisme d'infection des virus adéno-associés***

*Adapté de Wang et al., 2019*

Les AAV sont captés par des récepteurs de surface glycosylés de l'hôte. Ils sont ensuite endocytés dans des vésicules recouvertes de clathrines et guidées par le cytosquelette de la cellule. Lorsque le pH est suffisamment bas, le virus peut sortir et entrer dans le noyau. Les virus adéno-associés simple brin ont besoin de former un ADN double brin soit en utilisant une polymérase de l'hôte, soit en s'associant avec un brin complémentaire déjà présent au sein du noyau. Les virus auto-complémentaires ont déjà leur double brin d'ADN et peuvent directement être transcrits. L'ADN viral va rester sous forme d'épisome dans les cellules hôte ou rarement s'intégrer dans le génome. Il est possible que le virus ne rentre pas dans le noyau des cellules et soit pris en charge par le protéasome au niveau du cytosol.

### iii. Sérotypes

Le sérotype est l’empreinte caractéristique du virus basé sur ses antigènes de surface ou ses protéines virales. Plusieurs sérotypes d’AAV existent et chacun se lie plus ou moins spécifiquement à un type cellulaire donné. L’AAV8 qui sera utilisé dans notre article par exemple va se lier plus spécifiquement aux cellules hépatiques, à celles du cœur, du pancréas et des muscles squelettiques (Table 7) (Naso et al., 2017).

Tissu	Sérotype Optimal
Foie	AAV8 ; AAV9
Muscles striés	AAV1 ; AAV6 ; AAV7 ; AAV8 ; AAV9
System nerveux central	AAV1 ; AAV4 ; AAV5
Épithélium pigmentaire de la rétine	AAV4, AAV5
Cellules photoréceptrices de la rétine	AAV5
Poumons	AAV9
Cœur	AAV8
Pancréas	AAV8
Rein	AAV2

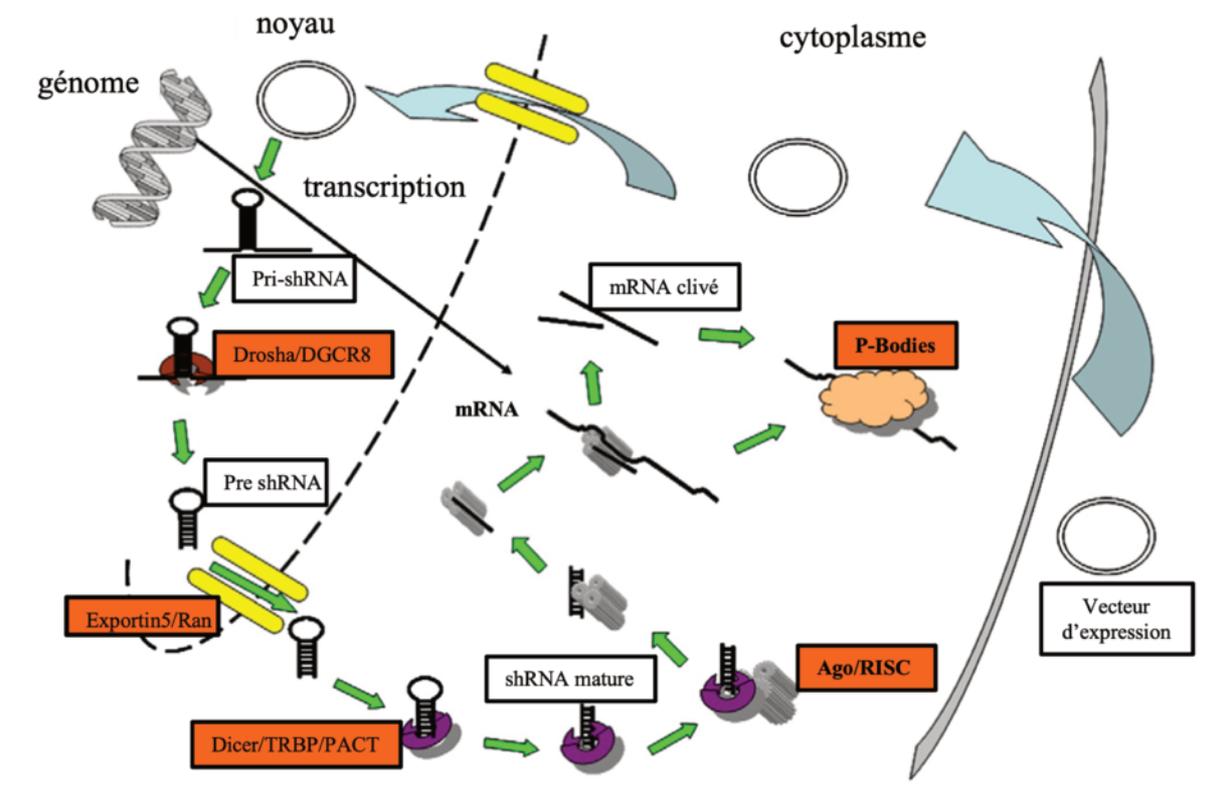
***Table 7 : Tropisme préférentiel des virus adéno-associés en fonction du sérotype***  
*D’après Wu et al., 2006*

D’autres moyens ont par ailleurs été développés pour augmenter la sélectivité des AAV pour certains types cellulaires, e.g. clone de nouveaux variants humains et primates, recombinaison de capsides entre elles, insertions de séquences spécifiques plus larges, etc. (Limberis et al., 2009; Ried et al., 2002; Warrington et al., 2004).

## 2. Les ARNs interférents

Les ARNs interférents sont de petites séquences génomiques qui permettent d’empêcher l’expression de séquences spécifiques en détruisant un ARN messager cible. Parmi ces ARN interférents, les ARN en épingle à cheveux (shRNA) sont utilisés avec les vecteurs viraux afin de pouvoir générer des baisses d’expression stables et spécifiques de gènes dans la plupart des types cellulaires (figure 28). Ils sont transcrits dans le noyau par la polymérase II ou III et

forment un pré-shRNA grâce au complexe Drosha/DGCR8. Ils sont ensuite exportés dans le cytosol et clivés par l'enzyme endogène DICER pour donner un shRNA mature. Enfin, ils s'associent avec le complexe Ago/RISC afin de cibler un ARN messager spécifique. Ce dernier va soit être clivé avant qu'il ne puisse être traduit en protéines, soit se retrouver séquestré et non traduisible en protéine à l'intérieur de granules appelés corps-P (Rao et al., 2009).

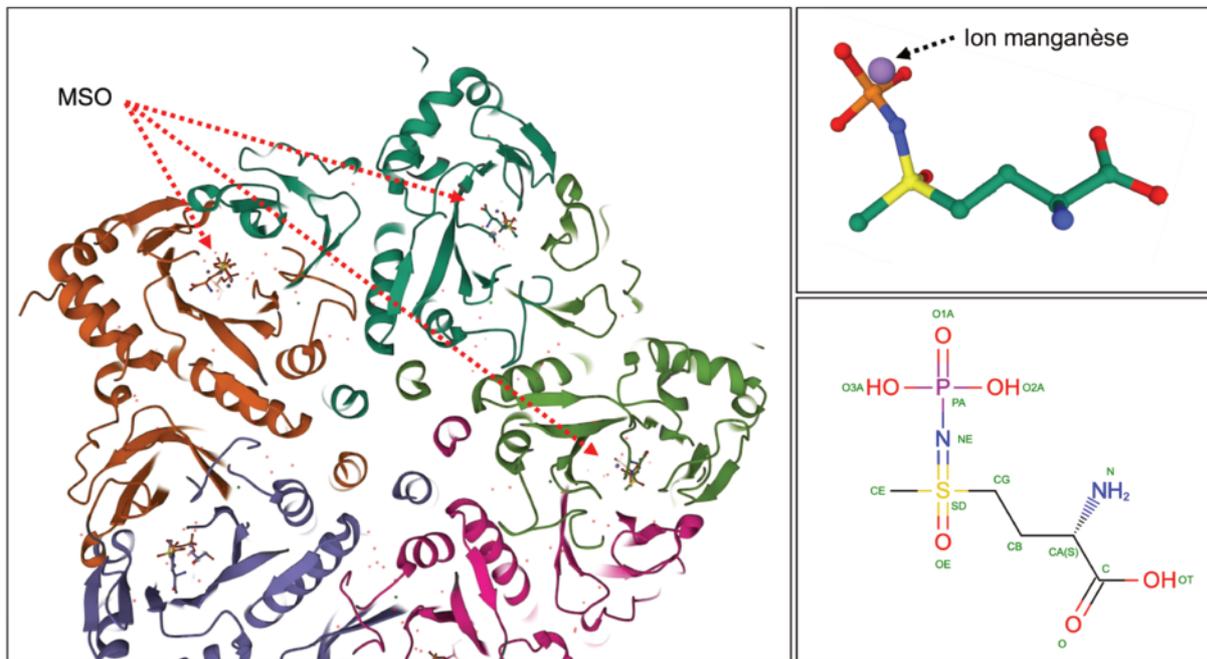


***Figure 28: Mécanisme d'action des ARN en épingle à cheveux (shRNA)***  
*Adapté de Rao et al., 2009*

Le promoteur U6, promoteur de la RNase polymérase III, est couramment utilisé pour l'expression des ARN interférents de type ARN en épingle à cheveux à l'intérieur des vecteurs viraux (Nie et al., 2010). En effet, la polymérase III permet leur synthèse plus facilement que les autres type de polymérases (Mäkinen et al., 2006).

### 3. La méthionine sulfoximine

La méthionine sulfoximine (MSO) est un inhibiteur irréversible de la glutamine synthétase. C'est un inhibiteur compétitif du glutamate qui va lier son site, en présence d'ATP et d'ion magnésium ou manganèse, pour être converti en méthionine sulfoximine phosphate (Figure 29) (Richman et al., 1973). Découvert en tant que convulsivant, il augmente les taux de glutamate cérébraux, qui est un puissant neuro-excitateur du système nerveux central (Bentley et al., 1950; Peters & Tower, 1959; Proler & Kellaway, 1962).



***Figure 29 : Mode d'action de la méthionine sulfoximine***

*D'après Bank & Karlberg, T. et al., 2007*

*Source : données obtenues de <https://www.rcsb.org>*

Structure cristalline 2QC8 de la GS complexée au MSO (à gauche). Structures 2D et 3D de la molécule de MSO (à droite).

Le développement de ces outils permettant le blocage de différentes enzymes est une base essentielle de l'exploration de nouvelles voies métaboliques impliquées dans le développement de l'athérosclérose.

## **E. La glutamine dans le cadre de l'athérosclérose**

Avec l'avènement de nouvelles techniques génomiques (séquençage de l'ARN, étude d'association pangénomique, etc.) quelques études commencent à mettre en lumière le rôle que pourraient avoir certains acides aminés dans le développement de syndromes métaboliques, et donc dans la survenue des maladies cardiovasculaires, suggérant la découverte de nouvelles cibles potentielles de traitement.

### **1. La glutamine : un acide aminé impliqué dans l'amélioration des paramètres cardiovasculaires ?**

Habituellement donnée en supplémentation afin d'améliorer la récupération et restaurer plus rapidement les fonctions immunitaires, la glutamine serait aussi impliquée dans l'amélioration de certains facteurs de risque (Cruzat et al., 2018; Gleeson, 2008). En effet, parmi la multitude d'acides aminés potentiellement reliés aux maladies cardiovasculaires (cystéine, homocystéine, leucine, valine et autres acides aminés à chaîne latérale ramifiée) de plus en plus d'études mettent en lumière le rôle bénéfique de la glutamine.

De manière plus concrète, plusieurs articles relatent le lien entre la supplémentation en glutamine chez les sportifs et/ou diabétiques, et l'amélioration de certains paramètres tels que le tour de taille, la tension systolique, la glycémie à jeun, la baisse de l'inflammation, la production de glutathion, la production d'oxyde nitrique ou encore l'endurance physique (Addabbo et al., 2013; J. Chen et al., 2020; Durante, 2019; Mansour et al., 2015; Opara et al., 1996; Sellmann et al., 2017).

De plus, pour étayer cette thèse, d'autres corrélations sont faites directement entre le taux de glutamine et/ou glutamate et la survenue d'évènements cardiovasculaires chez l'humain (Ma et al., 2018; Vaarhorst et al., 2014). Par ailleurs, chez la souris, le ratio glutamine sur glutamate serait lié à l'amélioration de paramètres métaboliques comme la tolérance au glucose ou la baisse de la pression artérielle (Cheng et al., 2012).

Des mécanismes plus précis à l'origine de ces améliorations ont été alors investigués afin d'expliquer ces corrélations.

Chez la souris LDLR<sup>-/-</sup>, l'inhibition totale de la P-sélectine change le métabolisme de la glutamine tout en empêchant la progression de l'athérosclérose (Li et al., 2018).

De même, toujours chez la souris, la glutamine jouerait aussi un rôle dans la polarisation M2 des macrophages (Merlin et al., 2021), macrophages dits « anti inflammatoires », à travers la voie de la N-glycosylation, et serait impliquée dans la stabilisation des plaques d'athérome. Sa déplétion entraîne au contraire une augmentation des marqueurs macrophagiques pro-inflammatoires (Jha et al., 2015; O'Neill & Pearce, 2016). Par ailleurs, le NO en quantité excessive peut lui aussi causer un stress oxydant et conduire à un développement plus rapide des lésions athéromateuses. La glutamine permet de le réduire, d'agir sur le développement des plaques, et, via la production de glutathion, d'empêcher les effets délétères des ROS induits par les facteurs de risque cardiovasculaire. La glutamine pourrait de plus moduler la sécrétion d'hormones impliquées dans l'homéostasie glucidique (GLP-1, insuline, etc.) (Zheng et al., 2016). Enfin, elle serait impliquée dans la néo-angiogenèse et permettrait une reperfusion des régions ischémiques post infarctus ainsi qu'une meilleure récupération des fonctions cardiaques (Chen et al., 2020; Ma et al., 2018).

## **2. La glutamine : un acide aminé impliqué dans la survenue des évènements cardiovasculaires ?**

Le rôle bénéfique de la glutamine reste encore à préciser car certaines études pointent au contraire l'effet délétère de cet acide aminé sur le développement de l'athérosclérose, comme l'étude de Wurtz en 2012 ou encore celle de Paynter en 2018 qui indiquent que le taux de glutamine serait aussi corrélé dans certaines conditions à la survenue des ischémies coronariennes (Paynter et al., 2018; Würtz et al., 2012). De même, chez des patients avec défaillance multi organique, la glutamine en supplémentation augmenterait le taux de mortalité (Durante, 2019; Heyland et al., 2013). Le glutamate serait quant à lui plus élevé dans le sérum des patients souffrant d'obésité (Newgard et al., 2009).

Pour expliquer ces phénomènes, des études visant à explorer une partie plus mécanistique ont été menées. Ainsi, la glutamine pourrait être impliquée dans la formation accélérée des cellules spumeuses *in vitro* et l'accumulation de triglycérides et de cholestérol chez des souris ApoE<sup>-/-</sup> (Rom et al., 2017; Grajeda-Iglesias & Aviram, 2018). Dans l'hypertension pulmonaire, la glutaminolyse médiée par GLS1 entrainerait une consommation de la glutamine intracellulaire et une production de collagène qui agirait sur la rigidité de la matrice extracellulaire (Bertero et al., 2016).

Même si le rôle de la glutamine est beaucoup mieux documenté du point de vue oncologique, les récentes études sur ses effets cardiovasculaires mériteraient tout de même d'être éclairées.

### **3. Les glutaminases et la glutamine synthétase : de nouvelles cibles thérapeutiques ?**

La modulation des taux de glutamine et/ou de glutamate au sein de l'organisme serait un élément important à prendre en compte dans les maladies cardiovasculaires et dans l'athérosclérose (Ma et al., 2018; Zheng et al., 2016; Shah et al., 2010). Ainsi, les glutaminases et la glutamine synthétase qui sont les acteurs principaux de cette modulation pourraient être des protéines clés à cibler (Suhre et al., 2011). Récemment, plusieurs études se sont donc intéressées à ces enzymes.

Basée sur une étude d'association pangénomique (GWAS), l'étude de Kettunen et al. en 2012 révèle que des variations génétiques de la GLS2 seraient corrélées aux taux de glutamine plasmatique chez l'humain (Kettunen et al., 2012). Or comme vu plus haut, celui-ci pourrait avoir de multiples liens avec les maladies cardiovasculaires ou encore l'apparition d'une monocytose (Ganda et al., 2013). Par ailleurs, la glutaminase serait plus active chez les patients souffrant d'obésité, conduisant à un tissu adipeux plus inflammatoire avec des macrophages M1 et un taux de glutamate plus élevé dans leur tissu adipeux (Ren et al., 2019).

Dans le cadre d'études à visée plus mécanistique, le blocage total de la GLS1 dans les macrophages a entraîné une baisse de l'efférocytose qui a contribué à jouer sur la taille des plaques d'athérome (Merlin et al., 2021). De même, l'inhibition partielle, cette fois, de la GLS2 chez la souris a joué sur le taux de glutamine et de glutamate plasmatique et a réduit le taux d'ammoniac ainsi que la glycémie plasmatique à jeun (Mao et al., 2022; Miller et al., 2018).

La GS quant à elle, intervient non seulement dans la production de glutamine endogène en participant à la modulation du taux de glutamine plasmatique et tissulaire mais est aussi impliquée dans le développement de l'angiogénèse en modifiant la voie intracellulaire RHOJ. Elle serait donc importante dans le développement de l'athérome (Dubois et al., 2019).

En synthèse, un lien est donc possible entre ces enzymes et l'apparition de maladies cardiovasculaires, et il conviendrait de l'explorer de manière plus détaillée avec les outils de blocage mis à notre disposition.

# Objectifs de mes travaux de thèse

Comme vu précédemment, la prévalence des maladies cardiovasculaires a quasiment doublé ces dernières années. Les thérapies existantes mises sur le marché afin de lutter contre l'apparition d'un syndrome métabolique et le développement de l'athérosclérose sont nombreuses mais encore insuffisantes sur le long terme.

Bien que de nouveaux essais et de nouvelles cibles soit proposés et testés (essais CANTOS, PREDIMED, CIRT, LoDoCo, etc.), ils visent principalement à améliorer le profil lipidique des patients ou à moduler l'inflammation chronique. Or, comme nous l'avons vu plus haut, de nombreux autres facteurs vont contribuer à l'apparition des lésions. De plus les effets indésirables de ces médicaments, seuls ou en combinaison, ne sont pas anodins et peuvent détériorer la qualité de vie des patients. Il devient alors nécessaire d'explorer de nouveaux mécanismes physiopathologiques impliqués dans la survenue des maladies cardiovasculaires. Nos expériences ont été menées en ce sens et prouvent l'importance de la régulation des flux d'acides aminés dans le développement des plaques d'athérome.

Récemment, quelques études ont commencé à mettre en lumière le rôle que pourraient jouer certains acides aminés non seulement dans le cadre physiologique, mais aussi physiopathologique, notamment dans le domaine cardiovasculaire. Parmi eux, la glutamine, et, plus largement, les enzymes et les voies qui y sont impliquées, ressortent de plusieurs études comme étant des éléments importants à prendre en compte.

Mes travaux de thèses se sont concentrés à analyser plus en détail l'implication du métabolisme de la glutamine dans le développement des plaques d'athérosclérose. Nous avons exploré le rôle de deux enzymes clés : la GLS2 et la GS. L'athérosclérose étant une maladie multifactorielle, et mettant en communication plusieurs organes, il est nécessaire de l'étudier *in vivo* afin d'avoir les résultats les plus probants. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs modèles de souris génétiquement modifiées soumis à un régime riche en graisse et nous avons modulé l'activité des enzymes d'intérêt afin d'évaluer leur impact sur le développement des plaques. Notre étude fait partie des premières à confirmer dans un modèle animal l'importance du métabolisme de la glutamine et de l'activité de ses enzymes dans le cadre de l'athérosclérose.

# Papier

## **Hepatic glutaminase activity distally rewires arterial wall remodeling to prevent atherosclerosis**

**Florent Murcy<sup>1</sup>, Nathalie Vaillant<sup>1</sup>, Samuel Gourion-Arsiquaud<sup>2</sup>, Laurent Duca<sup>3</sup>, Sébastien Dussaud<sup>4</sup>, Johanna Merlin<sup>1</sup>, Coraline Borowczyk<sup>1</sup>, Thibault Barouillet<sup>1</sup>, Fairouz Zaïr<sup>1</sup>, Alexia Castiglione<sup>1</sup>, Francois Laffont<sup>1</sup>, Béatrice Bailly-Maitre<sup>1</sup>, Emmanuel L. Gautier<sup>4</sup>, Alan R Tall<sup>5</sup>, Steven Shea<sup>5,6</sup>, and Laurent Yvan-Charvet<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U1065, Université Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Centre national de la recherche scientifique (CNRS) (R.G.), Atip-Avenir, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Oncoage, 06204 Nice, France (F.M., N.V., J.M., C.B., T.B., A.C., F.L., B.B.M., L.Y.C.)

<sup>2</sup>TRI/Princeton, Princeton, NJ 08542, USA (S.G.A.)

<sup>3</sup>UMR CNRS 7369 MEDyC, Reims, France (L.D)

<sup>4</sup>Sorbonne Université, INSERM, UMR\_S 1166 ICAN, F-75013 Paris, France (S.D., E.L.G).

<sup>5</sup>Department of Medicine, Vagelos College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York (A.R.T., S.S.).

<sup>6</sup>Department of Epidemiology, Mailman School of Public Health, Columbia University, New York (S.S.)

Address correspondence to LYC: [yvancharvet@unice.fr](mailto:yvancharvet@unice.fr)

**Key words:** Glutaminolysis, Liver Glutaminase 2, Inflammation, tissue remodeling and Atherosclerosis

**Introduction**

## Summary

Cardiovascular diseases and associated metabolic complications are linked to meta-inflammation of the arterial wall. Emerging evidence indicates that glutamine homeostasis mitigates numerous risk factors for cardiovascular disease, but the causal role and underlying mechanisms remain incompletely understood. Here we show in the human MESA cohort that the plasma glutamine-to-glutamate ratio is an independent risk factor for carotid plaque progression. Contrary to the prevailing belief that glutamine synthesis does not supply the needs required by the organism in catabolic situations, we rather find that hepatic glutaminolysis governs glutamine homeostasis in non-catabolic atherogenic settings or after glutamine supplementation and this controls atherosclerosis plaque growth at distance. High-throughput transcriptional profiling and high-resolution spectroscopy and imaging reveal that aortas from mice with deficiency of glutaminase 2 (GLS2), the enzyme that mediates hepatic glutaminolysis, show perturbed extracellular matrix, muscle contraction and elasticity. This relies on an imbalance of cross-linked proteins between glutamine- and glutamate-utilizing extracellular matrix modulating enzymes within atherosclerotic lesions. Thus, hepatic glutaminolysis functions as a potent regulator of glutamine homeostasis, which rewires the pathophysiological dimension of a distal tissue such as the remodeling of arterial wall of aortas during atherosclerotic plaque progression.

## Introduction

Glutamine is the most abundant amino acid in the plasma and an important energy source through glutaminolysis, especially during metabolic stress (DeBerardinis and Cheng, 2010)(O'Neill and Pearce, 2016). Using unbiased metabolic profiling in the Duke CATHGEN biorepository, a modulation of the plasma glutamine-to-glutamate ratio (GGR) was shown to discriminate cardiovascular disease (CVD) patients (Shah et al., 2010). In prospective studies, well-defined and independent cohorts showed that the plasma GGR ratio was inversely related to risk of composite CVD and stroke (i.e, increased plasma glutamate levels associated with increased CVD events) (Zheng et al., 2016) or the risk of CVD mortality (i.e, increased plasma glutamine levels upon dietary intake associated with reduced mortality) (Ma et al., 2018). Investigating possible pathways underlying CVD disease in the Framingham Heart Study and the Malmo Diet and Cancer Study, Cheng et al., reported that the plasma GGR ratio was also inversely associated with cardiometabolic traits including body mass index, insulin-resistance and circulating triglycerides (Cheng et al., 2012). In the Malmo Diet and Cancer Study, we also observed an inverse relationship between the plasma GGR ratio and monocytes counts (Ganda et al., 2013). However, the origin of these correlations and the underlying mechanisms remain ill-defined and there is a clinical unmet need to tackle this question.

Although glutamine is ingested from dietary sources, almost 90% of the daily glutamine production originates from endogenous source relying on glutamine synthetase (GS) for de novo synthesis. Quantitatively, the main tissue for glutamine synthesis, storage and release is the skeletal muscle. In contrast, the liver has a dual role in glutamine metabolism through its capacity to produce glutamine from amino acid catabolism at steady state or consume it in catabolic situations such as fasting, insulin-resistance or trauma to fuel neoglucogenesis and maintain redox status (DeBerardinis and Cheng, 2010)(O'Neill and Pearce, 2016). Glutamine is hydrolyzed into glutamate by the glutaminase-2 (GLS2) isoform in the liver in a metabolic process called glutaminolysis. Under non catabolic conditions, this pathway is upregulated in response to oxidative stress to support energy production and prevent toxicity (Suzuki et al., 2010). In contrast, using glucagon as the main catabolic hormone of the body, Miller et al., revealed that *Glis2*-deficient mice had lower glutamine-to-glucose flux ameliorating hyperglycemia (Miller et al., 2018). This suggests a possible therapeutic avenue to treat hyperglycemia-induced atherosclerosis development (Yvan-Charvet and Cariou, 2018)(Eckel et al., 2021). However, reducing GLS2 expression may also lead to a switch to GLS1 isoform and the development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hyperlipidemia (Simon et al., 2020), which will be detrimental for atherosclerosis (Rader, 2016)(Tall et al., 2022). Yet, whether and how muscle glutamine synthesis or hepatic glutaminolysis impacts the development of atherosclerosis remains unknown.

Here we tested the hypothesis that muscle glutamine synthesis or hepatic glutaminolysis plays a critical role in maintaining whole body glutamine homeostasis that could be intimately linked with the control of atherosclerosis plaque growth. Our study using samples from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) cohort confirmed an inverse correlation between the plasma GGR and incident CVD and unraveled that in contrast to incident CVD, this GGR was an independent risk factor for carotid plaque progression. In preclinical models, we found that under non catabolic atherogenic conditions, hepatic GLS2 but not muscle GS was the culprit of glutamine homeostasis at steady state or after glutamine supplementation and prevented the development of atherosclerosis. Mechanistically, we excluded a direct link between hepatic glutaminolysis and modulation of classical CVD risk factors and rather found that perturbed plasma GGR could impact at distance the balance between glutamine- and glutamate-dependent cross-linking processes of extracellular matrix (ECM) proteins.

## Results

### **Enhanced plasma glutamine to glutamate ratio (GGR) predicts plaque progression.**

After exclusion of matched cases and controls with missing values for laboratory data or other key covariates from the MESA cohort, 988 subjects including 499 cases were available for analysis for incident CVD and 862 subjects including 431 cases for progression of carotid artery plaque (**Table 1**). Cases and controls did not differ with respect to age and sex because they were matched on these criteria but had higher prevalence of cardiovascular risk factors as expected (**Table S1**) and previously described (Shea et al., 2019). In conditional logistic regression models examining the association of the plasma GGR with incident CVD, lower level of GGR (i.e, increased plasma glutamate levels), was associated with higher odds of incident CVD, with little difference in magnitude of the effect size with adjustment for covariates but reduced *p* value with odds ratio of 0.95 per SD of GGR (95% CI, 0.90–1.00; *p*=0.052) in the fully adjusted model (**Table 1, top**). In subgroup analysis, associations appeared conserved with stroke events but not with incident coronary heart disease (CHD) (**Table S2**). In contrast, a higher level of GGR (i.e, reduced plasma glutamate levels > reduced plasma glutamine levels) was associated with greater odds of carotid artery plaque progression with an odds ratio of 1.09 per SD of GGR (95% CI, 1.03–1.16; *p*=0.002) in the fully adjusted model (**Table 1, bottom**). This association also persisted after adjustment with plasma CRP and IL-6 levels (data not shown). These findings likely reflect that perturbed systemic glutaminase and/or glutamine synthetase activity is an independent risk factor for plaque progression.

### **Glutamine synthetase (GS) does not orchestrate atherosclerosis development in mice.**

Up to 90% of the daily glutamine production originates from endogenous source relying on GS for *de novo* synthesis in skeletal muscle (DeBerardinis and Cheng, 2010)(O'Neill and Pearce, 2016). Treatment of atherogenic diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice with daily intraperitoneal injection of 20mg/kg BW of methionine sulfoximine (MSO), an inhibitor of glutamine synthetase, for 12 weeks (**Fig. S1A**) did not reduce hepatic or muscle GS protein expression or tissue glutamate levels but did reduce glutamine reserve in gastrocnemius skeletal muscle (**Fig. S1A and S1B**). Thus, MSO treatment achieved a significant decrease in the muscle GGR (**Fig. 1A**). This occurred without affecting liver or kidney toxicity since similar liver morphology, triglyceride (TG) levels, plasma aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT) or urea levels were observed, respectively (**Fig. S1C**). Consequently, the plasma GGR was reduced in MSO-treated animals (**Fig. 1B**) due to a raise in plasma glutamate levels (**Fig. S1D**), most likely because the glutamine synthesis in the skeletal muscle takes place in large part through glutamate uptake from the bloodstream (DeBerardinis and Cheng, 2010)(O'Neill and Pearce, 2016). Metabolically, MSO-treated mice developed a mild dyslipidemia (i.e, increased plasma cholesterol and TG levels) (**Fig. S1E**) independently of glucose intolerance (**Fig. S1F**). However, similar atherosclerosis plaque area in the aortic sinus (**Fig. 1C**) and oil red O staining in descending aortas (**Fig. 1D**) were observed between saline or MSO-treated *Apoe*<sup>-/-</sup> mice. Plaque composition was also similar (**Fig. S1G**). Thus, glutamine synthetase activity is unlikely a culprit of atherosclerosis development.

### **Hepatic glutaminase (GLS2) deficiency accelerates atherosclerosis development in mice.**

High glutamine concentration is found in the liver to support many hepatic activities (DeBerardinis and Cheng, 2010)(O'Neill and Pearce, 2016) and its hydrolysis is supported by the *Gls2* isoform that has been one of the unique gene associated with plasma glutamine levels in genome-wide association studies (GWAS) (Suhre et al., 2011)(Kettunen et al., 2012)(Shin et al., 2014). Targeting hepatic glutaminase was performed by infection of *Apoe*<sup>-/-</sup> mice by scAAV8 virus that expressed an shRNA targeting the *Gls2* gene (AAV-*Gls2*<sup>shRNA</sup>) before feeding the mice an atherogenic diet for 12 weeks (**Fig. S1H**). Knockdown efficiency was confirmed in the liver of mice infected with the AAV-*Gls2*<sup>shRNA</sup> compared to AAV-empty controls and specificity was validated by the absence of GLS2 knockdown in skeletal muscle (**Fig. S1H**).

Loss of GLS2 zonation pattern in the hepatic periportal vein was also visualized by immunohistochemistry (**Fig. S1H**) and led to a specific decrease in hepatic glutamate content compared to controls (**Fig. S1I**). Thus, an increase in the liver but not muscle GGR was observed in mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> (**Fig. 1E**), reflecting impaired hepatic glutaminolysis. Increased plasma levels of glutamine and GGR in mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> (**Fig. 1F and S1J**) indicates that glutaminolysis in the liver arises from absorption of glutamine from the bloodstream. There was an approximately 1.7-fold increase in atherosclerosis plaque area in the aortic sinus compared to co-housed control littermates (**Fig. 1G**). Oil red O staining in the aortic arch and descending aortas confirmed higher plaque burden in mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> (**Fig. 1H**). An unexpected finding was also the presence of occlusive coronary artery atherosclerosis in these animals (8 out of 10) as shown in representative images in **Fig. S1K**. In line with human data, a positive correlation between GGR and atherosclerosis lesion size was observed in mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> (**Fig. 1L**). To fully invalidate hepatic GLS2 genetically in a model of atherosclerosis, germline *Gls2* knockout mice were next crossed onto an atherosclerotic *Ldlr*-deficient background (**Fig. S1M**). The absence of GLS2 protein in the liver was confirmed by western blot (**Fig. S1L**) and by the increase in tissue glutamine levels and GGR in atherogenic diet-fed *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice compared to controls (**Fig. 1I and S1N**). We also confirmed in this model that the impaired glutaminolysis led to an increase in plasma glutamine levels and GGR (**Fig. 1J and S1O**). Quantification of lesion burden by cross-sectional analysis of the aortic root established that an increase in lesion area in *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice was consistently present throughout the 400  $\mu$ m of the aortic root with an approximately 1.4-fold increase in atherosclerosis plaque area in the aortic sinus (**Fig. 1K**). Again, a positive correlation between GGR and atherosclerosis lesion size was observed in these mice (**Fig. S1P**). Together, these data indicate that GLS2-dependent hepatic glutaminolysis can control atherosclerosis plaque growth at distance.

**GLS2-mediated sensing of exogenous glutamine source supports atherosclerosis prevention during nutritional intervention.** To test the hypothesis that hepatic glutaminolysis impacts atherosclerosis development by modulating plasma GGR, we supplemented glutamine in a clinical scenario of lifestyle changes assessed by the adoption of a healthier diet. Regression in *Apoe*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice with established but uncomplicated lesions (i.e., atherogenic diet feeding for 6 weeks) was initiated by switching the animals to a chow diet. Mice were divided to 3 groups: 1) progression group, in which mice were continued on atherogenic diet for an additional 2 weeks; 2) chow regression group, in which mice were switched to chow for 2 weeks and 3) glutamine supplementation group, in which mice were switched to a chow diet and orally supplemented with glutamine for 2 weeks. All mice on chow diet had similarly reduced plasma cholesterol levels with no difference with the glutamine supplemented group (**Fig. S1R**). As expected, glutamine supplementation raised plasma glutamine levels in all mice (**Fig. S1S**). However, the consecutive raise in plasma GGR was only observed in *Apoe*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 1L**) because *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were unable to efficiently hydrolyze glutamine into glutamate (**Fig. S1S**). These findings confirm that hepatic GLS2-dependent glutaminolysis is central to the maintenance of glutamine homeostasis. As previously suggested (Breslow, 1996)(Nagareddy et al., 2013), switching the *Apoe*<sup>-/-</sup> mice to a chow diet promoted a slight reduction in atherosclerosis development even if it did not reach significance (**Fig. 1M**), most likely because plasma cholesterol levels remain quite high (**Fig. S1R**). Nevertheless, glutamine supplementation in this scenario had a detrimental impact on atherosclerosis in absence of GLS2 (**Fig. 1M**), revealing that impaired hepatic glutamine hydrolysis from endogenous or exogenous sources is the culprit of the control of atherosclerosis plaque growth at distance.

**Hepatic GLS2 deficiency promotes hyperlipidemia-independent atherosclerosis.** We next carried out studies to elucidate potential mechanisms responsible for the effect of hepatic GLS2 deficiency on atherosclerosis plaque growth at distance. We first reasoned that glutaminolysis could support the tricarboxylic acid cycle (TCA) and urea cycle to 1) control

lipid synthesis and lipidemia and 2) support detoxification and prevent hepatotoxicity, which is defined as a rise in AST (formerly known as glutamate-oxaloacetate transaminase GOT) or ALT (formerly known as glutamate-pyruvate transaminase GPT) (Fig. 2A). First, the lack of GLS2 resulted in similar plasma cholesterol levels in both models of *ApoE*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> or *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice compared to respective controls (Fig. 2B). We did observe a moderate hypertriglyceridemia that was only visible in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> but not in *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 2C). Thus, we first examined whether this mild hypertriglyceridemia could depend on the role of glutamine on hepatic glucose homeostasis (Miller et al., 2018). Injection *i.p.* of a glucose bolus revealed similar glucose clearance in hyperlipidemic *ApoE*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> compared to controls (Fig. 2D). Metabolic characteristics of these animals by indirect calorimetry confirmed similar glucose oxidation as reflected by analysis of the respiratory quotient (RQ) (Fig. S2A). Comparable fasting plasma insulin levels (Fig. S2B) or adipose cellularity (Fig. S2C) in these animals were also indicative of similar insulin sensitivity. Performing an RNA sequencing (RNA-seq) analysis of the liver of atherogenic-diet fed *Gls2*-deficient animals on both atherogenic background showed similar transcriptional regulation of enzymes involved in glycolysis (Fig. S2D) or in TG synthesis (Fig. 2E). Thus, glutaminolysis does not modulate glucose-dependent TG synthesis as originally hypothesized. Accordingly, similar liver TG content was observed in mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> or genetically invalidated for *Gls2* (Fig. 2F) and microscopic examination of the liver of these mice confirmed no major difference in steatosis (Fig. 2G). We also excluded a role of GLS2 deficiency on hepatic detoxification or hepatotoxicity as similar plasma urea and ALT levels were observed in all mice (Fig. S2E and S2F). To elucidate the reason of the lack of major liver phenotype in absence of hepatic glutaminolysis, metabolic pathway enrichment analysis was performed in the liver of *Gls2*-deficient animals. This analysis highlighted some up-regulation of amino acid metabolism KEGG pathways (Fig. S2G) and topological analyses using CoMBI-T profiling (Jha et al., 2015) indicated more specifically the catabolism of several amino acids to replenish hepatic glutamate levels (Fig. 2H). This approach helped pinpoint how the liver compensate for the lack of hepatic glutaminolysis. Thus, we next asked whether the mild hypertriglyceridemia observed in mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> could arise from postprandial lipemia, which is recognized as an independent CVD risk factor (Yvan-Charvet and Cariou, 2018). However, there was no significant change in plasma TG levels following an oral olive oil gavage in these animals (Fig. 2I). Among genes involved in TG-rich very low-density lipoprotein (VLDL) production and hydrolysis (Fig. S2H), we found a decreased expression of lipoprotein lipase (LPL) only in the liver of *Gls2*-deficient animals on an atherogenic *ApoE*<sup>-/-</sup> background (Fig. 2J). This was associated with reduced plasma LPL activity in these animals (data not shown). Because of the double-edged sword of LPL on atherosclerosis depending on its peripheral or local tissue expression (Goldberg et al., 2021), we used E06 antibody as a readout of lipid oxidation in atherosclerotic lesions (Chang et al., 1999). No significant changes were observed in atherosclerotic lesions of mice with hepatic GLS2 knockdown when normalized to plaque area (Fig. 2K). Similar apolipoprotein B (apoB) levels, the main protein of VLDL, were also found in the plaques of these animals (data not shown). Thus, reduced TG hydrolysis in absence of GLS2 was specific of the *ApoE*<sup>-/-</sup> background and was unlikely causal to the accelerated atherosclerosis development in mice with hepatic glutaminolysis deficiency.

**Enhanced monocyte infiltration in atherosclerotic lesions of *Gls2*-deficient mice is not associated with a hepatic energy-sensing or a leukocyte-intrinsic role.** Recent evidence suggests that liver energy sensors dictate the blood and tissue immune tone to inflammatory disease outcome (Jordan et al., 2019). Thus, we wondered whether such a mechanism could be modulated by hepatic glutaminolysis and contribute to provide the inflamed atherosclerotic lesions with monocytes (Fig. 3A). Blood leukocyte quantification indicated monocytosis but normal neutrophil, T and B cell counts in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> (Fig. 3B and S3A). In contrast, monocyte counts were similar in atherogenic-diet fed *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3C). We next analyzed monocyte recruitment into atherosclerotic

plaques using fluorescent-labeled latex beads, as previously described (Tacke et al., 2007). An approximately 1.6-fold increase in the number of latex<sup>+</sup> monocytes was observed 2 days after monocyte labeling in atherosclerotic lesions of *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> compared to controls (Fig. 3D). This increased recruitment was confirmed by analysis of latex<sup>+</sup> monocytes in the aortic arch by flow cytometry (Fig. S3B). Characterization of atherosclerotic lesions in *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice also revealed more complex plaques containing macrophages but this did not reach significance when normalized to plaque area (Fig. 3E). No significant change in Ki67-positive proliferative cells was also observed in *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice (Fig. S3C). To elucidate the origin of the hepatic signal, gene set enrichment analysis (GSEA) of the differentially expressed genes was next performed in the liver of *Gls2*-deficient animals. This analysis confirmed a dominant upregulation of genes involved in amino acid metabolism (Fig. 3F). In contrast, a down-regulation of several genes related to cellular matrix (i.e. 'biological adhesion', 'encapsulating structure', 'collagen extracellular matrix' and 'cytoskeleton') was identified as enriched gene ontology (GO) terms (Fig. 3G). Thus, we next explored whether this predictive signature is intertwined with local and/or systemic inflammation (Sorokin, 2010). Quantification of Kupffer cell numbers were unaltered in the liver of all *Gls2*-deficient animals (Fig. 3H and S3D). We next fasted *Gls2*-deficient animals to unravel a potential hepatic energy-sensing governing monocyte homeostasis (Jordan et al., 2019). Atherogenic-diet fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> responded to fasting by raising plasma non-esterified fatty acid (NEFA) levels (Fig. S3E) without major impact on circulating monocytes (Fig. 3I), most likely because these mice were already hyperlipidemic. We further investigated whether glutaminolysis could contribute to the hepatic energy-sensing signature that drive monocyte homeostasis, especially their mobilization (Jordan et al., 2019). However, the previously identified hepatic energy-sensing signature was not modulated in the liver of *Gls2*-deficient animals (Fig. S3F) and we did not observe monocyte mobilization in the bone marrow (Fig. S3G) or the spleen (Fig. S3H). There were also no changes in the liver, plasma or bone marrow fluid inflammatory profile of these mice (Fig. 3J). Thus, enhanced monocyte infiltration in atherosclerotic plaques in absence of GLS2 is dissociated from energy-sensing by the liver.

Although unlikely because *Gls2* expression is low in macrophages from the publicly available Immgen dataset (not depicted) and mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> developed monocytois and accelerated atherosclerosis, we still wondered whether we may have missed an unexpected cell-intrinsic role of GLS2 in leukocytes. This was tested in *Ldlr*<sup>-/-</sup>-recipient mice that received control or *Gls2*<sup>-/-</sup> bone marrow fed with an atherogenic diet for 9 weeks (Fig. 3K). First, these animals did not develop monocytois (Fig. 3L and S3I). We also performed a principal component analysis from RNAseq data of resting and alternatively activated *Gls2*-deficient bone marrow-derived macrophages, which did not segregate *Gls2*-deficient cells from controls (Fig. S3J). Accordingly, basal oxygen consumption rate (OCR) and maximal respiration after FCCP (carbonyl cyanide 4-[trifluoromethoxy] phenylhydrazone) treatment in *Gls2*-deficient macrophages did not reveal significant differences even upon glutamine depletion conditions (Fig. S3K). *Gls2* deficiency did also not impact alternative macrophage activation as illustrated by similar expression of canonical CD206 and CD301 markers (Fig. S3L). Consequently, *Gls2*<sup>-/-</sup> bone marrow-transplanted mice developed similar atherosclerosis development (Fig. 3M). Altogether these findings rule out a cell-autonomous role of GLS2 in leukocytes, especially monocytes or macrophages. Thus, the inflammatory phenotype of the atherosclerotic plaque in *Gls2*-deficient mice might be secondary to local cues.

**Targeting hepatic glutaminolysis modulates glutamine fluxes at distance to alter atherosclerotic plaque remodeling.** We recently report that atherosclerotic lesions are avid of glutamine at the expense of glutamate (Merlin et al., 2021). Thus, we hypothesized that modulation of plasma GGR could directly impact atherosclerosis development by modulating substrate availability. To gain further insight into this hypothesis, we performed RNA-seq analysis of control and *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> aortas, for which no hyperlipidemia or monocytois were observed. A principal component analysis revealed that aortas from *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice clearly

clustered aside from control aortas (**Fig. 4A**). A volcano plot of differentially expressed genes indicated a significant up-regulation of 323 genes and a down-regulation of 422 genes (**Fig. S4A**). As expected from characterization of atherosclerotic plaques of *Gls2*-deficient animals, we observed that many genes associated with inflammation (for instance, 'innate immune system' or 'apoptosis') were upregulated (**Fig. 4B**). Less expected, enriched GO terms for tissue microenvironment (i.e., 'ECM', 'epithelial-mesenchymal transition' or 'cardiac muscle contraction') were observed in a set of genes that were significantly under-expressed in *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Gls2*<sup>-/-</sup> aortas (**Fig. 4C**). Thus, we reasoned that glutamine and glutamate homeostasis could modulate the microenvironment by at least four known mechanisms (**Fig. 4D**), namely glutamine-induced glycan synthesis (Reily et al., 2019), glutamate-induced collagen synthesis (Karna et al., 2020), transglutaminase 2 (TGM2)-mediated cross-link of a broad spectrum of ECM proteins through the generation of N<sup>ε</sup>-(γ-L-glutamyl)-L-lysine (Lorand and Graham, 2003) or polyglutamylase-mediated post-translational modification of cytoskeleton proteins by forming glutamate side chains of variable lengths (Janke and Bulinski, 2011). We first did not observe regulation of genes involved in the production of proteoglycans, collagens, or ECM glycoproteins in the aortas of *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Gls2*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. S4B**). There was also no enrichment in endothelial or smooth muscle cell (SMC) gene signature (**Fig. S4C**), the latter being known to produce arterial medial and adventitial ECM. KEGG pathway analysis did also not reveal major changes in gene expression related to glycan and glycosaminoglycan metabolism (**Fig. S4D**). We next confirmed no alteration in glycosaminoglycans in the intima region of the aortic sinus of *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Gls2*<sup>-/-</sup> mice compared to controls by the alcian blue staining (**Fig. 4E, upper panel**). Similar findings were observed in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-*Gls2*<sup>shRNA</sup> (**Fig. S4E, upper panel**). Among different collagen stainings, we did find a small but significant decrease in collagen IV in atherosclerotic lesions of *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Gls2*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 4E, lower panel**), but this was not consistent in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-*Gls2*<sup>shRNA</sup> (**Fig. S4E, lower panel**). Thus, it could unlikely explain the monocyte infiltration in the atherosclerotic plaques of all *Gls2*-deficient mice. We next assessed post-translational modification of ECM proteins by TGM2 and polyglutamylases using N<sup>ε</sup>-(γ-L-glutamyl)-L-lysine (81D4 antibody) and polyglutamylation modification (GT335 antibody) stainings, respectively (**Fig. 4D**). We first noticed similar expression of TGM2 and few polyglutamylases in the aortas of *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Gls2*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. S4D**). Nevertheless, we found higher TGM2 activity in the atherosclerotic lesions of *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Gls2*<sup>-/-</sup> mice as shown by 81D4 staining that almost reach significance when normalized to plaque area (**Fig. 4F, upper panel**). This effect was much stronger in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-*Gls2*<sup>shRNA</sup> (**Fig. S4F, upper panel**). GT335 staining revealed reduced polyglutamylation modifications in the atherosclerotic lesions of *Ldlr*<sup>-/-</sup> *Gls2*<sup>-/-</sup> mice that almost reach significance when normalized to plaque area (**Fig. 4F, lower panel**). Again, this effect was much stronger in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-*Gls2*<sup>shRNA</sup> (**Fig. S4F, lower panel**). These findings support the concept that the enhanced plasma glutamine after defective hepatic glutaminolysis could promote TGM2 activity at the expense of glutamate-dependent polyglutamylation reactions.

Verhoeff-Van Gieson stain (VVG) confirmed an increased elastic lamina area in the atherosclerotic lesions of mice with defective hepatic glutaminolysis (**Fig. 4G and S4G**), supporting the idea that the elastic fibers are weakened.

**Overexpression of hepatic GLS2 but not knockdown of hepatic GlS1 limits atherosclerosis development.** There is evidence that a hepatic metabolism switch from the GLS2 to GLS1 isoform can occur in non-alcoholic fatty liver disease (Simon et al., 2020). Taking into consideration these observations, we have evaluated the therapeutic potential of overexpressing GLS2 or silencing GLS1 by scAAV8 virus infection *in vivo* in the liver of atherosclerosis-prone *ApoE*<sup>-/-</sup> mice (**Fig. 5A**). As a result of *Gls2* overexpression or *Gls1* silencing, liver glutamine but not glutamate content was decreased (**Fig. S5A**) and the liver GGR was significantly reduced only in mice overexpressing GLS2 (**Fig. 5B**). Muscle GGR was not altered in these animals (**Fig. S5B**). In contrast to *Gls1* silencing, plasma glutamine levels were decreased in mice with *Gls2* overexpression (**Fig. 5C**). Analysis of

atherosclerotic lesions revealed an approximately 1.3-fold decrease in atherosclerosis plaque area of mice infected with the AAV-Gls2<sup>Ovex</sup> but not in mice infected with the AAV-Gls1<sup>ShRNA</sup> (**Fig. 5D**). This occurred without any changes in plasma ALT or urea levels or in blood monocyte counts (**Fig. S5D**). In addition, our results showed a lower N<sup>ε</sup>-(γ-L-glutamyl)-L-lysine protein crosslink and higher polyglutamylation modifications in atherosclerotic lesions of mice infected with the AAV-Gls2<sup>Ovex</sup> as shown by 81D4 and GT335 stainings, respectively (**Fig. 5G and 5H**). In summary, GLS2 overexpression improves atherosclerotic plaque remodeling and limits atherosclerosis development.

## Discussion

Our study provides powerful support for the inverse correlation between the plasma GGR and incident CVD in the MESA cohort, most likely driven by an inverse association with cardiometabolic traits and identifies an unexpected independent association with carotid plaque progression. Using preclinical models, we uncover that GLS2-dependent hepatic glutaminolysis, but not GS-dependent muscle glutamine synthesis, is required to maintain an optimal plasma GGR at steady state or after glutamine supplementation and prevent the development of atherosclerosis. This involved matrix remodeling through an imbalance between glutamine and glutamate-dependent cross-linking of ECM proteins by N<sup>ε</sup>-(γ-L-glutamyl)-L-lysine and polyglutamylation, respectively.

Our study supports the inverse relationship between the plasma GGR and CVD disease with different nuances. Indeed, the reduced plasma GGR associated to incident CVD in the MESA cohort, a population-based prospective study with a 10-year follow-up, was the consequence of increased plasma glutamate levels as previously observed in the PREDIMED trial (Zheng et al., 2016). However, for the secondary outcome, we found that these associations were conserved with stroke events, while there was no relationship with incident CHD. Additionally, the progressive loss of the inverse association after adjustment for potential cofounders (conditional logistic regression models) suggested that the plasma GGR was mainly inversely correlated with cardiometabolic traits as previously proposed (Cheng et al., 2012). In contrast, in a second subsample from the MESA cohort, we found that greater odds of carotid artery plaque progression were associated to a strong and independent decrease in glutamate levels superior to plasma glutamine levels (i.e, higher plasma GGR). This association persists in all adjusted covariate models indicating it was an independent risk factor. The reasons for the different results are uncertain but could point to differences in these disease processes, especially how the balance between glutamine synthesis and hydrolysis are regulated in a context of coronary plaque rupture or carotid plaque thrombus formation, respectively.

Glutamine is classified as a conditionally essential amino acid because it depends on body homeostasis. In healthy condition, the organism can ingest or synthesize glutamine and it is thus considered as a nonessential amino acid. However, there is a shortage of glutamine in catabolic situations, including metabolic stresses. It has been previously attributed to the high demand for glutamine in the liver (i.e, neoglucogenesis) and the immune system cells (i.e, acute phase response and maintenance of the redox status) that cannot always be fulfilled by GS-mediated de novo synthesis in skeletal muscles (DeBerardinis and Cheng, 2010)(O'Neill and Pearce, 2016). In catabolic state such as in type 2 diabetes, a genetic variant associated with diminished GS expression, was identified to link glutamine homeostasis to the development of coronary artery disease (Qi et al., 2013). In atherosclerotic mouse models, others and we previously showed enhanced glutamine utilization in the inflamed aortas (Tavakoli et al., 2017)(Merlin et al., 2021), suggesting that this disease could be envisioned as a pathological catabolic condition. However, the present study rules out the hypothesis that inhibition of GS-dependent glutamine synthesis is either responsible for a shortage of glutamine supply or the development of atherosclerosis and their risk factors. Indeed, inhibition of GS with MSO did reduce muscle glutamine reserve in mouse atherogenic models but this led to an increase in plasma glutamate and not glutamine levels, indicating that these animals are unlikely on a catabolic state. Consequently, there was no consequence of GS inhibition on liver glutamine homeostasis or pathological phenotype, glucose homeostasis or in atherosclerosis development.

We now report that targeting hepatic GLS2-dependent glutaminolysis is the culprit of the control of atherosclerosis plaque growth at distance. Although high glutamine concentration is found in the liver to support many hepatic activities (DeBerardinis and Cheng, 2010)(O'Neill and Pearce, 2016), very little is still known about the role of GLS2-dependent hepatic glutaminolysis in mediating glutamine homeostasis and its contribution to the disequilibrium of cardiometabolic factors. In catabolic situations, the liver needs to consume glutamine to support whole-body detoxification processes and the generation of gluconeogenic

precursors (DeBerardinis and Cheng, 2010)(O'Neill and Pearce, 2016). Consistently, mice with *Gls2* deficiency exhibited lower glutamine-to-glucose flux in response to glucagon, the main catabolic hormone of the body, and developed perturbed glucose homeostasis in insulin-resistant conditions (Miller et al., 2018). However, none of these effects were observed in *Gls2* deficient mice on a non-catabolic atherogenic background as similar respiratory quotient or glucose homeostasis were observed. These data exclude a perturbation of glucose homeostasis as an intermediate of the effect of GLS2 deficiency on atherosclerosis plaque growth at distance. Activation of catabolic processes during fasting has recently links a hepatic energy-sensing signature to monocyte mobilization (Jordan et al., 2019), which could participate to the monocyte infiltration of inflamed atherosclerotic plaques (Swirski and Nahrendorf, 2013). However, the absence of *Gls2* did not modulate the previously identified hepatic inflammatory pathway signature. We did observe that GLS2 knockdown slightly enhanced monocyte count and monocyte infiltration in atherosclerotic plaque but only in the *Apoe*<sup>-/-</sup> atherosclerotic background and not in the *Ldlr*<sup>-/-</sup> background. This effect was not exacerbated by fasting these animals indicating that GLS2 is not part of the hepatic energy-sensing signature that controls monocyte homeostasis in a catabolic situation. The exclusion of an intrinsic role of GLS2 in myeloid cells pointed to a peripheral inflammatory cue, most likely within high glutamine demanding lesions, at the origin of this inflammation. Because a switch from the GLS2 to GLS1 isoform has been shown to occurs in NASH to promote VLDL-TG assembly (Simon et al., 2020), we next investigated whether GLS2 deficiency could modulate hyperlipidemia, which is another independent risk factor for CVD. However, we also ruled out this hypothesis since GLS2 deficiency had not impact on liver steatosis or damage and high-throughput transcriptional profiling also did not reveal changes in hepatic TG synthesis or VLDL production. This is most likely the consequence of an upregulation of the catabolism of several amino acids to replenish hepatic glutamate levels. We did observe an increase in plasma TG levels in the *Apoe*<sup>-/-</sup> atherosclerotic background that was no visible in the *Ldlr*<sup>-/-</sup> background and this was associated with reduced LPL expression. This difference between atherogenic background could be due to the development of NASH in high fat fed-*Apoe*<sup>-/-</sup> mice (Schierwagen et al., 2015) and the role of hepatic GLS1 in this context (Simon et al., 2020). However, silencing of hepatic GLS1 had not effect on plasma TG levels or the development of atherosclerosis in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice. Moreover, the mild hyperlipemia in absence of GLS2 in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice was not associated with major differences in the deposition of oxidized lipid in the lesions. Thus, our mouse datasets support the observation that the plasma GGR is an independent risk factor for carotid plaque progression as identified in the MESA cohort.

Consistent with GWAS studies reporting that SNPs in *Gls2* are associated with plasma glutamine levels in patients with no catabolic critical illness (Suhre et al., 2011)(Kettunen et al., 2012)(Shin et al., 2014), we found that *Gls2* deficiency leads to an increase in plasma glutamine levels. In catabolic critical illness, small clinical trials indicate that glutamine supplementation enhances myocardial repair in patients with coronary artery disease and limits cardiac damage after coronary revascularization as discussed elsewhere (Durante, 2019). Indeed, in such catabolic settings, glutamine consumption may compensate for the lack of endogenous glutamine production to support energy production and detoxification. However, under no catabolic critical illness, with no decline of glutamine reserve, it is not clear whether and how consuming extra glutamine might be beneficial to the overall pathology and faster recovery. Our study using nutritional intervention for murine atherosclerosis regression shows that GLS2-dependent hepatic glutaminolysis is required for glutamine homeostasis and the raise in plasma glutamine levels in absence of GLS2 can promote atherosclerosis plaque growth at distance. An important implication is that overexpressing GLS2 may be an avenue to limit atherosclerotic lesion development as shown in the present study.

Modulation of glutamine metabolism can lead to strikingly different phenotypes. For instance, it has recently been suggested that glutamine metabolism could support endothelial cell angiogenic sprouting (Eelen et al., 2018), smooth muscle cell synthetic phenotype (Zhang et al., 2021), fibroblast-dependent ECM remodeling (Karna et al., 2020) or a reparative-type macrophage (Jha et al., 2015)(Merlin et al., 2021), all cells playing a major role in atherosclerosis. In the current setting, high-throughput transcriptional profiling revealed

that aortas from *Glis2*-deficient mice mainly exhibited perturbation of ECM and muscle contraction. Consistent with the perturbed glutaminolysis in the aortas of atherosclerotic mice despite their avidity for glutamine (Merlin et al., 2021), we found that the raise of glutamine in *Glis2*-deficient animals led to an imbalance between glutamine and glutamate-utilizing ECM modulating enzymes within atherosclerotic lesions. Indeed, enhanced glutamine-dependent TGM2 activity was observed at the expense of glutamate-dependent polyglutamylation reactions in mice with GLS2 deficiency. Little is also known about the role of polyglutamylation in atherosclerosis. At least, polyglutamylation of microtubules can modulate cilia homeostasis and defective primary cilia can promote the process of atherosclerosis (Wloga et al., 2017)(Wang et al., 2021). In contrast, a role of TGM2-mediated cross-linking of ECM proteins in damaged and ageing tissues has been well documented (Chen et al., 2022). By serving as catalyst to glue protein together, TGM2 protects ECM from proteolytic breakdown and results in decreased ECM turnover and excess ECM accumulation. There are several cardiovascular consequences of this pathological process depending on the substrate (i.e, fibronectin, collagen, fibrinogen, osteopontin, laminin, elastin, nidogen or elafin) and the tissue localization or environment. For instance, TGM2 has been proposed in atherosclerotic tissues to modulate the deposition of collagen, the vascular stiffening, or the elasticity of elastic lamina in inward arterial remodeling that occurs in response to flow restriction (Chen et al., 2022). This raises several interesting questions for future studies on the link between GLS2-dependent glutamine metabolism and the distal TGM2 activity, especially the specific cross-linking of ECM proteins that could impact the stiffening or elasticity of the aorta depending on mechanical forces.

The metabolic phenotype of hepatic GLS2 in modulating ECM outlined here could have broader consequences on cardiovascular diseases such as atrial fibrillation, arterial hemodynamic or even the development of spontaneous occlusive coronary artery atherosclerosis, for which mouse atherogenic models are usually protected (Fuller et al., 2014). Targeting vascular remodeling has recently regained attention as a potential therapeutic CVD intervention because of the identification of genetic loci in GWAS involved in vascular remodeling (Kessler et al., 2016). Thus, preventing cross-linking of ECM proteins by distally modulating hepatic GLS2-dependent glutamine flux may act at an early stage of ECM remodeling.

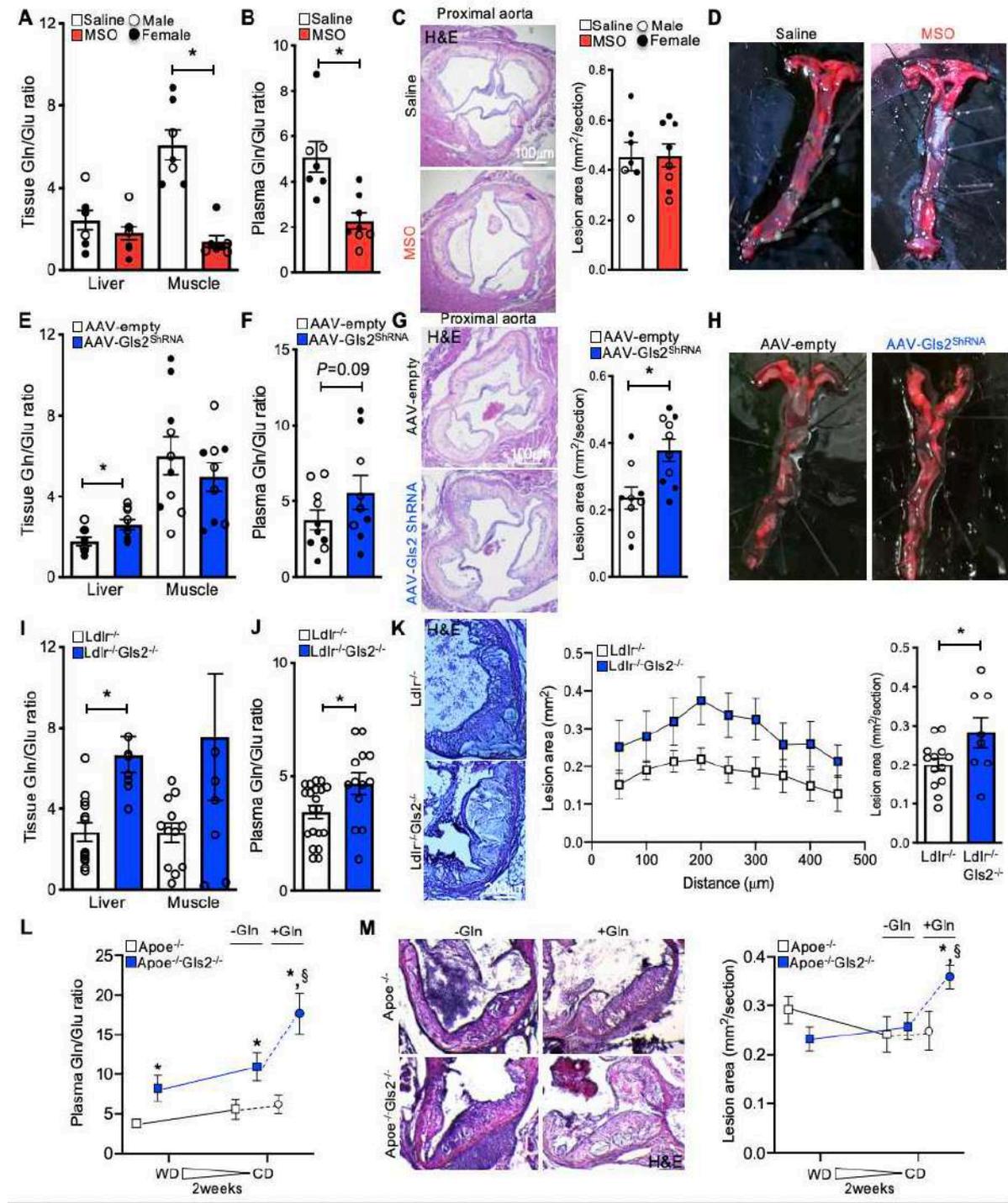
# Table 1

Outcome	Glutamine/Glutamate Ratio (Per unit increase)		Glutamine (Per unit increases)		Glutamate (Per unit increases)	
	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value
<b>Incident Hard CVD (N=988; Events=499)</b>						
Model 1	0.95 [0.90,0.99]	0.016	1.000 [0.999,1.002]	0.432	1.004 [1.001,1.008]	0.014
Model 2	0.95 [0.90,1.00]	0.039	1.000 [0.999,1.002]	0.504	1.004 [1.000,1.007]	0.042
Model 3 (N=892)	0.95 [0.90,1.00]	0.052	1.000 [0.999,1.001]	0.997	1.003 [0.999,1.007]	0.117
<b>Plaque Progression (N=862; Events=431)</b>						
Model 1	1.06 [1.01,1.11]	0.017	0.996 [0.995,0.997]	<0.001	0.991 [0.987,0.994]	<0.001
Model 2	1.08 [1.02,1.13]	0.004	0.996 [0.995,0.997]	<0.001	0.988 [0.984,0.993]	<0.001
Model 3 (N=772)	1.09 [1.03,1.16]	0.002	0.996 [0.994,0.997]	<0.001	0.989 [0.985,0.993]	<0.001

**Table 1:** Conditional Logistic Regression Models for Incident Hard CVD and Plaque Progression (OR and 95% CI per SD of plasma glutamine-to-glutamate ratio, glutamine and glutamate levels).

Model 1: adjusted for age, sex, race/ethnicity, body mass index, and site. Model 2: model covariates plus diabetes mellitus status, current smoking, total cholesterol, statin use, hypertension medication, and systolic blood pressure. Model 3: model 2 covariates plus pack-years smoking, alcohol use, intentional exercise, and Mediterranean diet. No. of subjects and events smaller than in model 1 and 2 because of missing data for covariates. CVD indicate cardiovascular disease; and OR, odds ratio.

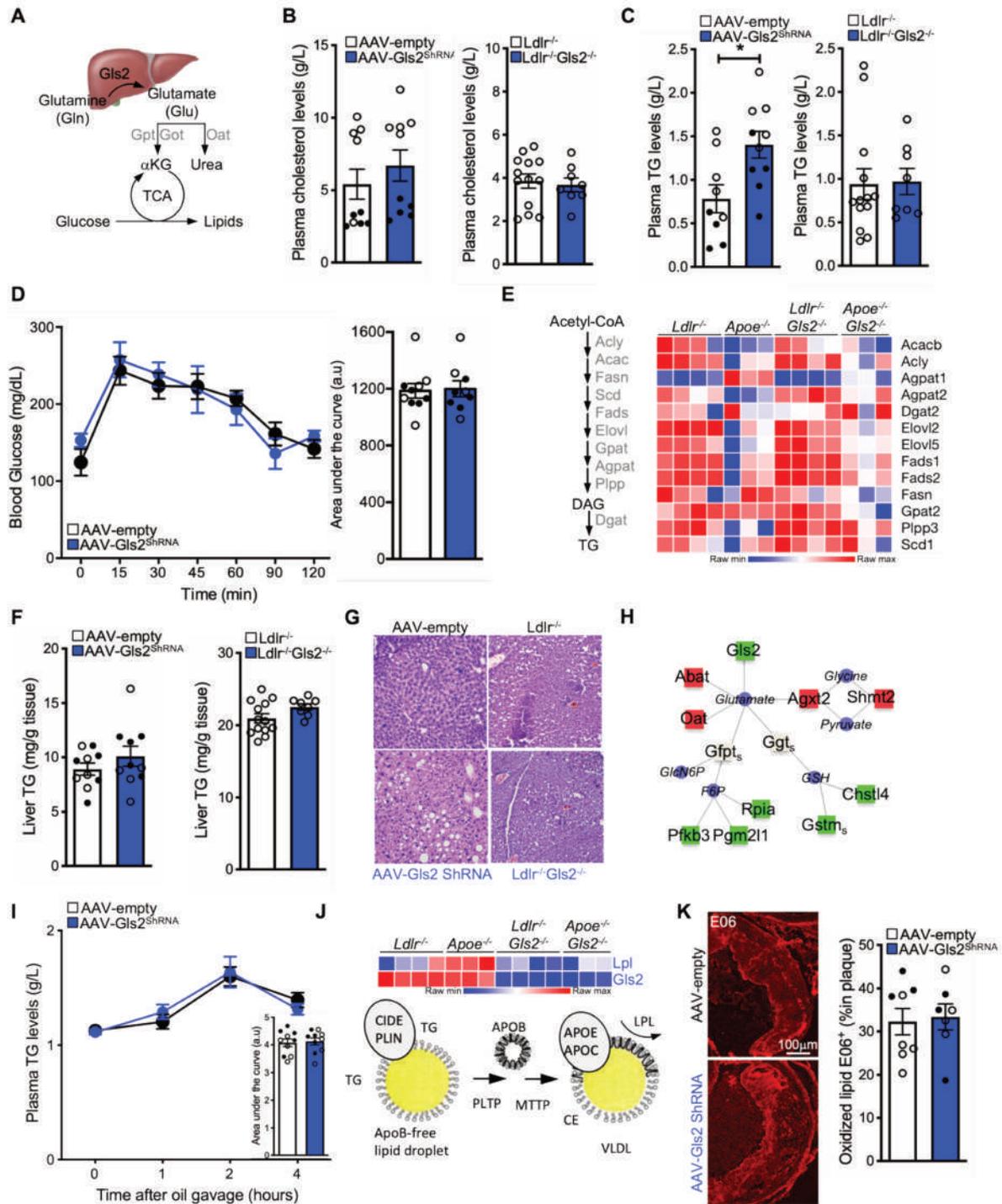
# Figure 1



**Figure 1. Hepatic glutaminolysis but not glutamine synthesis prevents atherosclerosis.** Effect of intraperitoneal injection of 20mg/kg BW of methionine sulfoximine (MSO) on liver, muscle (A) and plasma (B) glutamine to glutamate ratio (GGR) in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice fed an atherogenic diet for 12 weeks. Red bars represent MSO treatment. Both sexes were analyzed. Representative H&E-staining of paraffin-embedded serial sections obtained from proximal aortas (left panel) and quantification of proximal aortic root lesion area by

morphometric analysis (right panel) from these mice. Original magnification,  $\times 100$  (**C**). Oil Red O-stained descending aortas from representative atherogenic-diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice treated or not with MSO (**D**). Tissue (**E**) and plasma (**F**) GGR in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> or AAV-empty controls and fed an atherogenic diet for 12 weeks. Blue bars represent *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup>. Representative H&E-stained proximal aortas (left panel) and quantification of atherosclerotic lesion area in aortic sinuses (right panel) from these mice. Original magnification,  $\times 100$  (**G**). Representative Oil Red O-stained descending aortas from these mice (**H**). Tissue (**I**) and plasma (**J**) GGR in *Ldlr*<sup>-/-</sup> or *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice fed an atherogenic diet for 12 weeks. Blue bars represent *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice. Representative H&E-staining of cryosections obtained from proximal aortas (left panel) and quantification of atherosclerotic lesion area in the aortic root of these mice expressed as the mean of each genotype across the 400  $\mu\text{m}$  of the aortic root (middle panel) and of individual mice (right panel). Original magnification,  $\times 200$  (**K**). Plasma GGR in *Apoe*<sup>-/-</sup> or *Apoe*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice fed an atherogenic diet for 8 weeks or switched for the last two weeks to chow diet (-Gln) or chow diet orally supplemented with glutamine (+Gln) (**L**). Representative H&E-staining of cryosectioned proximal aortas (left panel) and quantification of atherosclerotic lesion area in aortic sinuses (right panel) from these mice (**M**). The data are given as the mean  $\pm$  s.e.m. of at least one independent experiment ( $n = 5$  to 13 independent animals). \* $P < 0.05$  vs controls, determined by two-tailed Student's *t*-test.

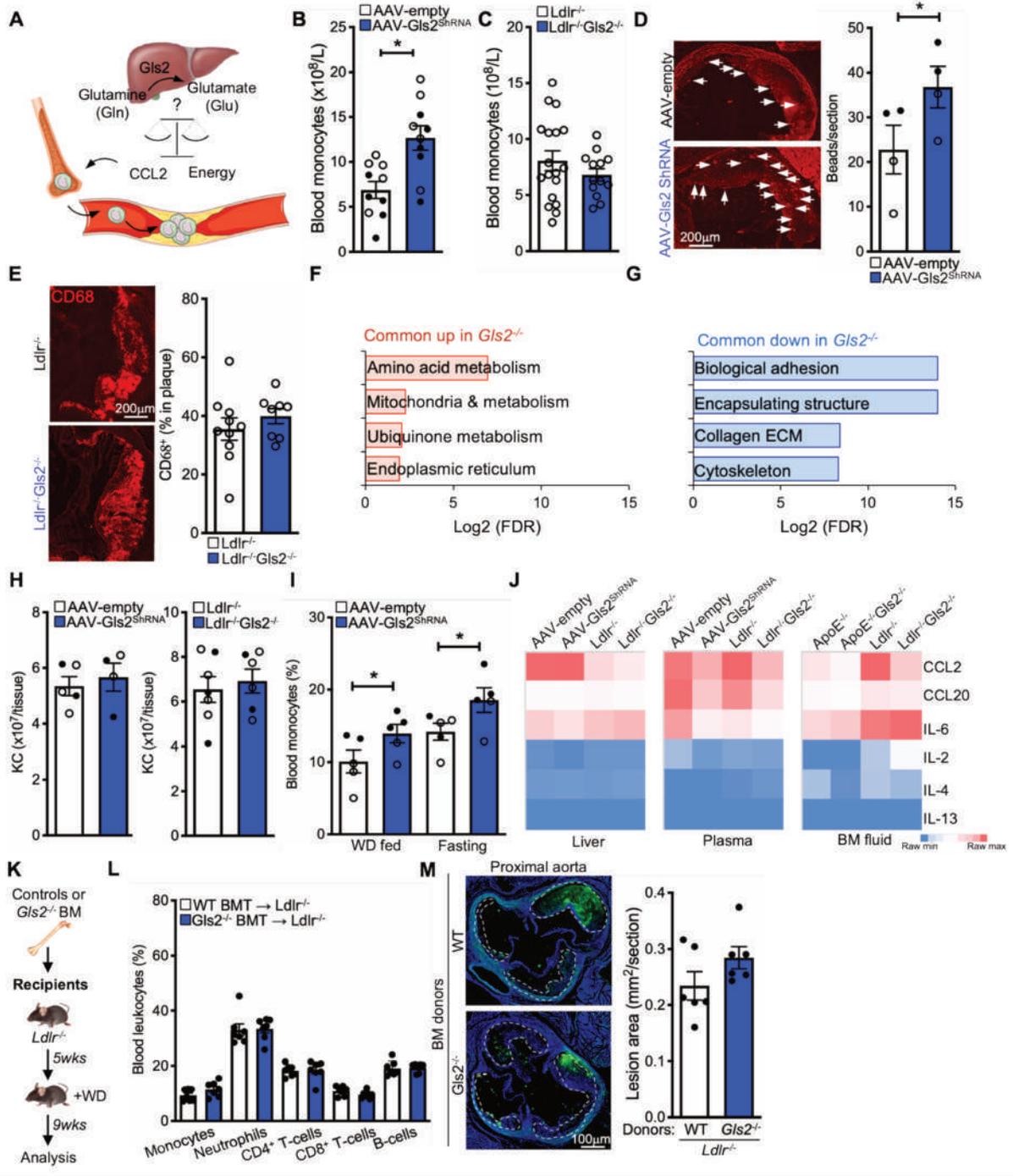
## Figure 2



**Figure 2. Defective hepatic glutaminolysis promotes atherosclerosis independently of a glucose or triglyceride anti-catabolic effect.** Schematic representation of hepatic GLS2-dependent glutaminolysis and glutamate incorporation into metabolic pathways (A). Plasma cholesterol (B) and triglyceride (C) levels in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> or *Ldlr*<sup>-/-</sup>Gls2<sup>-/-</sup> mice compared to respective controls. Glucose tolerance test was performed *i.p.* on atherogenic diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> or AAV-empty controls.

Blood glucose concentrations were measured at the indicate time points. The glucose tolerance index was calculated as the product of areas under glucose curves **(D)**. Schematic representation of triglyceride synthesis pathway (left panel) and RNAseq analysis with focus on enzymatic regulators in the liver of *Ldlr<sup>-/-</sup>Gls2<sup>-/-</sup>* and *Apoe<sup>-/-</sup>Gls2<sup>-/-</sup>* mice and their respective controls (right panel) **(E)**. Liver triglyceride content in *Apoe<sup>-/-</sup>* mice infected with the AAV-*Gls2<sup>shRNA</sup>* or *Ldlr<sup>-/-</sup>Gls2<sup>-/-</sup>* mice compared to respective controls **(F)**. H&E staining of paraffin-embedded serial sections obtained from the liver of these animals. Original magnification, ×200 **(G)**. Topological analysis of metabolic pathways commonly up (red) or down (green) regulated from RNAseq analysis of the liver of *Gls2*-deficient animals described above performed with Phantasus and CoMBI-T softwares **(H)**. Plasma triglyceride levels were determined at 0, 1, 2 and 4 hours after the olive oil gavage, (right panel represents area under the curve) **(I)**. RNAseq analysis reveals reduced *Lpl* expression in *Gls2*-deficient animals (upper panel) among the different genes involved in VLDL production and hydrolysis depicted in the schematic representation (lower panel) **(J)**. E06 staining of oxidized lipids in the atherosclerotic lesions of atherogenic diet-fed *Apoe<sup>-/-</sup>* mice infected with the AAV-*Gls2<sup>shRNA</sup>* or AAV-empty controls **(K)**. All values are mean ± s.e.m. and are representative of at least one independent experiment (n = 8 to 13 independent animals). \**P* < 0.05 vs controls, determined by two-tailed Student's *t*-test.

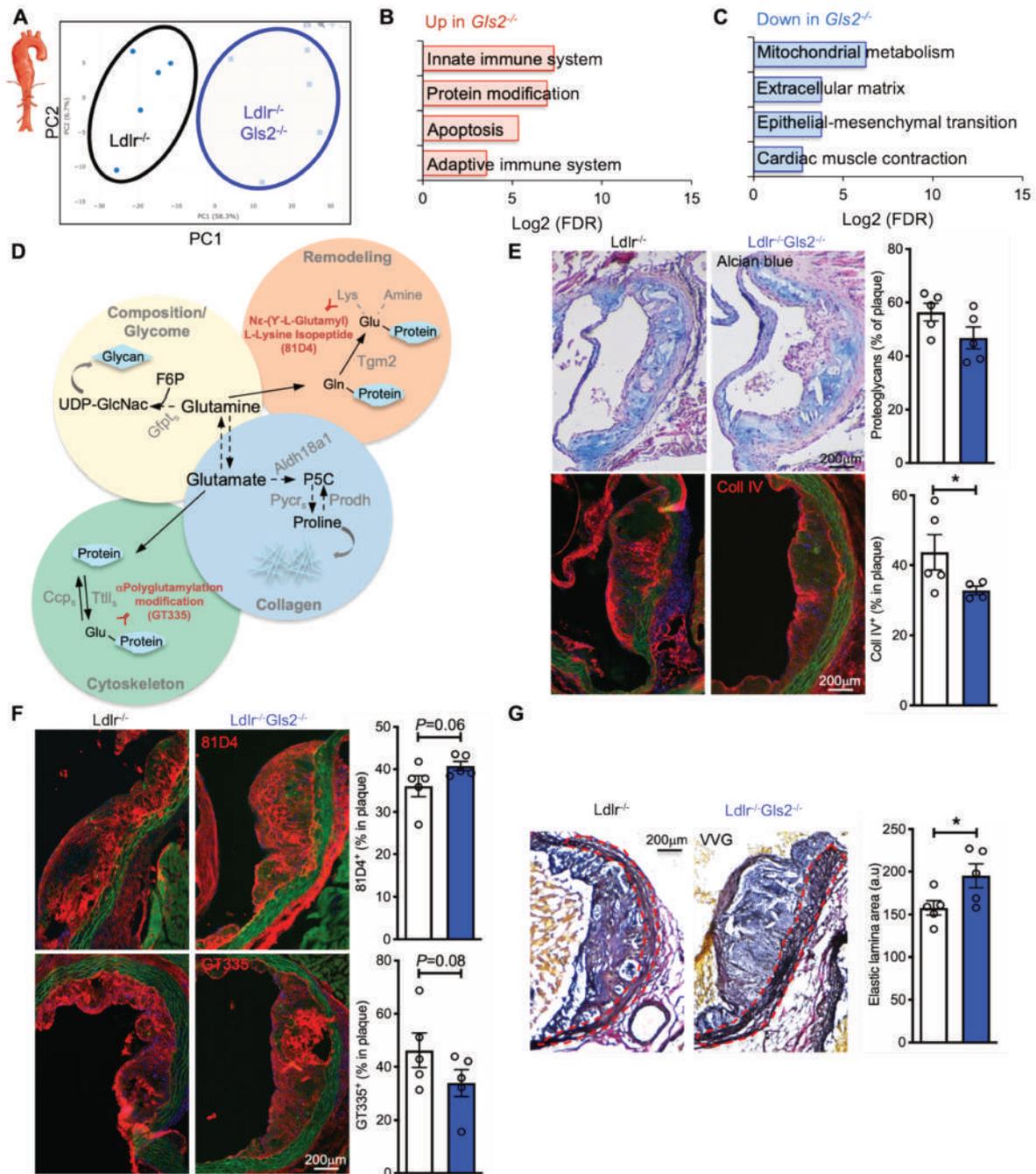
# Figure 3



**Figure 3. Lesional monocyte infiltration in *Gls2*-deficient mice is independent of a hepatic or monocyte-intrinsic energy-sensing signature.** Schematic representation of the hypothesis that hepatic GLS2-dependent glutaminolysis dictates an energy-sensing governing monocyte homeostasis (A). Blood monocyte counts in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> (B) or *Ldlr*<sup>-/-</sup>Gls2<sup>-/-</sup> (C) mice compared to respective controls. Tracking recruitment of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes in atherosclerotic plaques 2 days after monocyte labeling with latex beads in 6 weeks atherogenic diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> or AAV-empty controls. Representative pictures (left panel, magnification,  $\times 200$ ) and

quantification of latex beads (indicated by arrows) localized within atherosclerotic lesions and expressed as the number of beads per cross section (right panel) **(D)**. Macrophages were detected by CD68 immunofluorescent staining in the proximal aorta (left panel) and quantified as the mean intensity (right panel). Original magnification,  $\times 200$  **(E)**. Common differentially expressed genes between *Gls2*-deficient mice and controls on atherogenic *Ldlr*<sup>-/-</sup> and *ApoE*<sup>-/-</sup> background were subjected to gene set enrichment analysis (GSEA). The top 4 up- and down-regulated pathways are displayed **(F and G)**. Kupffer cells (KCs) were quantified by flow cytometry at the end of the study period in atherogenic diet-fed *ApoE*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-*Gls2*<sup>shRNA</sup> or *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice compared to respective controls **(H)**. Blood monocyte counts in atherogenic diet-fed *ApoE*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-*Gls2*<sup>shRNA</sup> or AAV-empty controls before and after 12 hours fasting **(I)**. Expression of chemokines and interleukins in the liver (left panel), plasma (middle panel) and BM fluid (right panel), assessed by multiplex assays **(J)**. Experimental overview. Bone marrow (BM) from *Gls2*<sup>-/-</sup> mice and controls were transplanted into *Ldlr*<sup>-/-</sup> recipient mice and after a 5-week recovery period, the mice fed with an atherogenic diet (Western Diet, WD) for 9 weeks to induce the development of atherosclerosis **(K)**. Blood leukocyte counts were determined by flow cytometry at the end of the experiment **(L)**. Representative DAPI-staining of cryosectioned proximal aortas (left panel, magnification,  $\times 100$ ) and quantification of atherosclerotic lesion area in the aortic root of these mice (right panel) **(M)**. The data are given as the mean  $\pm$  s.e.m. of at least one independent experiment (n = 5 to 13 independent animals). \**P* < 0.05 vs controls, determined by two-tailed Student's *t*-test.

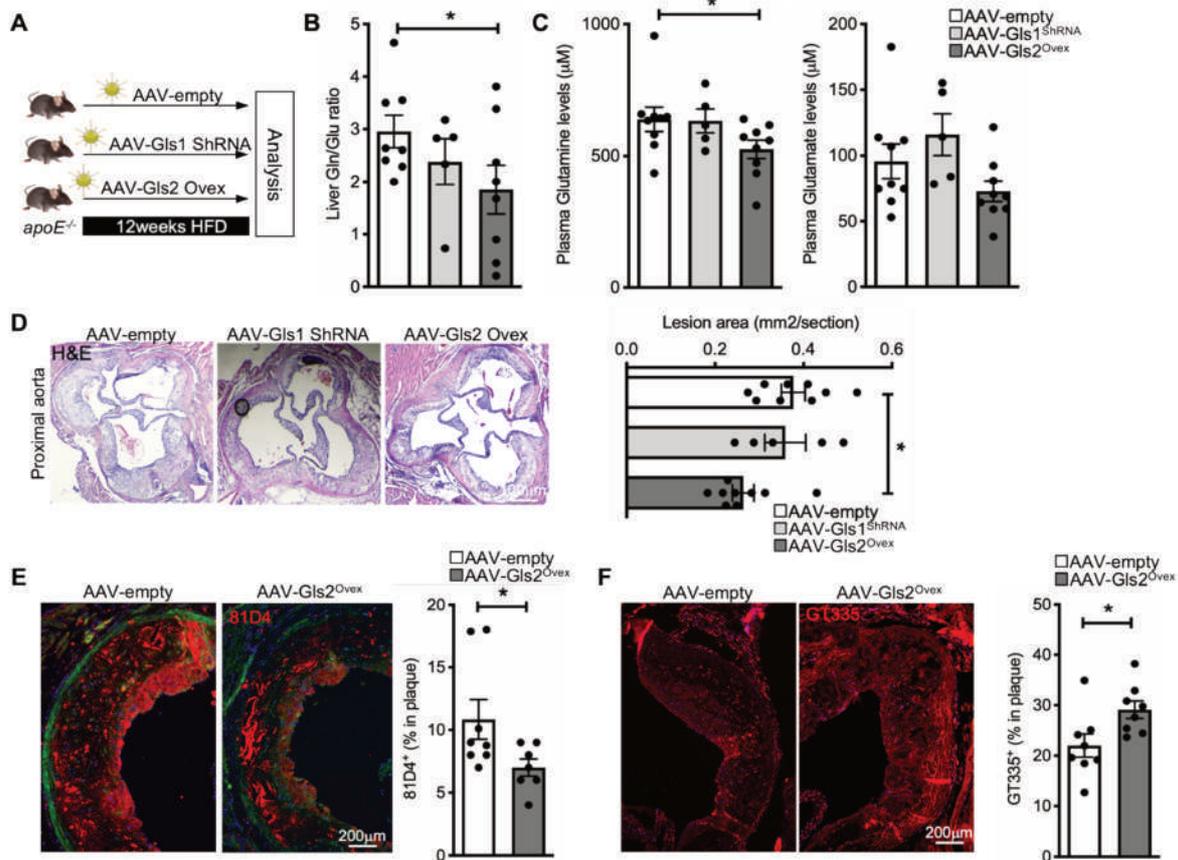
## Figure 4



**Figure 4. Hepatic GLS2 deficiency promotes atherosclerotic plaque remodeling at distance.** Principal component analysis from RNAseq analysis of aortas of *Ldlr*<sup>-/-</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice (**A**). Differentially expressed genes between *Ldlr*<sup>-/-</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice were subjected to gene set enrichment analysis (GSEA). The top 4 up- and down-regulated pathways are displayed (**B** and **C**). Schematic representation of glutamine- and glutamate-dependent extracellular matrix remodeling (**D**). Alcian blue staining in the proximal aorta of atherogenic diet-fed *Ldlr*<sup>-/-</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice (upper left panel) and quantification of proteoglycan content normalized to plaque size (upper right panel). Immunofluorescent staining of collagen IV (CollIV) in the atherosclerotic lesions of these mice (lower left panel) and quantification (lower right panel). Original magnification,  $\times 200$  (**E**). Immunofluorescent

staining and quantification of cross-linked proteins by N<sup>ε</sup>-(γ-L-glutamyl)-L-lysine (81D4, upper panel) and polyglutamylation (GT335, lower panel) in the atherosclerotic lesions of these mice. Original magnification, ×200 **(F)**. Verhoeff-Van Gieson (VVG) staining and quantification of elastic lamina area (expressed as arbitrary unit, a.u) in the proximal aorta of atherogenic diet-fed *Ldlr*<sup>-/-</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice. Original magnification, ×200 **(G)**. The data are given as the mean ± s.e.m. of at least one independent experiment (n = 5 independent animals). \**P* < 0.05 vs controls, determined by two-tailed Student's *t*-test.

## Figure 5



**Figure 5. Therapeutic opportunity of hepatic GLS2 overexpression and GLS1 knockdown on atherosclerosis development.** Experimental outline. *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were infected with the AAV-Gls1<sup>shRNA</sup>, AAV-Gls2<sup>Ovex</sup> or AAV-empty controls and fed an atherogenic diet for 12 weeks (A). Liver GGR (B) and plasma glutamine and glutamate levels (C) in these mice at the end of the study period. Representative H&E-stained proximal aortas (left panel) and quantification of atherosclerotic lesion area in aortic sinuses (right panel) from these mice. Original magnification, ×100 (D). Immunofluorescent staining and quantification of cross-linked proteins by N<sup>ε</sup>-(γ-L-glutamyl)-L-lysine (81D4) (E) and polyglutamylation (GT335) (F) in the atherosclerotic lesions of atherogenic-diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls1<sup>shRNA</sup>, AAV-Gls2<sup>Ovex</sup> or AAV-empty controls. Original magnification, ×200. The data are given as the mean ± s.e.m. of at least one independent experiment (n = 5 to 9 independent animals). \*P < 0.05 vs controls, determined by two-tailed Student's *t*-test.

**Table S1**

Participant Characteristics	Mean ± SD or N (%)	Beta	p value
Age (yrs)	65.4 ± 9.9	-0.04	<0.001
Male	897 (52.7%)	-0.90	<0.001
Race			
Caucasian	648 (38.1%)	ref	
Chinese American	202 (11.9%)	-1.18	<0.001
African American	466 (27.4%)	-0.68	0.001
Hispanic	385 (22.6%)	-1.09	<0.001
Body Mass Index	28.2 ± 5.2	-0.05	0.002
Diabetes			
Normal	1203 (70.8%)	ref	
IFG	249 (14.6%)	-1.26	<0.001
Untreated Diabetes	51 (3.0%)	-0.82	0.066
Treated Diabetes	197 (11.6%)	-1.53	<0.001
Smoking Status			
Never	852 (50.2%)	ref	
Former	628 (37.0%)	-0.003	0.988
Current	216 (12.7%)	0.35	0.196
Pack-years Smoking	12.3 ± 21.7	-0.001	0.867
Second Hand Smoke (hr/week)	3.6 ± 12.5	0.01	0.306
Alcohol Use			
Never	363 (21.5%)	ref	
Former	428 (25.3%)	-0.38	0.090
Current	898 (53.2%)	0.03	0.885
Cholesterol			
Total	193.4 ± 34.5	-0.001	0.755
HDL	50.4 ± 14.8	0.02	<0.001
LDL	116.9 ± 30.0	-0.0005	0.853
Statins	269 (15.9%)	-0.26	0.258
Hypertension	893 (52.5%)	-0.48	0.003
Hypertension Medication	733 (43.1%)	-0.77	<0.001
Systolic BP	130.4 ± 22.0	-0.004	0.290
Diastolic BP	72.6 ± 10.3	-0.01	0.131
CRP (mg/L)	3.7 ± 5.9	-0.03	0.014
IL-6 (pg/mL)	1.6 ± 1.3	-0.18	0.003
Efflux Mass (mg/dL) / Well	3.0 ± 1.9	0.10	0.052

**Table S1.** Participant Characteristics for Carotid Plaque Progression and Incident CVD.

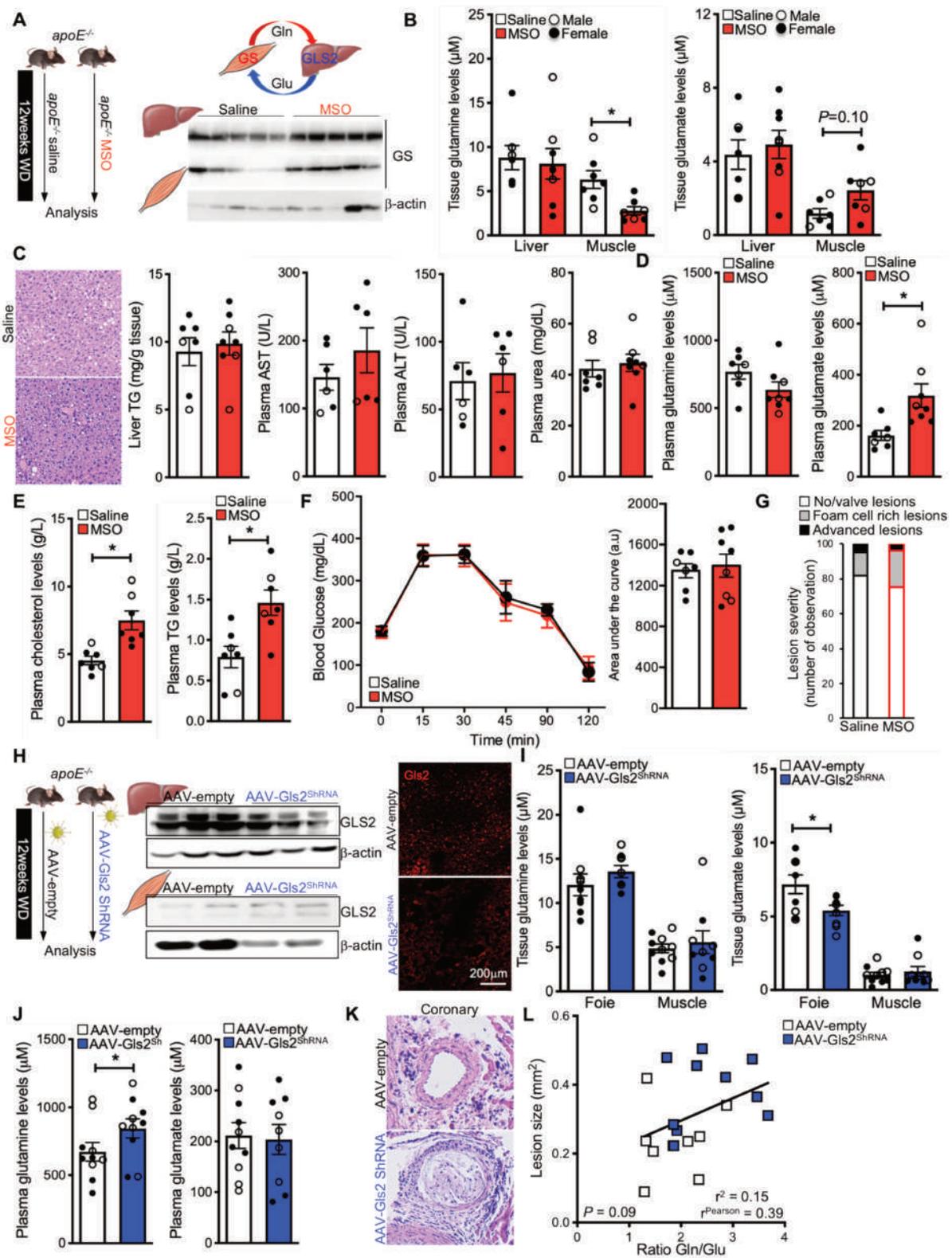
## **Table S2**

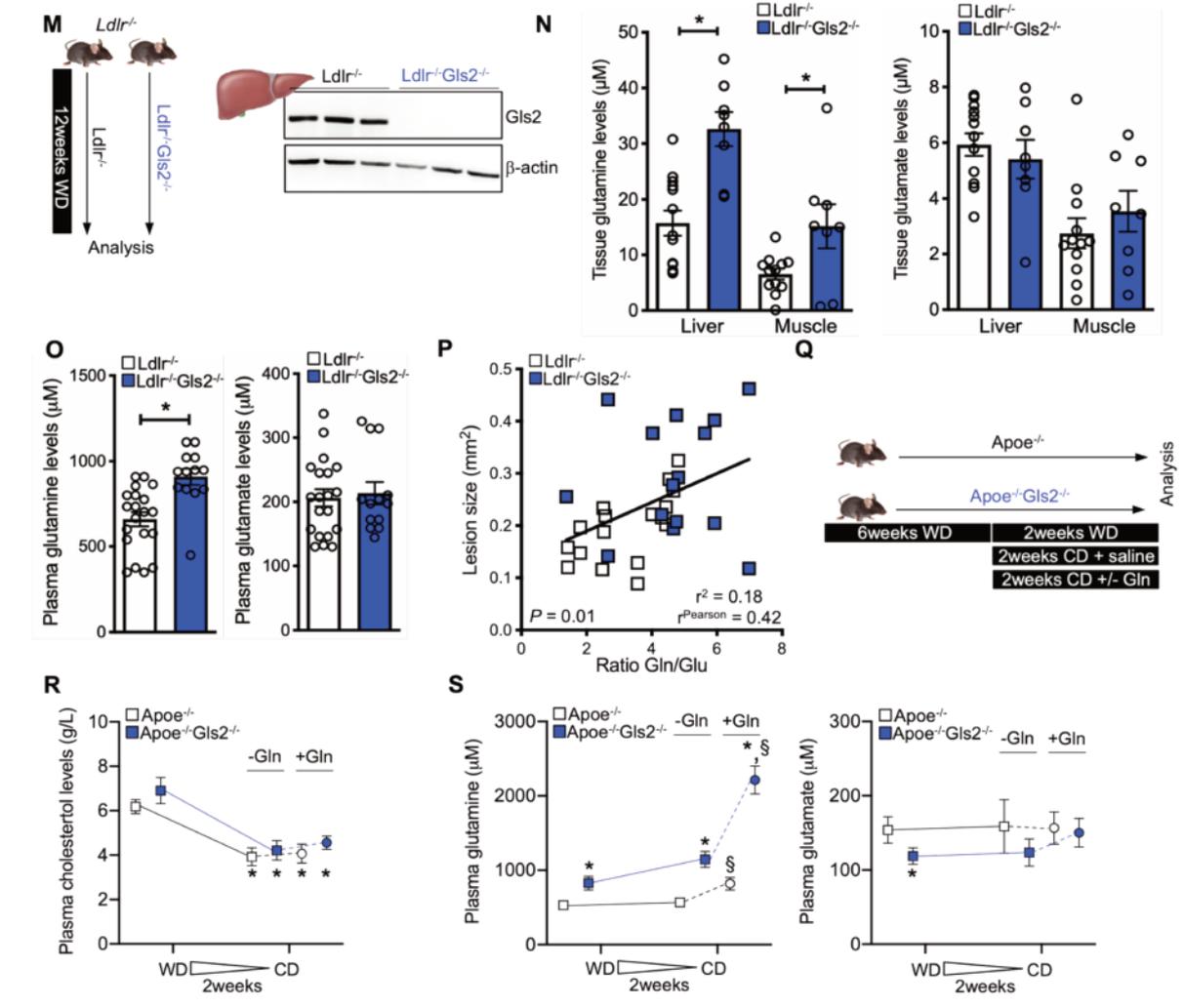
Outcome	Glutamine/Glutamate Ratio (Per unit increase)		Glutamine (Per unit increases)		Glutamate (Per unit increases)	
	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value
<b>CHD Only (N=586; Events=293)</b>						
Model 1	0.97 [0.92,1.02]	0.251	1.001 [0.999,1.002]	0.214	1.005 [1.000,1.009]	0.030
Model 2	0.97 [0.92,1.03]	0.336	1.000 [0.999,1.002]	0.622	1.003 [0.998,1.007]	0.260
Model 3 (N=892)	0.99 [0.92,1.06]	0.765	1.000 [0.998,1.001]	0.742	1.000 [0.995,1.005]	0.978
<b>Stroke Only (N=412; Events=206)</b>						
Model 1	0.91 [0.84,0.98]	0.020	1.000 [0.998,1.001]	0.693	1.004 [0.999,1.010]	0.135
Model 2	0.91 [0.83,0.99]	0.035	1.000 [0.998,1.002]	0.993	1.005 [0.999,1.011]	0.085
Model 3 (N=772)	0.89 [0.79,1.01]	0.080	1.001 [0.998,1.003]	0.489	1.008 [1.001,1.015]	0.027

**Table S2.** Conditional Logistic Regression Models for Incident Stroke and CHD Events Separately (OR and 95% CI per SD of plasma glutamine-to-glutamate ratio, glutamine and glutamate levels).

Model 1: adjusted for age, sex, race/ethnicity, body mass index, and site. Model 2: model covariates plus diabetes mellitus status, current smoking, total cholesterol, statin use, hypertension medication, and systolic blood pressure. Model 3: model 2 covariates plus pack-years smoking, alcohol use, intentional exercise, and Mediterranean diet. No. of subjects and events smaller than in model 1 and 2 because of missing data for covariates. CVD indicate cardiovascular disease; and OR, odds ratio.

# Figure S1

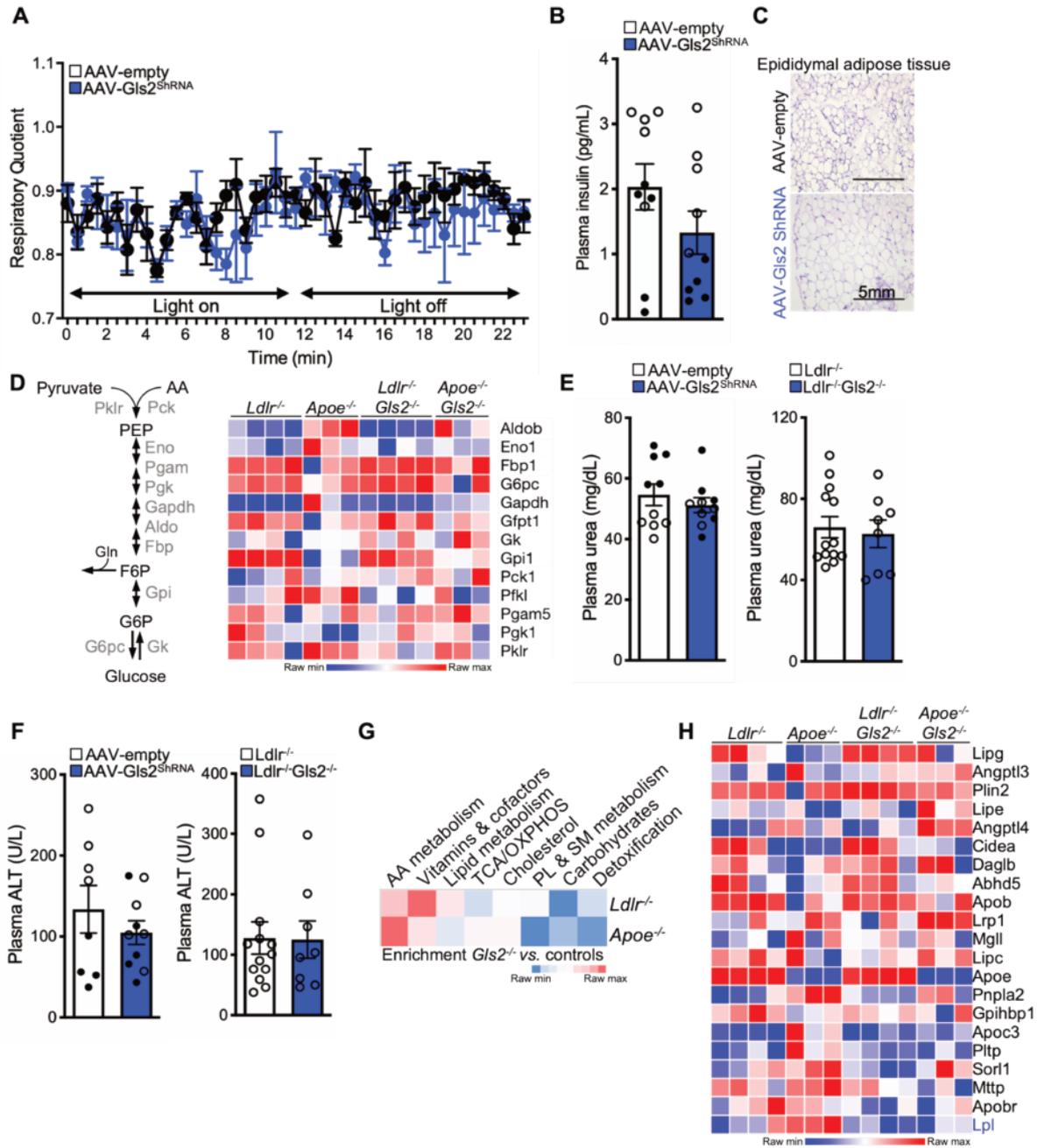




**Figure S1. Glutamine synthesis and hepatic glutaminolysis inversely regulate the whole-body glutamine-glutamate cycle.** Experimental outline. *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were fed an atherogenic diet (Western Diet, WD) for 12 weeks and daily *i.p.* injected with saline or 20mg/kg BW of methionine sulfoximine (MSO) (left panel). Schematic representation of whole-body glutamine-glutamate cycle (upper panel). Western blot of GS protein in the liver and muscle of these mice (lower right panel) (A). Liver and muscle glutamine (left panel) and glutamate (right panel) levels in these mice. Both sexes were analyzed (B). From left to right: H&E staining of paraffin-embedded serial sections obtained from the liver of these animals. Original magnification, ×200. Liver triglyceride (TG) content, plasma AST and ALT and urea levels (C). Plasma glutamine and glutamate levels (D) and cholesterol and TG (E) were also determined in these mice at the end of the study period. Glucose tolerance test was performed *i.p.* on saline or MSO treated atherogenic diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice. Blood glucose concentrations were measured at the indicate time points. The glucose tolerance index was calculated as the product of areas under glucose curves (F). Atherosclerotic lesion severity in the aortic root of saline or MSO treated atherogenic diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice (G). Experimental outline. *Apoe*<sup>-/-</sup> mice were infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> or AAV-empty controls and fed an atherogenic diet for 12 weeks (left panel). Western blot of GLS2 protein in the liver and muscle of these mice (middle panel). GLS2 was also visualized by immunofluorescent staining in the proximal aorta (right panel) (H). Tissue (I) and plasma (J) glutamine and glutamate levels in these mice. *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> developed coronary artery atherosclerosis as evidenced by representative H&E staining of paraffin-embedded serial sections (8 out of 10 animals with >60% occluded) (K). Correlation between

plasma GGR and lesion size in these mice (**L**). Experimental outline. *Ldlr*<sup>-/-</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice were fed an atherogenic diet for 12 weeks (left panel). Western blot of GLS2 protein in the liver of these mice (right panel) (**M**). Tissue (**N**) and plasma (**O**) glutamine and glutamate levels in these mice. Correlation between plasma GGR and lesion size in these mice (**P**). Experimental outline. *ApoE*<sup>-/-</sup> and *ApoE*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice were fed an atherogenic diet for 6 weeks and divided in three groups: 1) mice were continued on atherogenic diet for an additional 2 weeks; 2) which mice were switched to chow for 2 weeks and 3) mice were switched to a chow diet and orally supplemented with glutamine (3.5g/kg) for 2 weeks (**Q**). Plasma cholesterol (**R**) and glutamine and glutamate (**S**) levels in these animals. The data are given as the mean ± s.e.m. of at least one independent experiment (n = 5 to 13 independent animals). \**P* < 0.05 vs controls, determined by two-tailed Student's *t*-test.

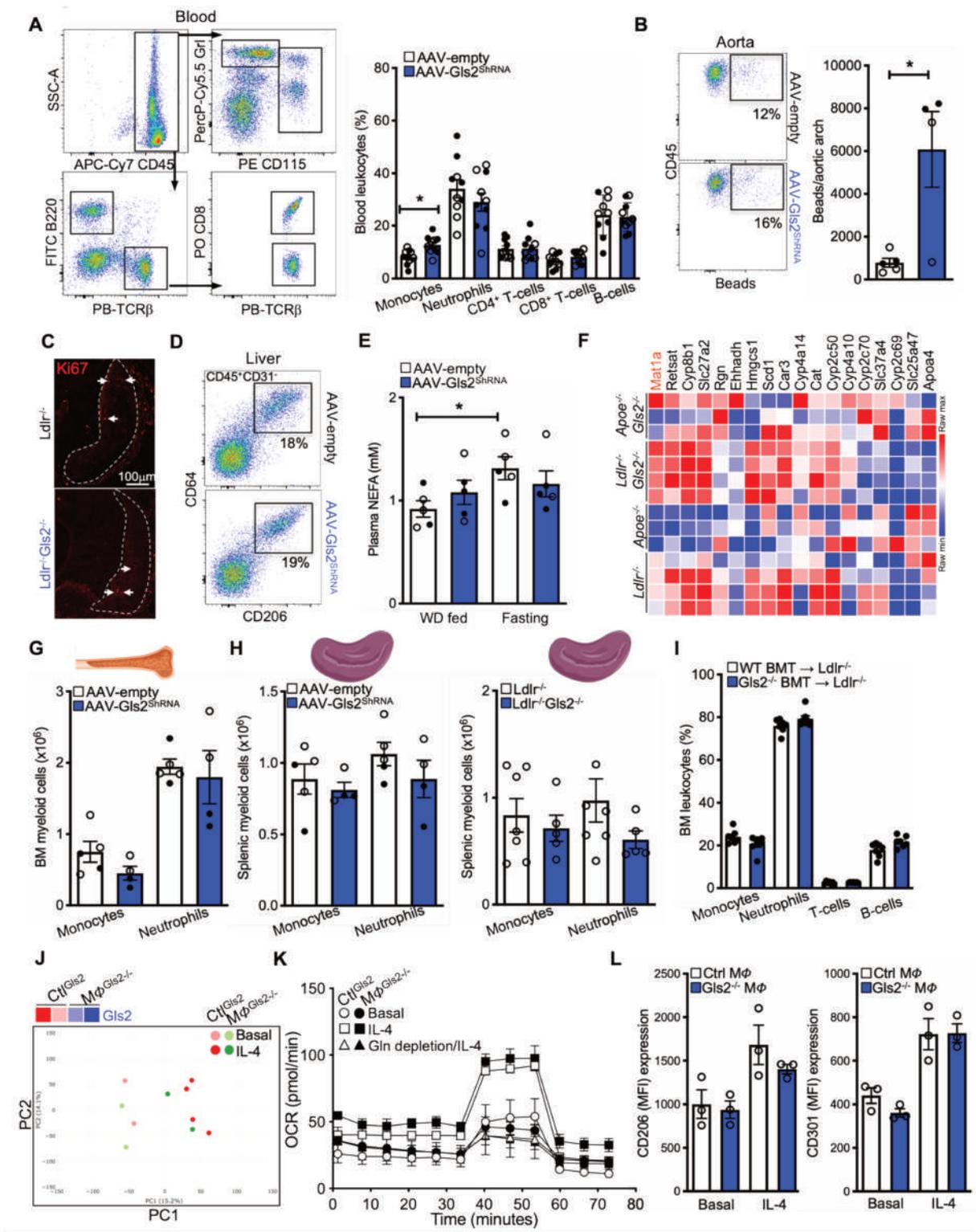
# Figure S2



**Figure S2. Effects of defective hepatic glutaminolysis on whole-body and hepatic metabolism.** Respiratory quotient (RQ) measured by indirect calorimetry in atherogenic diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> or AAV-empty controls (A). Plasma insulin levels were measured in atherogenic diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> or AAV-empty controls (B). Paraffin-embedded serial sections obtained from the adipose tissue of these mice. Representative H&E staining revealed similar cellularity (C). Schematic representation of glycolysis and neoglucogenesis pathways (left panel) and RNAseq analysis with focus on enzymatic regulators in the liver of *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice and their respective controls (right panel) (D). Plasma urea (E) and ALT (F) levels in *Apoe*<sup>-/-</sup> mice

infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> or *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice compared to respective controls. Pathway-enrichment analysis of RNA-seq profiling in the liver of *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> and *ApoE*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice. Pathways highlighted in red and blue indicated significant up- or downregulation, respectively (**G**). RNAseq analysis with focus on of genes involved in VLDL production and hydrolysis (**H**). All values are mean  $\pm$  s.e.m. and are representative of at least one independent experiment (n = 8 to 13 independent animals). *P* values were determined by two-tailed Student's *t*-test.

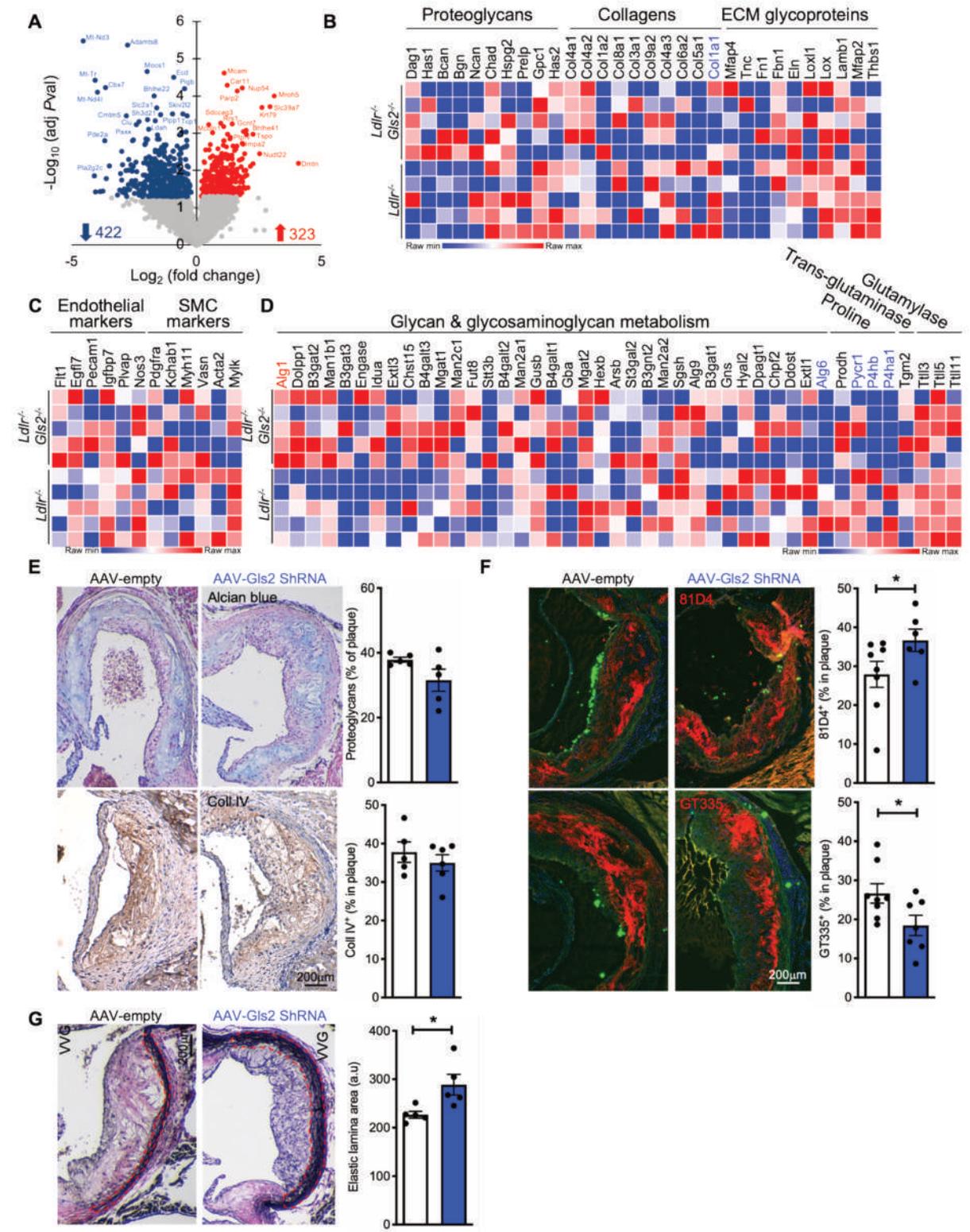
# Figure S3



**Figure S3. Characterization of myeloid cell homeostasis in *Gls2*-deficient mice.** Leukocyte population gating strategy (left) and percentage (right) measured by flow cytometry from the blood of atherogenic diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls2<sup>shRNA</sup> or AAV-empty controls (A). Representative FACS plots (left panel) and quantification (right

panel) of latex+ monocytes that have infiltrated the aortic arch of these mice **(B)**. Representative sections of aortic plaques from atherogenic diet-fed *Ldlr*<sup>-/-</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice stained for Ki67 **(C)**. Gating strategy of Kupffer cells measured by flow cytometry **(D)**. Plasma non-esterified fatty acid (NEFA) levels in atherogenic diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-*Gls2*<sup>shRNA</sup> or AAV-empty controls before and after 12 hours fasting **(E)**. RNAseq analysis with focus on the previously identified hepatic energy-sensing signature governing monocyte homeostasis (Jordan et al., 2019) in *Gls2*-deficient mice and controls on atherogenic *Ldlr*<sup>-/-</sup> and *Apoe*<sup>-/-</sup> background **(F)**. Quantification of myeloid cells in the bone marrow **(G)** and spleen **(H, left panel)** of atherogenic diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-*Gls2*<sup>shRNA</sup> or AAV-empty controls and in the spleen of atherogenic diet-fed *Ldlr*<sup>-/-</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice **(H, right panel)**. Bone marrow (BM) leukocyte analysis by flow cytometry in *Ldlr*<sup>-/-</sup> recipient mice transplanted with *Gls2*<sup>-/-</sup> or control BM at the end of the experiment **(I)**. The data are given as the mean ± s.e.m. of at least one independent experiment (n = 5 to 13 independent animals). \**P* < 0.05 vs controls, determined by two-tailed Student's *t*-test. Principal component analysis from RNAseq analysis of resting and reparative (IL-4 treatment) control and *Gls2*<sup>-/-</sup> bone marrow-derived macrophages **(J)**. Oxygen consumption rate (OCR) measurements measured by Seahorse resting and reparative control and *Gls2*<sup>-/-</sup> bone marrow-derived macrophages and after 4h glutamine (Gln) deprivation **(K)**. CD206 and CD301 expression by flow cytometry in these macrophages **(L)**. The in vitro data are representative of experiments of at least two biologically independent replicates.

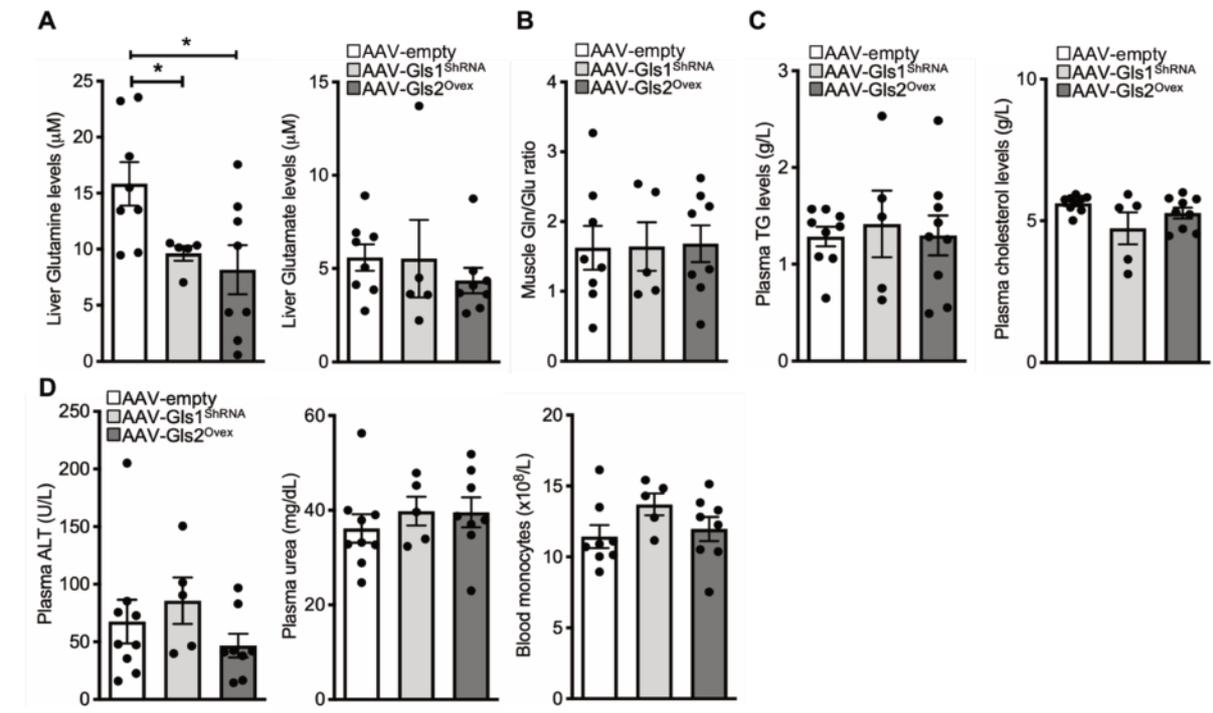
**Figure S4**



**Figure S4.** Regulation of extracellular matrix by defective hepatic glutaminolysis. Volcano plot of differentially expressed genes (up, red and down, blue) between *Ldlr*<sup>-/-</sup> and

*Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> aortas **(A)**. RNAseq analysis with focus on genes involved in extracellular matrix composition **(B)**, cellular markers **(C)** and KEGG glycan and glycosaminoglycan metabolism **(D)** in the aorta of atherogenic diet-fed *Ldlr*<sup>-/-</sup> and *Ldlr*<sup>-/-</sup>*Gls2*<sup>-/-</sup> mice. Alcian blue (upper panel) and Collagen IV (CollIV, lower panel) stainings in the proximal aorta of atherogenic diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-*Gls2*<sup>shRNA</sup> or AAV-empty controls. Original magnification, ×200 **(E)**. Immunofluorescent staining and quantification of cross-linked proteins by N<sup>ε</sup>-(γ-L-glutamyl)-L-lysine (81D4, upper panel) and polyglutamylation (GT335, lower panel) in the atherosclerotic lesions of these mice. Original magnification, ×200 **(F)**. Verhoeff-Van Gieson (VVG) staining and quantification of elastic lamina area (expressed as arbitrary unit, a.u) in the proximal aorta of atherogenic diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-*Gls2*<sup>shRNA</sup> or AAV-empty controls. Original magnification, ×200 **(G)**. The data are given as the mean ± s.e.m. of at least one independent experiment (n = 5 independent animals). \**P* < 0.05 vs controls, determined by two-tailed Student's *t*-test.

## Figure S5



**Figure S5. Effects of modulating GLS activities on metabolic risk factors.** Liver glutamine (left panel) and glutamate (right panel) levels in atherogenic diet-fed *Apoe*<sup>-/-</sup> mice infected with the AAV-Gls1<sup>shRNA</sup>, AAV-Gls2<sup>Ovex</sup> or AAV-empty controls (**A**). Muscle GGR in these mice (**B**). Plasma TG (left panel) and cholesterol (right panel) in these mice (**C**). Plasma ALT and urea levels (left panel) and blood monocyte counts (right panel) were also determined in these animals (**D**). The data are given as the mean  $\pm$  s.e.m. of at least one independent experiment ( $n = 5$  independent animals). \* $P < 0.05$  vs controls, determined by two-tailed Student's *t*-test.

## Material and Methods

### KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Experimental Models : Organisms/Strains		
ApoE <sup>-/-</sup> mice	Jackson Laboratory	002052 RRID:IMSR_JAX:00 2052
Gls2 <sup>-/-</sup> mice	Taconic Biosciences	TF1747
Ldlr <sup>-/-</sup> mice	Jackson laboratory	002207 RRID:IMSR_JAX:002207
Viral Vectors		
scAAV8-GLS1 <sup>shRNA</sup>	VectorBuilder	VB211130-1096zhw
scAAV8-GLS2 <sup>mRNA</sup>	VectorBuilder	VB211130-1097vbk
scAAV8-GLS2 <sup>shRNA</sup>	VectorBuilder	VB191129-2683sqs
scAAV8-scramble	VectorBuilder	VB190708-1058bsm
Diet		
Chow diet	SAFE	A04
Western diet	Ssniff	TD88137
Chemicals, peptides, recombinant proteins, kits		
ALT kit	Mindray	ALT 0102
Antimycin	Sigma	A8674
AST kit	Mindray	AST0102
BD Pharm Lyse <sup>TM</sup>	BD	555899
Blue Alcian Solution	Sigma	1016470500
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma	A7030
Cholesterol kit	SOBIODA	W1W635-50981

Clodronate liposomes	Liposoma	C-010
Collagenase D	Sigma	11088882001
Cytokines (U-Plex metabolic group 1 (ms) assay, SECTOR (1 PL)	Meso Scale Discovery	K152ACL-1
D-(+)-Glucose	Sigma	G7021
DAPI	Sigma	D9542
Elastic Stain Kit	Abcam	ab150667
Eosin	Diapath	C0363
FCCP	Sigma	C2920
Fluoresbrite® YG Microspheres 1.00µm	Polysciences	17154-10
Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay	Promega	J8022
Hematoxylin Solution	Sigma	HHS32
HRP substrate	Sigma	WBKLS0500
IHC antigen retrieval solution	Thermo Fisher Scientific	00-4955-58
IL-4	Peprotech	200-04
ImmunoHisto Mount™	Sigma	I1161
L-glutamine	Sigma	G8540
L-Methionine sulfoximine	Sigma	M5379
NEFA kit	Fujifilm Wako	W1W436-91995
Oil Red O	Sigma	O0625
Oligomycin	Sigma	75351
PBS 1X	FISHER SCIENTIFIC	14190169
PFA 4%	VWR International	9713.1000
Pierce BCA Protein assay kit	Fisher Scientific	23225

protease inhibitor cocktail	Sigma	P8340
RIPA Lysis Buffer, 10X	Sigma	20-188
RNAprotect Tissue Reagent	QIAGEN	76104
RNeasy Mini Kit (50)	QIAGEN	74104
Rotenone	Sigma	R8875
Tissue-Tek OCT Compound	Sakura	4583
Triglycerides FS kit	EUROBIO SCIENTIFIC	157109910021
Tween-20	EUROMEDEX	2001-B
Ultra Sensitive Mouse Insulin ELISA Kit	CrystalChem	90080
Urea kit	Mindray	URE0102
VECTASTAIN EL ABC	EUROBIO SCIENTIFIC	PK-4001
<b>Antibodies</b>		
Alpha-Smooth Muscle Actin Monoclonal Antibody (1A4)	Fisher Scientific	14-9760-82 <b>RRID:AB_2572996</b>
Anti-CD68 (clone FA-11)	Bio-Rad	MCA1957 <b>RRID:AB_322219</b>
Anti-Collagen IV antibody	Abcam	ab6586 <b>RRID:AB_305584</b>
Anti-GLS2 antibody	Abcam	ab150474
Anti-Oxidized phospholipid [E06]	CLINISCIENCES	Ab02746-1.1
Anti-Polyglutamylation Modification mAb (GT335)	Coger	AG-20B-0020-C100
BD Horizon™ CD8a V500	BD Biosciences	560776 <b>RRID:AB_1937317</b>
Brilliant Violet 421™ anti-mouse CD64 (FcγRI) Antibody	Biolegend	139309 <b>RRID:AB_2562694</b>
CD115 Antibody, anti-mouse, PE, REAfinity	MILTENYI	130-112-639 <b>RRID:AB_2654553</b>
CD301 Ab AF488	BIO-RAD ABD SEROTEC	MCA2392A488 <b>RRID:AB_872011</b>
CD31 (PECAM-1) Monoclonal Antibody (390), eBioscience™	ThermoFisher	14-0311-82 <b>RRID:AB_467201</b>
CD45-APC-Vio770 mouse	MILTENYI	130-110-662 <b>RRID:AB_2658231</b>

Cy <sup>TM</sup> 3 Goat Anti mouse	Jackson Immuno Research	115-165-003 <b>RRID:</b> AB_2338680
Cy <sup>TM</sup> 3 Goat Anti rabbit	Jackson Immuno Research	111-166-003 <b>RRID:</b> AB_2338007
Cy <sup>TM</sup> 3 Mouse Anti rat	Jackson Immuno Research	212-165-104 <b>RRID:</b> AB_2339211
FITC anti-mouse CD45R/B220	Biologend	103206 <b>RRID:</b> AB_312991
Ki-67 Polyclonal Antibody	ThermoScientific	PA5-19462 <b>RRID:</b> AB_10981523
Nε-(Y-L-Glutamyl)-L-Lysine Isopeptide Antibody (81D4)	Covalab	00012721
Pacific Blue <sup>TM</sup> anti-mouse TCR β chain Antibody	Biologend	109226 <b>RRID:</b> AB_1027649
PerCP anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1)	Biologend	108426 <b>RRID:</b> AB_893557
PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD206 (MMR)	Biologend	141715 <b>RRID:</b> AB_2561991
Software, algorithm and material		
BD FACSCantoll <sup>TM</sup> Flow Cytometer	BD Biosciences	N.A.
FlowJo	Tree Star	N.A.
ImageJ	NIH	N.A.
Phantasus	<a href="https://artyomovlab.wustl.edu/phantasus/">https://artyomovlab.wustl.edu/phantasus/</a>	N.A.
Prism8	GraphPad	N.A.

**Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA).** Study participants, baseline measures, cardiovascular events and carotid ultrasound imaging were as we previously described (Shea et al., 2019).

**Plasma glutamine-to-glutamate ratio (GGR) measurements.** Commercially available kits Glutamine/Glutamate-Glo<sup>TM</sup> Assay (Promega) were used in accordance with the manufacturer's instructions. These measurements were performed at Inserm in a completely blinded fashion and data transmitted to the University of Washington for unblinding.

**Statistical analysis.** Cases, defined as participants who had an incident CVD event between exams 1 and 5, were matched by age (5-year intervals) and sex to controls, defined as those who did not have a CVD event (cohort 1). Controls were required to have at least as much event-free follow-up time as cases. Similarly, cases with carotid plaque progression were matched by the same factors to controls, defined as participants who did not have any increase in carotid plaque score between MESA exams 1 and 5 (cohort 2). All CVD cases were used. Conditional logistic regression models were used to examine the relationship between plasma glutamine or glutamate levels and GGR and case-control status. A series of staged models were used to control for potential confounders. Model 1 adjusted for age, sex, race/ethnicity, body mass index, and study site. Model 2 additionally adjusted for diabetes

mellitus, current smoking, total and HDL cholesterol, statin and antihypertensive medication use, and systolic blood pressure. Model 3 additionally adjusted for pack-years of smoking, alcohol use, intentional exercise, and Mediterranean diet score (Shea et al., 2019).

**Mice.** *Gls2*<sup>-/-</sup> mice were generated by Taconic Biosciences (Cryopreserved-Tyr<sup>c-Brd</sup>) and have been crossed to atherogenic *Ldlr*<sup>-/-</sup> (B6.129S7-Ldlr<sup>tm1Her/J</sup>) or *ApoE*<sup>-/-</sup> (B6.129P2-ApoEtm1Unc/J) animals. For each experiment, co-housed littermate controls were used. For each experiment, co-housed littermate male and female controls were used between eight and fourteen weeks of age. Animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the French Ministry of Higher Education and Research and the Mediterranean Center of Molecular Medicine (Inserm U1065) and were undertaken in accordance with the European Guidelines for Care and Use of Experimental Animals. Animals had free access to food (chow diet A04, Safe<sup>R</sup>) and water and were housed in a controlled environment with a 12-hour light–dark cycle, constant temperature (21.7–22.8°C) and relative humidity (50–60%). Water and cages were autoclaved. Cages were changed once weekly, and the health status of the mice was monitored using a dirty bedding sentinel program. Hyperlipidemia was induced by feeding the mice with an atherogenic diet (Western diet, TD88137, Ssniff) for 6 to 12 weeks as indicated in the figure legends.

**Treatments.** Ultra-purified scAAV8 viruses used in this study (AAV-empty, AAV-Gls2shRNA, AAV-Gls1shRNA, AAV-Gls2Ovex) were all from VectorBuilder Incorporation (IDs : VB191129-2683sqs, VB211130-1097vbk, VB211130-1096zhw, VB190708-1058bsm). Briefly, shRNA targeting the mouse GLS1 and GLS2 gene were created with the 48 bp sequences  
ATACTGGACCTACCCTATTAT and  
GTGGTCAAAGTCTTCAAGATCTCGAGATCTTGAAGCAGTTTGACCAC under the U6 promoter in a dedicated scAAV vector. mRNA expressing GLS2 after a CMV promoter was based on the gene reference mGls2[NM\_001033264.3]. The viral vectors were *i.p.* injected at the dose of 3.10<sup>11</sup> GC per animal and incubated for 2 weeks before the beginning of experiments. Scramble sequence was based on the 48 bp sequence CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCGCTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGG targeting no mouse or human gene. Atherosclerosis was induced by feeding the mice with an atherogenic diet (Western diet, TD88137, Ssniff) for 6 to 12 weeks as indicated in the figure legends. For the glutamine supplementation (Sigma-G8540) experiment, mice were supplemented with glutamine dissolved in their drinking water (3g/dL of drinking water). GS inhibition was induced by methionine sulfoximine (Sigma-M5379) dissolved in sterile PBS and *i.p.* injected every two days during 12 weeks at the dose of 20mg/kg

**Bone marrow transplantation.** Bone marrow transplantation was performed as previously described (Merlin et al., 2021). Briefly, 12-week–old female *Ldlr*<sup>-/-</sup> recipient mice were irradiated 16h before transplantation. Then, they were *i.v.* injected with 4.10<sup>6</sup> bone marrow cells from *Gls2*<sup>-/-</sup> or *Gls2*<sup>+/+</sup> mice. Mice were then allowed to recover for five weeks before feeding them fed an atherogenic diet (Western diet, TD88137, Ssniff) for 10 weeks.

**Calorimetry.** *In vivo* indirect open circuit calorimetry was performed in metabolic chambers using the Labmaster system (TSE-Systems, Bad Homburg, Germany). The animals were randomly and alternatively placed into experimental chambers at 25°C ± 1 with free access to food and water. Constant airflow (0.5 l/min) was drawn through the chamber and monitored by a mass-sensitive flowmeter. To calculate oxygen consumption (VO<sub>2</sub>), carbon dioxide production (VCO<sub>2</sub>), and respiratory quotient (RQ: ratio of VCO<sub>2</sub> to VO<sub>2</sub>), gas concentrations were monitored at the inlet and outlet of the scaled chambers. Data were collected after 24 hours of adaptation in acclimated singly housed mice.

**Glucose tolerance test.** Mice were fasted for 12 hours and then injected *i.p.* with D-Glucose (2g/kg body weight) Blood samples were collected at different times (0, 15, 30, 45, 90 and 120 min) by tail bleeding after injection. Blood glucose was measured with Optium Xceed

Glucometer (Abbott). Graphical representations were generated and the area under the curve for each animal was calculated using GraphPad Prism 8 software.

**Monocyte labeling and tracking in vivo.** Mononuclear cells were first transiently depleted by *i.v.* injection of 200 $\mu$ l clodronate-loaded liposomes (Liposoma-C010) and 2 days later, classical Ly6C<sup>hi</sup> monocytes were labeled *in vivo* by retro-orbital *i.v.* injection of 1 $\mu$ m Fluoresbrite green fluorescent (YG) plain microspheres (17154-10, Polysciences Inc.), diluted 1:4 in 150 $\mu$ l sterile PBS. Labelling efficiency (i.e, engulfment of latex beads) was verified in peripheral monocytes by flow cytometry 1 day after labeling and 2 days later, mice were sacrificed and the heart and aorta were perfused and isolated. Histological analysis of proximal aortas was performed as described above in a blinded manner and the mean number of latex<sup>+</sup> cells per section was determined. Nuclei were revealed with DAPI staining. Aortic arches were subjected to enzymatic digestion with a mix of collagenases I and XI (450 and 125 U/mL, respectively) and prepared for flow cytometry analysis of latex<sup>+</sup> cells per aortic arch.

**Blood leukocytes.** Leukocytes were quantified from whole blood using a hematology cell counter (Hemavet, Beckman Coulter). For identification of peripheral blood leukocytes, 100  $\mu$ L of blood was collected into EDTA tubes before red blood cell lysis (BD Pharm Lyse; BD Biosciences), filtration, and staining for 30 minutes on ice. Cells were stained with a cocktail of antibodies against CD45, Ly6C/G, CD115, B220, TCR- $\beta$ , and CD8 as previously described (Merlin et al., 2021). Briefly, monocytes were identified as CD45<sup>+</sup>CD115<sup>+</sup>, neutrophils as CD45<sup>+</sup>CD115<sup>-</sup>Ly6C/G<sup>hi</sup>, B-lymphocytes as CD45<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>, T-lymphocytes as CD45<sup>+</sup>TCR- $\beta$ <sup>+</sup> and further subdivided into CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup>Ly6C/G<sup>+</sup> subsets. The following antibodies were used: CD45 APC-Cy7 conjugated (clone 30-F11, BD Biosciences), CD11b Brilliant Violet 510 conjugated (clone M1/70, BioLegend), CD115 PE conjugated (clone AFS98, eBioscience), BD Horizon™ CD8a V500 (BD Biosciences, clone 53-6.7), FITC anti-mouse CD45R/B220 (Biolegend, clone RA3-6B2), Pacific Blue™ anti-mouse TCR  $\beta$  chain Antibody (Biolegend, clone H57-597), PerCP anti-Gr1 (Biolegend, clone RB6-8C5).

**In vivo flow cytometry analysis.** Cells were collected from bone marrow, spleen and liver. Tissues were collected after cardiac PBS perfusion. Bone marrow leukocytes were harvested by PBS lavage. Splenocytes were extracted by pressing spleens through a stainless-steel grid. Liver and brain were cut in small piece and digested for 30min with HBSS medium containing 1,5mg/mL collagenase D (Sigma-11088882001) at 37°C. Single-cell suspension was submitted to red blood cell lysis, filtration, and centrifugation for 5min at 400 g. Cell suspensions were stained with the appropriate antibodies for 30min on ice protected from light. The following antibodies were used for macrophage flow cytometric analysis: Brilliant Violet 421™ anti-mouse CD64 (Fc $\gamma$ RI) Antibody (MILTENYI, clone X54-5/7.1), CD45-APC-Vio770 mouse (MILTENYI, clone REA737), CD31 (PECAM-1) Monoclonal Antibody eBioscience™ (ThermoFisher, clone 390), PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD206 (Biolegend, clone C068C2). Cells were then washed, centrifuged and data were acquired on BDFACSCanto flow cytometer. Data collection was performed using FACS DIVA software and analysis was performed using FlowJo software (Tree Star) as described above.

**Plasma biochemical parameters.** Plasma multi-analyte profiling was performed using a clinical chemistry analyzer (Mindray BS-240 Pro, BioSentec) with the following colorimetric kits: alanine aminotransferase (ALT-0102), aspartate aminotransferase (AST0102), urea (URE0102), all from Mindray.

**Plasma cholesterol, triglyceride and NEFA content.** Plasma cholesterol and triglyceride content were measured with LabAssay™ Cholesterol (Sobioda), Triglycerides Reagent (Diasys) and NEFA-KR kit (Fujifilm Wako) according to the manufacturer's protocol.

**Cytokines level measurements.** Cytokines levels were measured by U-Plex platform with cytokines from U-Plex metabolic group 1 (ms) assay (MSD).

**Glutamine/glutamate measurements.** Tissues and plasma were harvested and a commercially available Glutamine/Glutamate-Glo™ Assay kit (Promega- J8022) was used to measure glutamine and glutamate levels in accordance with the manufacturer's instructions.

**Histology.** Mice were sacrificed and tissues were excised and fixed in 4% paraformaldehyde for paraffin sections. For cryostat sections, tissues were successively placed in 15% and 30% sucrose solution during 12h. 7µm paraffin sections or 10µm cryo-sections were performed using a HM340E microtome (Microm Microtech, Francheville France) or Leica CM3050S, respectively.

**Immunofluorescence.** Samples were blocked 1 hour in PBS containing 10% normal goat serum. Then they were incubated with primary antibodies overnight at 4°C. The secondary antibody was added at room temperature for 1 hour before revelation. Nuclei were revealed with DAPI counterstaining (2µg/ml). Slides were covered with aqueous mounting medium (Sigma-I1161). Sections were observed the following day by fluorescent microscopy

**Immunohistochemistry.** Paraffin embedded sections were de-paraffinized and rehydrated by washes in 100% xylene, 100% ethanol, 95% ethanol, 70% ethanol, 50% ethanol, water and phosphate-buffered saline (PBS). Heat induced antigen retrieval solution was carried out by IHC antigen retrieval solution (Thermo Fisher Scientific-00-4955-58) and then washed in PBS. Sections were blocked for 1 hour in PBS containing 10% normal goat serum and incubated with primary antibodies overnight at 4°C. The secondary biotinylated antibody was added at room temperature for 1 hour.

**Analysis of atherosclerotic plaque.** Mice were sacrificed and slowly perfused with 10ml of ice-cold PBS. The hearts and aortas were carefully excised. Some aorta samples were stored in -80°C before further analysis or placed in PBS and dissected then stained with Oil Red O (Sigma-O0625) to evaluate plaque content. The hearts were either embedded in paraffin to analyze tissue architecture in a H&E staining or in OCT compound (Sakura) and stored at - 80°C before immunohisto or immunofluorescence analysis. 7µm paraffin sections or 10µm cryo-sections of the aortic sinus were prepared. Colorations and antibodies used on the plaque sections are the following ones: Alcian Blue solution (Sigma-1016470500), Elastic Stain kit (Abcam-ab150667), anti-CD68 (Bio-Rad-MCA1957), anti-col IV (abcam-ab6586), anti-E06 (clinisciences-Ab02746-1.1), GT335 (Coger- AG-20B-0020-C100), Anti-Ki67 (Thermoscientific-PA5-19462), 81D4 (00012721). Nuclei were revealed with DAPI counterstaining (2 µg ml<sup>-1</sup>). ImageJ was used for immunofluorescence, immunohistochemistry quantifications and lesion area calculations.

**Western Blotting.** Tissues stored at -80°C were lysed in RIPA buffer containing protease inhibitors cocktail (Sigma-P8340) and homogenized before centrifugation at 20 000g for 10min at 4°C. Supernatants were sampled and later used for western blotting. Protein content was evaluated using Pierce™ BCA assay kit (ThermoFisher), denatured and resolved on 10% SDS-PAGE gels. They were transferred onto nitrocellulose membrane using a wet transfer system. Membranes were blocked in 5% (w/v) BSA in Tris- buffered saline-Tween for one hour at room temperature. Membranes were then incubated with primary antibody (anti GLS2 antibody, ab150474, abcam) followed by the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Anti α-actin mAb (Santa Cruz) was used as loading control. Proteins were detected by HRP substrate (Sigma- WBKLS0500). Antibody validations were performed by suppliers and antibodies were used according to manufacturer's instructions.

**Cell culture.** BM cells were harvested from mouse femur and tibia and differentiated in the presence of recombinant mouse M-CSF (20 ng/ml; Miltenyi) in complete RPMI 1640 medium (Corning) containing 10mM glucose, 2mM L-glutamine, 100U/ml of penicillin/streptomycin, and 10% FBS for 7 days at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. At day 7 BMDMs were incubated overnight with IL-4 (20ng/mL, Peprotech).

**Seahorse extracellular flux analysis.** For extracellular flux assay,  $1 \times 10^5$  BMDMs were plated in a Seahorse Bioscience culture plate. Cells were then incubated overnight with different drugs and metabolites. OCR was measured by an XF96 Seahorse Extracellular Flux Analyzer following the manufacturer's instruction. In the seahorse assay, cells were treated with oligomycin (1 $\mu$ M), FCCP (1.5 $\mu$ M), rotenone (1 $\mu$ M) and antimycin A (0.1 $\mu$ M). ATP production is measured after injection of oligomycin and calculated using the Seahorse XF report generator. Each condition was performed in 3 replicates.

**In vitro flow cytometry analysis.** Cells were stained for 25 min at 4°C protected from light. For flow cytometry analysis the following list of antibodies was used: CD206 PerCp-Cy5.5 conjugated (clone C068C2, BioLegend), CD301 FITC conjugated (clone ER-MP23, Bio-Rad). Antibody validations were performed by suppliers and antibodies were used according to manufacturer's instructions. Cells were then washed, centrifuged and data were acquired on BDFACSCanto flow cytometer. FSC/SSC gating was used to exclude dead cells and debris followed by FSCA/FSCH to select singlets. Gating strategy for all viable cells have been described in the manuscript. Data collection was performed using FACS DIVA software and analysis was performed using FlowJo software (Tree Star).

**RNAseq.** Tissues were harvested and stored in -80°C in RNAlater tissue reagent (Qiagen). BMDMs were obtained by lavage as described above. Total RNA was extracted with RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and quality was assessed by Nanodrop (Ozyme). Library constructions were conducted and sequenced at BGI Hong Kong Company Limited using a DNBseq™ platform.

**Integrated network analyses.** Up and down regulated metabolic genes based on p values calculated with Phantasus Network-based integration of metabolite and gene expression datasets was conducted using Shiny Gam as previously described (Jha et al., 2015).

**Statistics.** Data are expressed as mean $\pm$  s.e.m. Statistical analysis was performed using a 2-tailed t test with GraphPad Prism software. A *P* value < 0.05 was considered as statistically significant.

**Data Availability.** The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Raw and processed sequencing are deposited to PubMed GEO under GSExxxx.

**Acknowledgments.** We thank Dr Frédéric Labret for assistance with flow cytometry, Dr. Marie Irondelle for assistance with confocal microscopy and C3M and CDTA animal facilities. This work was supported by grants from the European Research Council (ERC) consolidator program (ERC2016COG724838), ANR (19-CE17-0030-DS) and the Fondation de France (FDF) to L.Y.C.

**Author Contributions.** L.Y.-C. conceived the project, designed the experiments, and wrote the manuscript. F.M. performed most of the molecular, histological, and *in vivo* experiments. N.V. helped with the experimental design, supported most of the histological experiments and assisted with the data analysis. J.M. helped with analysis of human studies. A.C. and F.L. helped with maintenance of mouse colonies. E.L.G. and B.B.M. provided scientific advice and helped with the experimental design. A.R.T. and S.S. supervised the human study, assisted with the data analysis and provided intellectual discussion. L.Y.-C. also

designed and supervised the study and obtained funding. All of the authors read, edited, and approved the manuscript.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Breslow, J. L. (1996). Mouse Models of Atherosclerosis. *Science*, 272(5262), 685-688.
- CARDIoGRAM, Suhre, K., Shin, S.-Y., Petersen, A.-K., Mohny, R. P., Meredith, D., Wägele, B., Altmaier, E., Deloukas, P., Erdmann, J., Grundberg, E., Hammond, C. J., de Angelis, M. H., Kastenmüller, G., Köttgen, A., Kronenberg, F., Mangino, M., Meisinger, C., Meitinger, T., ... Gieger, C. (2011). Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature*, 477(7362), 54-60.
- Chang, M.-K., Bergmark, C., Laurila, A., Hörkkö, S., Han, K.-H., Friedman, P., Dennis, E. A., & Witztum, J. L. (1999). Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: Evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6353-6358.
- Chen, S., Ma, J., Chi, J., Zhang, B., Zheng, X., Chen, J., & Liu, J. (2022). Roles and potential clinical implications of tissue transglutaminase in cardiovascular diseases. *Pharmacological Research*, 177, 106085.
- Cheng, S., Rhee, E. P., Larson, M. G., Lewis, G. D., McCabe, E. L., Shen, D., Palma, M. J., Roberts, L. D., Dejam, A., Souza, A. L., Deik, A. A., Magnusson, M., Fox, C. S., O'Donnell, C. J., Vasan, R. S., Melander, O., Clish, C. B., Gerszten, R. E., & Wang, T. J. (2012). Metabolite Profiling Identifies Pathways Associated With Metabolic Risk in Humans. *Circulation*, 125(18), 2222-2231.
- DeBerardinis, R. J., & Cheng, T. (2010). Q's next: The diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*, 29(3), 313-324.
- Durante, W. (2019). The Emerging Role of L-Glutamine in Cardiovascular Health and Disease. *Nutrients*, 11(9), 2092.
- Eckel, R. H., Bornfeldt, K. E., & Goldberg, I. J. (2021). Cardiovascular disease in diabetes, beyond glucose. *Cell Metabolism*, 33(8), 1519-1545.
- Eelen, G., Dubois, C., Cantelmo, A. R., Goveia, J., Brüning, U., DeRan, M., Jarugumilli, G., van Rijssel, J., Saladino, G., Comitani, F., Zecchin, A., Rocha, S., Chen, R., Huang, H., Vandekeere, S., Kalucka, J., Lange, C., Morales-Rodriguez, F., Cruys, B., ... Carmeliet, P. (2018). Role of glutamine synthetase in angiogenesis beyond glutamine synthesis. *Nature*, 561(7721), 63-69.
- Fuller, M., Dadoo, O., Serkis, V., Abutouk, D., MacDonald, M., Dhingani, N., Macri, J., Igdoura, S. A., & Trigatti, B. L. (2014). The Effects of Diet on Occlusive Coronary Artery Atherosclerosis and Myocardial Infarction in Scavenger Receptor Class B, Type 1/Low-Density Lipoprotein Receptor Double Knockout Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(11), 2394-2403.
- Ganda, A., Magnusson, M., Yvan-Charvet, L., Hedblad, B., Engström, G., Ai, D., Wang, T. J., Gerszten, R. E., Melander, O., & Tall, A. R. (2013). Mild Renal Dysfunction and Metabolites Tied to Low HDL Cholesterol Are Associated With Monocytosis and Atherosclerosis. *Circulation*, 127(9), 988-996.
- Goldberg, I. J., Cabodevilla, A. G., Samovski, D., Cifarelli, V., Basu, D., & Abumrad, N. A. (2021). Lipolytic enzymes and free fatty acids at the endothelial interface. *Atherosclerosis*, 329, 1-8.

Janke, C., & Chloë Bulinski, J. (2011). Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: Mechanisms and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(12), 773-786.

Jha, A. K., Huang, S. C.-C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., Chmielewski, K., Stewart, K. M., Ashall, J., Everts, B., Pearce, E. J., Driggers, E. M., & Artyomov, M. N. (2015). Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization. *Immunity*, 42(3), 419-430.

Jordan, S., Tung, N., Casanova-Acebes, M., Chang, C., Cantoni, C., Zhang, D., Wirtz, T. H., Naik, S., Rose, S. A., Brocker, C. N., Gainullina, A., Hornburg, D., Horng, S., Maier, B. B., Cravedi, P., LeRoith, D., Gonzalez, F. J., Meissner, F., Ochando, J., ... Merad, M. (2019). Dietary Intake Regulates the Circulating Inflammatory Monocyte Pool. *Cell*, 178(5), 1102-1114.e17.

Karna, E., Szoka, L., Huynh, T. Y. L., & Palka, J. A. (2020). Proline-dependent regulation of collagen metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(10), 1911-1918.

Kessler, T., Vilne, B., & Schunkert, H. (2016). The impact of genome-wide association studies on the pathophysiology and therapy of cardiovascular disease. *EMBO Molecular Medicine*, 8(7), 688-701.

Kettunen, J., Tukiainen, T., Sarin, A.-P., Ortega-Alonso, A., Tikkanen, E., Lyytikäinen, L.-P., Kangas, A. J., Soininen, P., Würtz, P., Silander, K., Dick, D. M., Rose, R. J., Savolainen, M. J., Viikari, J., Kähönen, M., Lehtimäki, T., Pietiläinen, K. H., Inouye, M., McCarthy, M. I., ... Ripatti, S. (2012). Genome-wide association study identifies multiple loci influencing human serum metabolite levels. *Nature Genetics*, 44(3), 269-276.

Lorand, L., & Graham, R. M. (2003). Transglutaminases: Crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(2), 140-156.

Ma, W., Heianza, Y., Huang, T., Wang, T., Sun, D., Zheng, Y., Hu, F. B., Rexrode, K. M., Manson, J. E., & Qi, L. (2018). Dietary glutamine, glutamate and mortality: Two large prospective studies in US men and women. *International Journal of Epidemiology*, 47(1), 311-320.

Merlin, J., Ivanov, S., Dumont, A., Sergushichev, A., Gall, J., Stunault, M., Ayrault, M., Vaillant, N., Castiglione, A., Swain, A., Orange, F., Gallerand, A., Berton, T., Martin, J.-C., Carobbio, S., Masson, J., Gaisler-Salomon, I., Maechler, P., Rayport, S., ... Yvan-Charvet, L. (2021). Non-canonical glutamine transamination sustains efferocytosis by coupling redox buffering to oxidative phosphorylation. *Nature Metabolism*, 3(10), 1313-1326.

Miller, R. A., Shi, Y., Lu, W., Pirman, D. A., Jatkar, A., Blatnik, M., Wu, H., Cárdenas, C., Wan, M., Foskett, J. K., Park, J. O., Zhang, Y., Holland, W. L., Rabinowitz, J. D., & Birnbaum, M. J. (2018). Targeting hepatic glutaminase activity to ameliorate hyperglycemia. *Nature Medicine*, 24(4), 518-524.

Nagareddy, P. R., Murphy, A. J., Stirzaker, R. A., Hu, Y., Yu, S., Miller, R. G., Ramkhalawon, B., Distel, E., Westerterp, M., Huang, L.-S., Schmidt, A. M., Orchard, T. J., Fisher, E. A., Tall, A. R., & Goldberg, I. J. (2013). Hyperglycemia Promotes Myelopoiesis and Impairs the Resolution of Atherosclerosis. *Cell Metabolism*, 17(5), 695-708.

O'Neill, L. A. J., & Pearce, E. J. (2016). Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *Journal of Experimental Medicine*, 213(1), 15-23.

- Qi, L., Qi, Q., Prudente, S., Mendonca, C., Andreozzi, F., di Pietro, N., Sturma, M., Novelli, V., Mannino, G. C., Formoso, G., Gervino, E. V., Hauser, T. H., Muehlschlegel, J. D., Niewczas, M. A., Krolewski, A. S., Biolo, G., Pandolfi, A., Rimm, E., Sesti, G., ... Doria, A. (2013). Association Between a Genetic Variant Related to Glutamic Acid Metabolism and Coronary Heart Disease in Individuals With Type 2 Diabetes. *JAMA*, *310*(8), 821.
- Rader, D. J. (2016). New Therapeutic Approaches to the Treatment of Dyslipidemia. *Cell Metabolism*, *23*(3), 405-412.
- Reily, C., Stewart, T. J., Renfrow, M. B., & Novak, J. (2019). Glycosylation in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, *15*(6), 346-366.
- Schierwagen, R., Maybüchen, L., Zimmer, S., Hittatiya, K., Bäck, C., Klein, S., Uschner, F. E., Reul, W., Boor, P., Nickenig, G., Strassburg, C. P., Trautwein, C., Plat, J., Lütjohann, D., Sauerbruch, T., Tacke, F., & Trebicka, J. (2015). Seven weeks of Western diet in apolipoprotein-E-deficient mice induce metabolic syndrome and non-alcoholic steatohepatitis with liver fibrosis. *Scientific Reports*, *5*(1), 12931.
- Shah, S. H., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Crosslin, D. R., Haynes, C., Dungan, J., Newby, L. K., Hauser, E. R., Ginsburg, G. S., Newgard, C. B., & Kraus, W. E. (2010). Association of a Peripheral Blood Metabolic Profile With Coronary Artery Disease and Risk of Subsequent Cardiovascular Events. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, *3*(2), 207-214.
- Shea, S., Stein, J. H., Jorgensen, N. W., McClelland, R. L., Tascau, L., Shrager, S., Heinecke, J. W., Yvan-Charvet, L., & Tall, A. R. (2019). Cholesterol Mass Efflux Capacity, Incident Cardiovascular Disease, and Progression of Carotid Plaque : The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *39*(1), 89-96.
- Simon, J., Nuñez-García, M., Fernández-Tussy, P., Barbier-Torres, L., Fernández-Ramos, D., Gómez-Santos, B., Buqué, X., Lopitz-Otsoa, F., Goikoetxea-Usandizaga, N., Serrano-Macia, M., Rodriguez-Agudo, R., Bizkarguenaga, M., Zubieta-Franco, I., Gutiérrez-de Juan, V., Cabrera, D., Alonso, C., Iruzubieta, P., Romero-Gomez, M., van Liempd, S., ... Martínez-Chantar, M. L. (2020). Targeting Hepatic Glutaminase 1 Ameliorates Non-alcoholic Steatohepatitis by Restoring Very-Low-Density Lipoprotein Triglyceride Assembly. *Cell Metabolism*, *31*(3), 605-622.e10.
- Sorokin, L. (2010). The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nature Reviews Immunology*, *10*(10), 712-723.
- Suzuki, S., Tanaka, T., Poyurovsky, M. V., Nagano, H., Mayama, T., Ohkubo, S., Lokshin, M., Hosokawa, H., Nakayama, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Sato, E., Nagao, T., Yokote, K., Tatsuno, I., & Prives, C. (2010). Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(16), 7461-7466.
- Swirski, F. K., & Nahrendorf, M. (2013). Leukocyte Behavior in Atherosclerosis, Myocardial Infarction, and Heart Failure. *Science*, *339*(6116), 161-166.
- Tacke, F., Alvarez, D., Kaplan, T. J., Jakubzick, C., Spanbroek, R., Llodra, J., Garin, A., Liu, J., Mack, M., van Rooijen, N., Lira, S. A., Habenicht, A. J., & Randolph, G. J. (2007). Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(1), 185-194.

Tall, A. R., Thomas, D. G., Gonzalez-Cabodevilla, A. G., & Goldberg, I. J. (2022). Addressing dyslipidemic risk beyond LDL-cholesterol. *Journal of Clinical Investigation*, 132(1), e148559.

Tavakoli, S., Downs, K., Short, J. D., Nguyen, H. N., Lai, Y., Jerabek, P. A., Goins, B., Toczek, J., Sadeghi, M. M., & Asmis, R. (2017). Characterization of Macrophage Polarization States Using Combined Measurement of 2-Deoxyglucose and Glutamine Accumulation: Implications for Imaging of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(10), 1840-1848.

The Multiple Tissue Human Expression Resource (MuTHER) Consortium, Shin, S.-Y., Fauman, E. B., Petersen, A.-K., Krumsiek, J., Santos, R., Huang, J., Arnold, M., Erte, I., Forgetta, V., Yang, T.-P., Walter, K., Menni, C., Chen, L., Vasquez, L., Valdes, A. M., Hyde, C. L., Wang, V., Ziemek, D., ... Soranzo, N. (2014). An atlas of genetic influences on human blood metabolites. *Nature Genetics*, 46(6), 543-550.

Wang, Z.-M., Gao, X.-F., Zhang, J.-J., & Chen, S.-L. (2021). Primary Cilia and Atherosclerosis. *Frontiers in Physiology*, 12, 640774.

Wloga, D., Joachimiak, E., Louka, P., & Gaertig, J. (2017). Posttranslational Modifications of Tubulin and Cilia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(6), a028159.

Yvan-Charvet, L., & Cariou, B. (2018). Poststatin era in atherosclerosis management: Lessons from epidemiologic and genetic studies. *Current Opinion in Lipidology*, 29(3), 246-258.

Zhang, C.-Y., Hu, Y.-C., Zhang, Y., Ma, W.-D., Song, Y.-F., Quan, X.-H., Guo, X., & Wang, C.-X. (2021). Glutamine switches vascular smooth muscle cells to synthetic phenotype through inhibiting miR-143 expression and upregulating THY1 expression. *Life Sciences*, 277, 119365.

Zheng, Y., Hu, F. B., Ruiz-Canela, M., Clish, C. B., Dennis, C., Salas-Salvado, J., Hruby, A., Liang, L., Toledo, E., Corella, D., Ros, E., Fitó, M., Gómez-Gracia, E., Arós, F., Fiol, M., Lapetra, J., Serra-Majem, L., Estruch, R., & Martínez-González, M. A. (2016). Metabolites of Glutamate Metabolism Are Associated With Incident Cardiovascular Events in the PREDIMED PREvención con Dieta MEDiterránea (PREDIMED) Trial. *Journal of the American Heart Association*, 5(9), e003755.

# Discussion

Comme nous l'avons vu en introduction, la prévalence des maladies cardiovasculaires et du syndrome métabolique ne cesse d'augmenter au cours de ces dernières décennies malgré les progrès diagnostiques et thérapeutiques développés. L'athérosclérose qui en est le principal responsable reste un sujet d'étude encore complexe et de nouveaux axes de recherche sont nécessaires afin d'enrayer le cercle vicieux qui se met en place chez les patients. La glutamine ou plus largement les enzymes qui lui sont liées, semblent y jouer un rôle non négligeable.

Notre étude est la première à démontrer l'implication de la glutaminase 2 dans la prévention du développement des plaques d'athérosclérose. La dernière figure est une représentation schématique des principaux résultats de ma thèse (Figure 30).

## 1. Le rôle de la glutamine et du ratio glutamine/glutamate dans l'athérosclérose

La glutamine est produite à plus de 90%, en dehors des périodes post-prandiales, grâce à la glutamine synthétase située principalement au niveau musculaire (Bott et al., 2015) En situation normale, un apport extérieur n'est pas nécessaire car il est largement suppléé par la synthèse endogène. Lorsque des conditions extrêmes physiques ou physiopathologiques (exercice physique intense et prolongé, patients en réanimation, etc.) sont réunis, et qu'un état catabolique se met en place, la consommation en glutamine des organes (foie, muscles, intestins) est accrue et la synthèse *de novo* n'est alors plus capable de pallier au manque de glutamine. Un apport alimentaire devient donc nécessaire, c'est pourquoi on qualifie cette glutamine d'acide aminé conditionnellement essentiel (Cruzat et al., 2018). Chez l'Homme, la glutamine est quelquefois donnée en supplémentation mais son rôle n'est pas clairement documenté et reste encore à élucider (Cruzat et al., 2018). D'autre part, plusieurs études montrent que cet acide aminé semble avoir des effets, qu'ils soient négatifs ou positifs, dans le domaine des maladies cardiovasculaires et du syndrome métabolique (J. Chen et al., 2020; Paynter et al., 2018).

L'étude américaine MESA regroupe plus de 6000 patients à risque cardiovasculaire hommes et femmes provenant de différentes ethnies et suivis sur 10 ans. Durant cette

décennie, leurs évènements cardiovasculaires ainsi que la progression de leurs plaques ont été répertoriés. Grâce à notre collaboration avec le département de médecine de l'université de Columbia, nous avons pu analyser en aveugle plus de 1500 échantillons plasmatiques provenant de cette cohorte. Nous avons mesuré leurs taux circulants de glutamine et de glutamate ainsi que le ratio entre ces 2 acides aminés circulants (GGR).

Notre étude a ainsi permis de montrer en premier lieu une corrélation inverse entre ce GGR et la survenue d'AVC. Il semblerait que le taux de glutamate soit légèrement plus élevé chez ces patients à risque par rapport au groupe contrôle alors que le taux de glutamine n'évolue pas. Cet effet confirme ainsi des études précédemment menées (Cheng et al., 2012; Zheng et al., 2016). En ajustant nos données obtenues par un modèle de régression logistique avec les principaux facteurs de risque cardiovasculaires (table S2, modèle 2, ligne 5), la corrélation négative du GGR évoquée ci-dessus avec la survenue des AVC est statistiquement significative mais elle se perd lorsque l'on prend en compte d'autres facteurs de risque secondaires (table 1, modèle 3, ligne 6). Nous pouvons alors légitimement penser que l'augmentation du glutamate peut influencer la survenue des AVC tout en modifiant les facteurs de risque classiques ainsi que les caractères phénotypiques qui y sont associés chez ce groupe de patients. Au contraire, lorsque le GGR est augmenté dans la 2<sup>e</sup> cohorte, il est corrélé positivement à la progression des plaques carotidiennes. En analysant plus précisément ces dernières données, on constate que même si les taux des 2 acides aminés sont abaissés, le niveau plasmatique de la glutamine reste tout de même en excès par rapport à celui du glutamate, reflétant probablement une perturbation des activités enzymatiques responsable de sa synthèse et de son hydrolyse.. Ainsi, ces observations indiquent que le métabolisme de la glutamine est associé d'une part à des complications cardiovasculaires telles que les AVC en régulant les facteurs de risques traditionnels mais, qu'en amont, il est associé d'autre part à la progression de la plaque d'une manière indépendante. Il est donc concevable que le métabolisme de la glutamine soit un facteur de risque précoce de la pathologie athéromateuse chez l'homme avant même l'apparition d'un évènement cardiovasculaire.

Ces résultats peuvent nous faire penser comme évoqué en introduction que l'évolution de l'athérosclérose et les complications qui s'en suivent, i.e. rupture et ischémies d'organes, appellent à des mécanismes physiopathologiques distincts. L'équilibre entre synthèse de glutamine et glutaminolyse n'est nécessairement pas le même au cours des différents stades d'évolution des plaques. Il serait opportun d'en explorer le mécanisme de manière plus

approfondie au cours des prochaines années (i.e. modèles murins d'infarctus du myocarde ou d'AVC).

## **2. Le rôle de la glutaminase 2 dans la prévention de l'athérosclérose**

La glutamine est métabolisée en glutamate par le biais des glutaminases, GLS1 et GLS2, et la réaction inverse est médiée par la GS. Bien que les voies métaboliques qu'emprunte la glutamine soient assez bien documentées (DeBerardinis & Cheng, 2010), le rôle de la glutaminolyse hépatique médiée par GLS2 et son implication dans le déséquilibre des facteurs cardio-métaboliques doivent encore être explorés.

Conformément aux études d'associations pangénomiques évoquées dans les parties précédentes (Kettunen et al., 2012; Suhre et al., 2011), notre étude semble montrer que la déficience en GLS2 entraîne bien non seulement une augmentation des taux plasmatiques de glutamine mais aussi une augmentation de ses taux tissulaires, ce qui n'avait pas été montré à ce jour. En effet, la glutamine ne pouvant être métabolisée en glutamate, cette dernière s'accumule au sein des organes et dans la circulation sanguine. En revanche, de manière surprenante, le taux de glutamate quant à lui ne baisse pas, ce qui signifierait qu'il existe des voies métaboliques annexes destinées à compenser la perte de glutamate due à l'inefficacité de la GLS2. Ceci est probablement la conséquence d'une augmentation du catabolisme d'autres acides aminés utilisés afin de reconstituer la réserve de glutamate.

Par ailleurs l'inhibition de la GS que nous avons conduit par le biais d'une injection chronique de MSO produit comme attendu l'effet inverse sur les taux tissulaires et circulants de glutamine et de glutamate (Andersen et al., 2017).

Ainsi, dans des conditions où l'organisme n'est pas en situation catabolique accrue, le GGR plasmatique ou tissulaire, est bien modulé grâce à l'action enzymatique de la GLS2 ou de la GS. Dès lors, ce mécanisme permet de maintenir une certaine homéostasie nécessaire aux cellules.

Grâce à nos modèles murins d'athérosclérose, nous avons pu montrer pour la première fois que le maintien de l'activité de la GLS2, mais pas celle de la GS, était impliquée dans la prévention de l'athérosclérose en maintenant un GGR optimal tout en évitant une accumulation excessive de glutamine, en situation normale, sous régime riche en graisse ou avec supplémentation en glutamine.

Dans certaines conditions particulières, comme dans un organisme en situation catabolique par exemple (diabète de type 2, exercice physique intense, défaillance

multiviscérale), des modifications de l'activité des enzymes métabolisant la glutamine peuvent survenir. Ainsi, parmi les patients diabétiques de type 2, une diminution de l'expression de la GS a été corrélée à l'augmentation du risque cardiovasculaire (Qi et al., 2013). De même, dans le tissu adipeux des personnes souffrant d'obésité une augmentation de l'activité de la glutaminase a été évoquée (Ren et al., 2019). Chez la souris, des études montrent une utilisation accrue de la glutamine dans des régions aortiques à risque de développement d'athérosclérose (Merlin et al., 2021; Tavakoli et al., 2017). En obtenant une déficience totale ou partielle de la GLS2 nous avons réussi à mimer ces conditions particulières et à en observer l'effet sur le développement des plaques d'athérosclérose. Nous avons pu noter les conséquences que les modifications de flux d'acides aminés engendrent sur la paroi vasculaire. Ainsi, la déficience totale ou spécifiquement hépatique en GLS2 chez des souris *Ldlr<sup>-/-</sup>* ou *ApoE<sup>-/-</sup>* entraîne une augmentation de près de 40 à 60% du volume des plaques. Ce résultat nous indique bien que l'absence de glutaminolyse hépatique est alors responsable à distance du développement de l'athérome. En revanche, notre modification de l'activité de la GS n'a pas engendré de phénotype particulièrement délétère et il n'y a aucune influence remarquable sur le développement de l'athérosclérose. Une augmentation de glutamate circulant a été décelée mais aucune modification n'est notable en ce qui concerne la glutamine plasmatique alors même que sa synthèse au niveau musculaire est effondrée.

Précédemment dans l'introduction, nous avons vu le rôle bivalent que peut tenir la glutamine. En effet, la supplémentation en glutamine pourrait améliorer la récupération des tissus musculaires après un épisode ischémique sur maladie coronarienne (Durante, 2019) et participerait à l'amélioration de certains paramètres cardiovasculaires chez les diabétiques (Mansour et al., 2015). Cependant, dans d'autres conditions, cette supplémentation peut aussi être délétère (Durante, 2019). Il n'est alors pas évident de prédire l'effet que cette supplémentation peut induire car elle semble dépendre de l'état dans lequel se trouve l'organisme lors de l'apport en glutamine, et surtout de l'efficacité de sa glutaminolyse. Dans notre modèle d'étude de régression des plaques d'athérosclérose, nous avons soumis les souris à régime riche en graisse puis à un régime normal. Après supplémentation en glutamine, chez nos souris contrôles, nous n'avons constaté aucune amélioration phénotypique. En revanche, chez celles ayant perdu une activité de glutaminolyse normale (déficience en GLS2), nous avons observé une augmentation drastique de glutamine accompagnée d'un accroissement du volume des plaques de près de 30%. Cela semble confirmer une nouvelle fois le rôle essentiel de la GLS2 dans l'homéostasie de la glutamine et la prévention du développement de l'athérosclérose.

Le foie a besoin de la glutaminolyse pour maintenir l'homéostasie acido-basique notamment via la production d'urée et participer au processus de néoglucogénèse (Cruzat et al., 2018; DeBerardinis & Cheng, 2010). Chez la souris, il a été démontré que la déficience en GLS2 engendrait une perturbation de l'homéostasie du glucose avec une baisse de la glycémie dans des conditions de jeûne sous régime normal (Miller et al., 2018). A la différence de cette expérience réalisée en condition catabolique, notre étude n'a pas révélé de perturbation du bilan glucidique ou acido-basique dans nos conditions non cataboliques (souris sous fond athérogène et soumis à un régime riche en graisse). Ces facteurs ne participent donc pas au rôle que joue la glutamine dans le développement des plaques.

Le cholestérol est un des acteurs clés de l'athérosclérose. C'est pourquoi la plupart des thérapies employées visent à rétablir une homéostasie lipidique correcte chez les patients à risque (National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), 2002). Par ailleurs, une étude a montré que l'inhibition de l'activité glutaminase de la GLS1 dans le foie conduisait à une transposition (switch) d'expression de cette dernière vers le type GLS2 ainsi qu'une amélioration de la stéatohépatite non alcoolique (NASH) induite dans des modèles murins en modifiant leur métabolisme de sécrétion des VLDL (Simon et al., 2020). Cependant, notre expérimentation n'a pas permis de mettre en évidence une quelconque perturbation majeure dans l'homéostasie lipidique que ce soit d'un point de vue histologique sur nos sections colorées et nos dosages tissulaires ou d'un point de vue transcriptionnel sur nos analyses de séquençage ARN haut débit. Nous n'observons pas non plus de différence du taux de cholestérol ni de triglycérides sur nos mesures plasmatiques. Les acteurs lipidiques peuvent donc être, eux aussi, exclus du rôle que joue la glutamine dans le développement de l'athérosclérose. Ce constat conforte nos résultats de l'étude MESA évoquée précédemment qui nous permettent de conclure que l'excès de glutamine par rapport au glutamate est un facteur de risque indépendant dans l'évolution des plaques. Chez nos souris ApoE<sup>-/-</sup> et non Ldlr<sup>-/-</sup>, nous observons tout de même une légère augmentation du niveau des triglycérides sanguins, motivé très certainement par une baisse de l'activité de la LPL retrouvée au niveau transcriptionnel. Ces constatations peuvent expliquer en partie pourquoi la modulation d'une activité GLS1 ou GLS2 dans le foie comme évoqué plus haut entraîne une modification du métabolisme de sécrétion des VLDL. Cependant, au cours de notre dernière expérimentation, nous avons induit une déficience partielle de l'expression de GLS1 dans le foie de souris ApoE<sup>-/-</sup> soumis à un régime riche en graisse durant 12 semaines. Aucune différence, dans nos

conditions expérimentales, n'a été constatée sur nos mesures plasmatiques ou d'un point de vue histologique au niveau du foie sur nos sections colorées à l'hématoxyline et à l'éosine.

Durant une période de jeûne courte et intermittente, il a été prouvé que les hépatocytes via la voie métabolique AMPK-PPAR $\alpha$  pouvait moduler l'inflammation en mobilisant les monocytes (Jordan et al., 2019). Par ailleurs, lors d'études précédentes, l'augmentation de glutamate plasmatique et donc la diminution du GGR a été corrélée à l'élévation du nombre de monocytes circulants (Ganda et al., 2013). Ainsi, nous avons voulu savoir si la déficience en GLS2 de nos modèles murins d'athérosclérose induisait une modulation de la réponse inflammatoire monocyttaire durant un régime riche en graisse ou lors de périodes de jeûne. Sur les nombreuses analyses faites en cytométrie de flux et en immunofluorescence, il n'y a pas de différence en termes de nombre de monocytes circulants ou infiltrés dans les plaques entre les différents groupes, excepté une légère augmentation sous le fond ApoE<sup>-/-</sup>. Toutefois ce dernier modèle pourrait constituer un biais car on sait que la mutation ApoE seule induit déjà une signature inflammatoire de base sans rapport avec une déficience de notre enzyme cible.

Par ailleurs, nous savons que le déficit en GLS1 au sein des macrophages induit une perte de l'efficacité de l'efférocytose conduisant à l'augmentation des plaques (Merlin et al., 2021). Nous avons donc voulu vérifier s'il existait aussi un rôle intrinsèque de GLS2 dans la fonction des macrophages mais nous n'avons pu établir ce lien au cours de notre expérimentation.

### **3. Une modification des flux d'acides aminés à l'origine d'un remodelage de la matrice extracellulaire**

La modulation du métabolisme de la glutamine peut conduire à des modifications transcriptionnelles différentes aboutissant à un phénotype particulier. Elle peut par exemple réguler l'angiogenèse (Eelen et al., 2018), les fonctions cardiomyocytaires ou monocyttaire, modifier l'épigénétique des cellules (Merlin et al., 2021; Shen et al., 2021), ou encore modifier les interactions cellules/matrice extracellulaire (Bertero et al., 2016). Nous avons donc réalisé un séquençage ARN haut débit afin d'établir un profil transcriptionnel du foie et des aortes de nos animaux déficients en GLS2. Il en résulte que de nombreux gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire et dans l'interaction des cellules avec cette matrice s'en trouvent modifiés. Une des explications plausibles est que la déficience en glutaminolyse induit une redistribution des flux d'acides aminés, entraînant des modifications

transcriptionnelles. Il est clair, comme nous l'avons vu plus haut que l'inhibition de la GLS2 entraîne un excès de glutamine par rapport au glutamate. Cette glutamine va alors emprunter d'autres voies et peut être utilisée par ailleurs par la transglutaminase 2, dont l'augmentation de l'activité est mesurée chez nos souris après quantification du marquage N<sup>ε</sup>-(γ-L-glutamyl)-L-lysine sur coupe en immunofluorescence. La transglutaminase 2 est bien connue dans de nombreuses maladies (e.g. la maladie cœliaque, les maladies neurodégénératives, la sclérose en plaque) mais très peu dans le domaine cardiovasculaire (Keillor & Johnson, 2021). Néanmoins nous savons qu'elle est essentielle pour la liaison des protéines entre elles (Deweid et al., 2020). Elle catalyse en effet la réaction de jonction entre des résidus glutamines et des résidus lysines de chaînes latérales de protéines distincts afin de former des agglomérats. Elle participerait ainsi à l'intégrité et au remodelage de la matrice extracellulaire, ou encore à l'interaction des cellules avec cette matrice (Beninati et al., 2017; S. Chen et al., 2022). Au niveau intracellulaire, de manière intéressante, des études évoquent son rôle dans la contraction et le tonus musculaires des vaisseaux (Penumatsa et al., 2014; Watts et al., 2009) via le processus de sérotonylation (Farrelly et al., 2019). Cependant, son implication dans l'athérosclérose reste controversée avec des hypothèses contradictoires quant à son influence sur la taille des plaques (S. Chen et al., 2022; Keillor et al., 2015; Matlung et al., 2012).

De même, la glutamine en excès peut être transformée en uridine diphosphate N-acétylglucosamine permettant la synthèse de la majeure partie des glycosaminoglycane de la matrice extracellulaire et participant à la N-glycosylation des protéines. Cependant, la coloration bleu alcian n'a pas permis d'identifier une différence majeure dans la production de ces mucopolysaccharides. Pour autant, il n'est pas certain que la composition, la qualité et la proportion de glycosaminoglycane ne soit pas altérées.

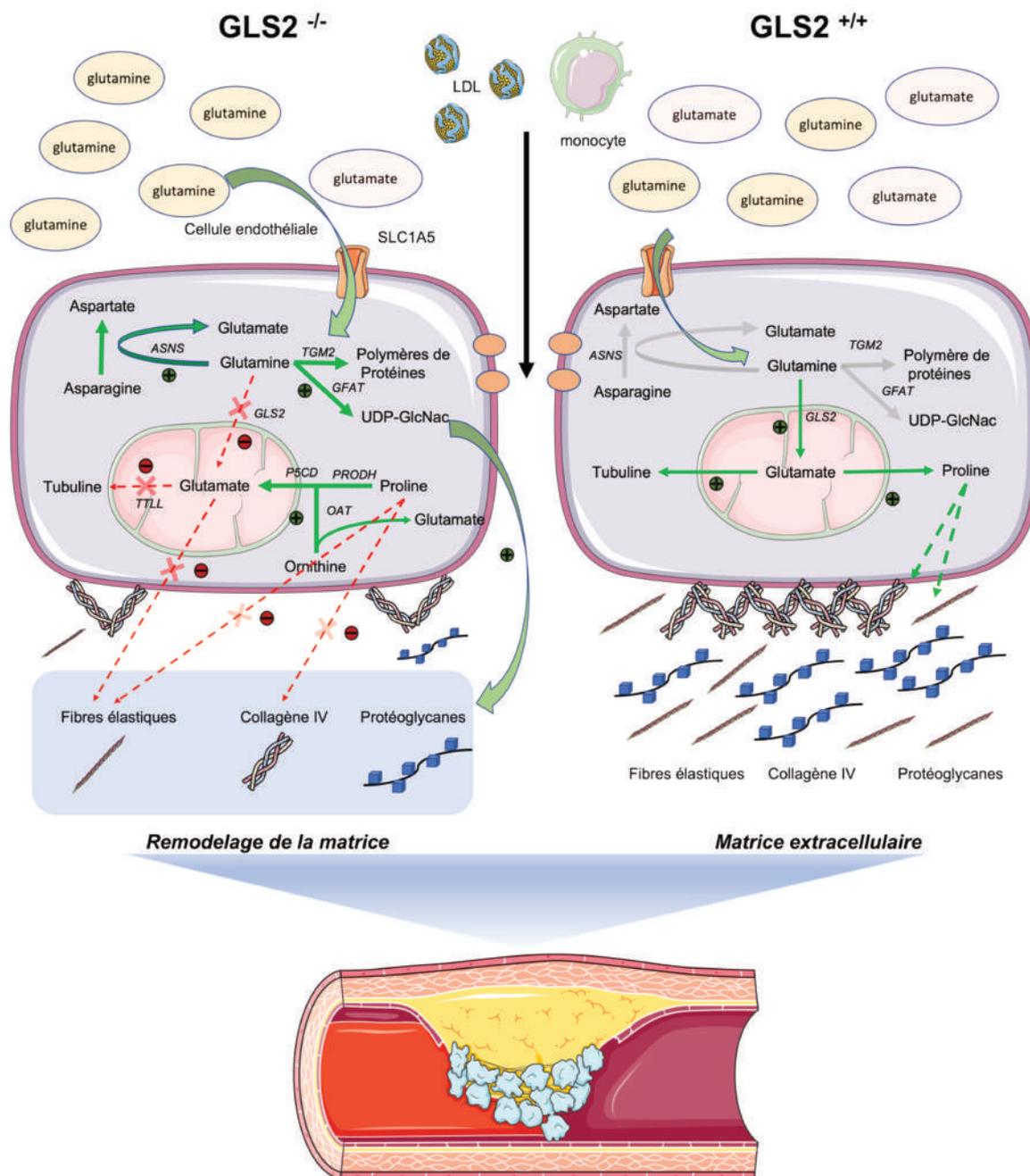
L'inhibition de la glutaminolyse chez nos souris n'a pas entraîné de diminution de glutamate comme attendu. Il y a donc un maintien de la réserve en glutamate par des voies cataboliques impliquant d'autres acides aminés. Parmi eux, la proline peut constituer une des sources importantes de la production en glutamate via le catabolisme des fibres de collagène. Notre marquage en collagène IV, constituant les membranes basales des cellules endothéliales et des cellules musculaires supporte cette hypothèse.

Par ailleurs, nous avons remarqué une dégradation plus prononcée des fibres élastiques constituant la média des artères chez nos souris déficientes en GLS2. Or, nous savons que l'élastine des artères de gros calibres comportent non seulement beaucoup de glycine et de valine mais aussi de la proline et du glutamate (Adeva-Andany et al., 2021; Yu, 1971). On

comprend donc qu'une modification des flux de ces 2 acides aminés induit par l'inhibition de la glutaminolyse peut altérer considérablement la production ou la qualité de ces fibres élastiques.

De plus, on sait maintenant que des résidus glutamate peuvent être attachés via le processus de glutamylation aux microtubules des cellules grâce aux TTLL. Ceci permet entre autres de stabiliser les microtubules. Ce phénomène s'accroît lorsque la matrice extracellulaire est remodelée et se rigidifie (Torrino et al., 2021). De même, la glutamylation va permettre de stabiliser l'axonème des cils, identifiés comme protecteur du développement de l'athérosclérose (Z.-M. Wang et al., 2021; Wloga et al., 2017). Dans nos modèles, nous avons effectué un marquage de cette glutamylation au sein des plaques et l'on note que cette dernière est compromise par la faible disponibilité du glutamate et la réorganisation des flux d'acides aminés.

L'environnement créé par tous ces changements entraîne un stress oxydatif plus important, une matrice extracellulaire qui se fragilise et engendre une perméabilité accrue aux lipides et aux leucocytes circulants jouant un rôle clé dans le développement de l'athérosclérose.



**Figure 30 : Schéma récapitulatif des effets du blocage de GLS2**

Pour terminer, peu d'études se sont consacrées à l'effet d'une surexpression de GLS2 dans les cellules (Martín-Rufián et al., 2014; S. Suzuki et al., 2010; Szeliga et al., 2014) et, la plupart du temps, ces dernières sont réalisées dans le domaine de la cancérologie. La surexpression de GLS2 dans notre étude a mis en évidence une diminution de près de 20% du volume des plaques. En mesurant les taux de glutamine plasmatique et tissulaire, nous constatons une diminution de cette dernière alors que le glutamate ne s'en trouve pas modifié. L'activité de la transglutaminase 2 et la polyglutamylation s'en trouvent par ailleurs également modifiées. Une fois encore, c'est bien la glutamine qui semble être le moteur principal de la modulation des plaques d'athérosclérose. La déficience hépatique en GLS1 ne semble pas, quant à elle, entraîner de phénotype notable sur le plan cardiovasculaire.

## Conclusion

La glutaminolyse est une voie métabolique essentielle à la cellule. Elle possède de multiples rôles qui à ce jour ne sont pas précisément définis. Au cours de notre étude, nous avons mis en lumière la fonction de la GLS2 hépatique et l'impact de la régulation des flux d'acides aminés dans l'athérosclérose.

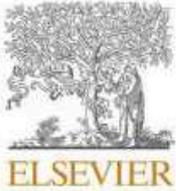
Tout d'abord, nous avons pu établir une corrélation entre le ratio glutamine/glutamate et la progression des plaques. Cependant, même si dans nos modèles murins celui-ci est sous contrôle de la glutaminase, il serait opportun de vérifier notre hypothèse chez l'humain en étudiant les différents polymorphismes du gène GLS2 dans notre cohorte MESA pouvant expliquer une variation de ce ratio.

En bloquant les principales voies d'utilisation de la glutamine et du glutamate, nous avons pu observer des effets totalement différents sur le développement des plaques d'athérosclérose. Alors que l'activité de la GS ne semble pas avoir d'impact, la déficience en GLS2 hépatique augmente le volume des lésions. En revanche, la GLS1 n'a été que très peu étudiée dans ce contexte malgré sa fonction importante dans les macrophages des plaques. Il serait intéressant d'envisager à l'avenir de moduler au cours d'une même expérience les deux types de glutaminase, comme cela a déjà été fait dans le domaine de la cancérologie, afin de regarder s'il peut exister un effet synergique sur les parois des vaisseaux.

La déficience de GLS2 hépatique dans notre modèle engendre un remodelage à distance de la matrice extracellulaire et une modification substantielle de la paroi vasculaire. Bien que ce dernier point reste à approfondir, nous ne nous sommes pas intéressés en sus aux forces de tension qui s'appliquent aux vaisseaux et aux modifications des paramètres cardiaques qui pourraient potentiellement survenir (e.g. fraction d'éjection systolique, hypertension, hypertrophie ventriculaire).

Il est maintenant clair que l'on ne peut attribuer à un seul acide aminé, i.e. la glutamine ou le glutamate, la responsabilité d'un événement cardiovasculaire. C'est au contraire l'utilisation qu'en font les différentes enzymes et la redistribution des flux destinés à compenser des voies métaboliques lors de conditions pathologiques qui va entraîner les effets délétères que l'on observe. A l'heure où de nombreuses thérapies sont développées et visent essentiellement la voie lipidique, la glutaminolyse pourrait être une cible de choix dans les années à venir.

# **Annexes**



## Review

## Macrophage ontogeny and functional diversity in cardiometabolic diseases

Emmanuel L. Gautier<sup>a,\*</sup>, Haoussa Askia<sup>a</sup>, Florent Murcy<sup>b</sup>, Laurent Yvan-Charvet<sup>b,\*</sup><sup>a</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) UMR-S 1166, Sorbonne Université, 75013 Paris, France<sup>b</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U1065, Université Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Arip-Avenir, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Oncoage, 06204 Nice, France

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Macrophage diversity  
Cardiometabolic diseases  
Immunometabolism

## SUMMARY

Macrophages are the dominant immune cell types in the adipose tissue, the liver or the aortic wall and they were originally believed to mainly derived from monocytes to fuel tissue inflammation in cardiometabolic diseases. However, over the last decade the identification of tissue resident macrophages (trMacs) from embryonic origin in these metabolic tissues has provided a breakthrough in the field forcing to better comprehend macrophage diversity during pathological states. Infiltrated monocyte-derived macrophages (moMacs), similar to trMacs, adapt to the local metabolic environment that eventually shapes their functions. In this review, we will summarize the emerging versatility of macrophages in cardiometabolic diseases with a focus in the control of adipose tissue, liver and large vessels homeostasis.

## 1. Introduction

Cardiometabolic diseases (CMDs) remain the largest cause of death worldwide. They are multifactorial diseases influenced by a number of metabolic risk factors as well as immune cell activation, including macrophages. Therefore, understanding the mechanistic role of macrophages has always been imperative in the cardiometabolic field in order to uncover effective ways to reduce CMDs burden.

Macrophages are ubiquitously present across organs and play key roles in both health and disease [1]. Tissue-resident macrophages (trMacs), that develop during embryonic or early postnatal stages, can be distinguished from the macrophages that derived from monocytes upon inflammation [1]. However, such classification is sometimes oversimplified depending on the tissue and pathological state studied. Macrophages are plastic cells that can adopt a wide range of phenotypes depending on their environment. Indeed, the impact of tissue environment on resident macrophage heterogeneity *in vivo* has been previously proposed [2–4] and has only recently been thoroughly documented [5, 6]. Divergent gene expression landscapes across different trMacs clearly support the idea of local macrophage plasticity at the steady state [5–7]. However, the transcriptional and molecular basis underlying such diversity is still not fully understood, and we are only starting to better appreciate the relationship between the tissue environment and trMac phenotypes. In addition, during pathological states, macrophages, whether they are tissue-resident or recruited monocyte-derived cells,

can also respond to additional stimuli that further imprint diversity on macrophages. In metabolic tissues, the nutrient environment has emerged as a driver of macrophage reprogramming during CMDs, modulating their key effector functions. As a result, the maintenance of tissue homeostasis may be perturbed depending on the pro- or anti-resolutive functions macrophages adopt to face their environment.

In this review we will discuss recent progress regarding how macrophage subsets and their plasticity impact on tissue function and remodeling. These findings will be illustrated in the context of cardiometabolic diseases, in which macrophage effector and metabolic functions are exquisitely intertwined to face and adapt to their environment.

## 2. Adipose tissue macrophages in obesity

The white adipose tissue (WAT) has a central role in metabolic adaptation to nutritional cues because of its ability to store energy as triglycerides. The unprecedented growth of obesity and metabolic disease worldwide associated with a low-grade inflammation has focused attention on the immune cells that comprise the stroma vascular fraction (SVF) of this dynamic endocrine organ [8]. Indeed, the majority of the pro-inflammatory cytokines produced in the obese adipose tissue are secreted from the SVF, including adipose tissue macrophages (ATMs).

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [emmanuel-laurent.gautier@inserm.fr](mailto:emmanuel-laurent.gautier@inserm.fr) (E.L. Gautier), [yvancharvet@unice.fr](mailto:yvancharvet@unice.fr) (L. Yvan-Charvet).<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.06.023>

Received 8 February 2021; Received in revised form 1 June 2021; Accepted 28 June 2021

Available online 3 July 2021

1084-9521/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 2.1. Origin and diversity of adipose tissue macrophage subsets in obesity

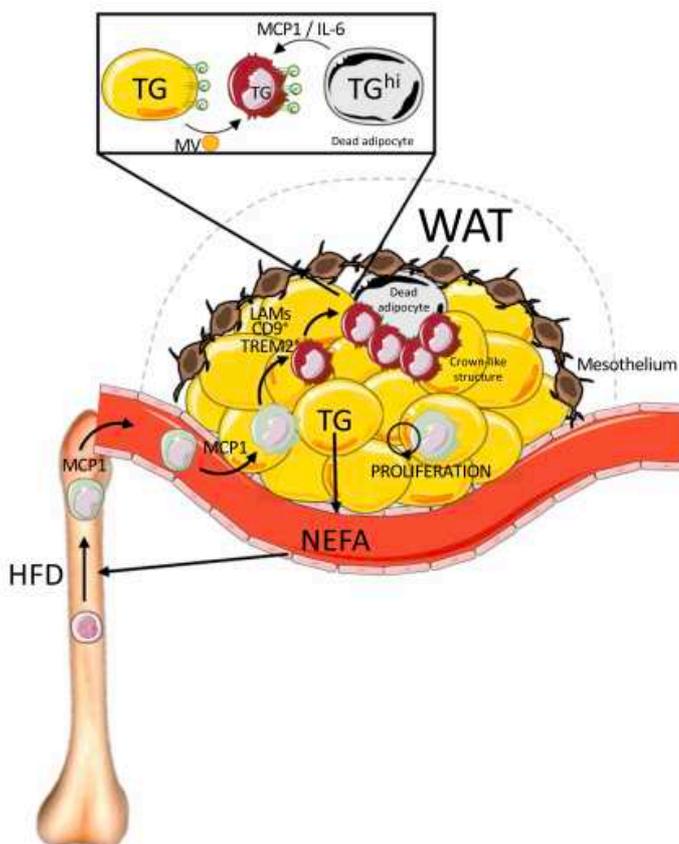
At the steady state, a major trMac population closely associated with the blood vasculature inhabit the visceral WAT [9], but their origin and maintenance mode (monocyte input versus self-renewal) still remain poorly defined. A study conducted in *Xenopus laevis* suggested adipose trMacs were from embryonic origin and capable to self-renew by proliferating locally [10] (Fig. 1). Nevertheless, while WAT trMacs have been sparsely studied, ATMs as a whole have retained much attention for the last two decades. The original observation of the recruitment and infiltration of circulating monocytes into obese WAT, which exacerbates the inflammatory burden, led to the hypothesis that ATMs originated from bone marrow myelopoiesis [11–13] (Fig. 1). A recent study reported that diet-induced obesity fueled tissue inflammation not only by enhancing monocyte recruitment but also by triggering epigenetic modulation and NLRP3-dependent activation of bone marrow (BM) myeloid progenitors to promote monocyte production [14]. These findings are most likely linked to the metabolic requirement of myelopoiesis [15,16] that not only provide intermediate metabolites necessary to generate and modify epigenetic marks [17] but also to prime and activate the NLRP3 inflammasome [18,19]. Thus, monocyte mobilization and their recruitment to the obese WAT favors monocyte-derived macrophages (moMacs) accumulation [20], but trMacs contribution to

the ATM pool is still not well understood. Beside monocyte recruitment, the ATM pool may also expand by proliferation [21]. Enhanced expression of MCP-1 in obese adipose tissue is also a key driver of monocyte recruitment as evidenced in *Mcp1*-deficient mice [22] as well as in mice deficient for *Ccr2* [20]. Importantly, both *Mcp1*- and *Ccr2*-deficient obese animals had improved insulin sensitivity and hepatosteatosis [20,22]. Similar improvements in insulin sensitivity were observed after ablation of CD11c<sup>+</sup> myeloid cells [23] or after limiting monocyte recruitment to adipose tissue in high-fat diet fed *Itgam*-deficient mice [24]. Nevertheless, recent studies have challenged the causality of these associations by showing that high-fat diet-fed *Ccr2*-deficient mice co-housed with their littermate controls did not show improved insulin sensitivity despite reduced circulating monocytes [25,26]. One potential explanation could be attributed to the role of CCR2 in promoting infiltration of colonic pro-inflammatory macrophages upon high-fat diet feeding that perturbs intestinal permeability, microbial antigen leakage and subsequent insulin sensitivity [27]. Overall, while ATMs are key drivers of obesity-induced metabolic alterations, their origin and function are still not fully understood.

### 2.2. Newly recruited adipose tissue macrophages and their zonation to 'crown-like structures' in obesity

An elevated ratio of pro-inflammatory macrophages to anti-inflammatory/pro-resolving macrophages was originally described in obese WAT, which could contribute to the pro-inflammatory milieu and serve as a spatiotemporal signal to the accumulation of distinct ATM subtypes [28,29]. Intriguingly, ATMs surrounding dead adipocytes, which form 'crown-like structures' (CLS), are thought to be a major source of pro-inflammatory mediators [30–32] (Fig. 1). These observations contrast with in vitro experiments showing that clearance of apoptotic debris by macrophages (i.e. efferocytosis) contributes to resolution of inflammation [33]. However, it could reflect the inefficiency of macrophages to handle the large amount of lipids and other metabolites released by dying adipocytes in the obese WAT environment [34]. The frequency of adipocyte death in WAT increased from 0.1% at baseline to 16% after 12 weeks of high-fat diet and coincided with increased MCP-1 levels, a key driver of monocyte recruitment, and insulin resistance [32]. Elevated IL-6 and IL-10 levels in CLS could also contribute to ATM accumulation by increasing their proliferative potential [35].

Single-cell RNA sequencing (scRNAseq) recently extended our ability to better characterize immune cell diversity and uncover disease-associated leukocyte subsets. Notably, scRNAseq was performed on CD11b<sup>+</sup> Ly-6C<sup>-</sup> ATMs before or after 12 weeks of diet-induced obesity [36] as well as on CD45<sup>+</sup> immune cells in the SVF fraction of WAT after 6, 12 and 18 weeks of diet-induced obesity [37]. As expected, there was a dramatic increase in the proportion of macrophages after high-fat diet in these two studies [36,37]. A CD9<sup>+</sup> CD63<sup>+</sup> ATM subset accumulated in CLS of high-fat diet-fed mice and was associated with a strong lipid metabolism and phagocytosis transcriptomic signature, leading to their designation as 'lipid-associated macrophages' (LAMs) [36,37] (Fig. 1). LAMs were further characterized by the expression of 'triggering receptor expressed on myeloid cells 2' (*Trem2*) and whole-body knockout of this lipid receptor prevented the appearance of this ATM subset in obesity and reduced the formation of CLS [37]. In addition, *Trem2*-deficient mice exhibited massive adipocyte hypertrophy upon high-fat diet feeding and exacerbated metabolic complications associated to obesity [37]. The presence of TREM2<sup>+</sup> ATMs was also observed in human visceral adipose tissue and correlated with body mass index (BMI) [37]. A similar population of 'phagocytic macrophages' was further increased following 2 weeks of caloric restriction post high-fat diet feeding [38], supporting a role of these ATMs in clearing lipid and adipocyte remnants to restore adipose tissue homeostasis. These scRNAseq studies have paved the way to understand ATM biology and we entered an exciting era that should pinpoint the relative contribution



**Fig. 1.** White adipose tissue macrophage heterogeneity in obesity. Under homeostatic condition, adipose tissue resident macrophages are derived from embryonic precursors and self-sustain by local proliferation. Monocytes that are constantly generated in the bone marrow through myelopoiesis circulate in the blood for immune surveillance. Upon high fat diet-induced obesity, the expansion of the adipose tissue is associated with a remodeling of the macrophage landscape. Adipocyte hypertrophy is associated with local insulin-resistance, uncontrolled lipolysis, local inflammation and increased cell death that send signals to recruit circulating monocytes. The recruited monocytes differentiate into macrophages (moMacs) and adapt their behavior to face the local lipid-rich environment. They are primarily found close to dead adipocytes in 'crown-like structures' (CLS).

of each different subsets to WAT homeostasis.

### 2.3. Metabolic rewiring of adipose tissue macrophages in obesity

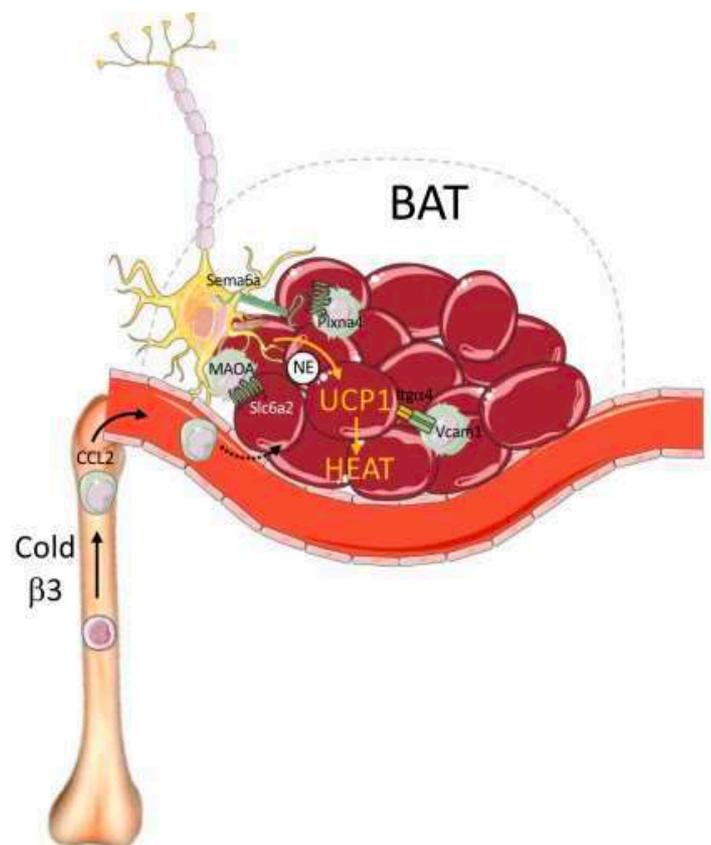
There is increasing evidence that ATMs can be re-programmed by their environment, especially by the presence of metabolic stressors such as saturated fatty acids (SFAs) [39]. SFAs may arise from the diet or from uncontrolled adipose tissue lipolysis during obesity. While excessive lipolysis could have a pro-inflammatory effect on ATMs, adipocyte lipolysis is needed to avoid cell toxicity and death. Indeed, hormone sensitive lipase (*Hsl*)- and adipose triglyceride lipase (*Atgl*)-deficient mice, in which adipose tissue lipolysis is reduced, exhibited a dramatic increase in CLS that was associated with increased adipocyte lipid storage and death [30,40]. Thus, since dying adipocytes are surrounded by macrophages as mentioned above, one could speculate that dead adipocytes clearance participates to macrophage lipid loading during obesity. A recent study also identified that lipid-filled vesicles secreted from adipocytes, which contain triglycerides, phospholipids and cholesterol, were a dominant driver of ATM inflammation [41]. This work highlights an early metabolic and inflammatory event involving the paracrine communication between adipocytes and ATMs (Fig. 1). This study complements recent and earlier works on the role of extracellular vesicle or mitochondrial transfer as a mean of communication between adipocytes and surrounding stromal cells [42,43]. Free fatty acid released by adipocytes through lipolysis could also communicate at distance with monocyte and alter their metabolic and inflammatory activities during obesity as recently observed upon fasting [44] (Fig. 1). Thus, different routes can be used by SFAs to reach ATMs.

The way macrophages handle and metabolize lipids has been reviewed elsewhere [45,46], and this is tightly coupled to a program of lysosome biogenesis in obesity [47]. A direct genetic evidence that lipid handling by ATMs drives metabolic inflammation during obesity has been provided by studying mice deficient for the fatty acid synthase (*Fasn*) in macrophages [48]. This led to the attenuation of chronic inflammation and limited macrophage accumulation in the obese adipose tissue [48]. Interestingly, inhibition of fatty acid synthesis impaired membrane cholesterol order in ATMs, limiting their inflammatory response [48] most likely by interfering with Toll-like receptor 4 (TLR4) ability to enter lipid raft [49]. *In vitro*, SFAs induced JNK activation and inflammation were only effective in TLR4-primed macrophages [50]. Such priming altered cellular metabolism and membrane lipid composition, allowing cells to efficiently respond to SFAs [50]. This could create a vicious cycle as TLR4 can enhance the toxicity of SFAs [51]. Consequently, mice lacking JNK signaling in macrophages were markedly protected against diet-induced insulin resistance [52]. Altogether these findings suggest a specificity of metabolic pathways that promote macrophage lipid overload and the subsequent initiation of ATM inflammation.

### 2.4. Emerging accessory function of ATMs in the control of thermogenesis

Apart from lipid storage, beige subcutaneous (scWAT) and brown adipose (BAT) tissues can dissipate chemical energy as heat notably by increasing uncoupling protein 1 (UCP1) activity [53]. Heat production and energy burning in scWAT and BAT can be induced by the activation of sympathetic neurons upon cold exposure (i.e. simulation of norepinephrine release) or artificially by  $\beta$ 3-adrenergic stimulation.  $\beta$ 3-adrenergic stimulation is associated with a strong remodeling of the WAT immune landscape [54]. Intriguingly, compared to cold challenge,  $\beta$ 3-adrenergic stimulation is more effective at inducing UCP1 expression in visceral WAT [55], where it is accompanied by a strong inflammatory response and CLS formation [54], likely due to moMacs accumulation. Although the physiological relevance is not fully understood, CLS formation is associated with the release of lipid metabolites and other chemoattractants that are required for WAT browning by potentiating the proliferation and differentiation of adipose progenitors [56].

Interestingly, adrenergic signals have also been reported to mobilize hematopoietic progenitors from the bone marrow and favor myelopoiesis [57–59]. The underlying mechanisms within the bone marrow niche are complex but most likely involved a reduced interaction between CXCL12 (SDF-1) and CCL2 and their respective receptors CXCR4 and CCR2 expressed by monocytes [60,61]. However, whether these mechanisms could contribute to moMacs accumulation and thermogenesis upon  $\beta$ 3-adrenergic stimulation remains elusive (Fig. 2). Regarding cold-induced thermogenesis, it remains unclear whether it remodels the macrophage pool. At least, the requirement of monocyte recruitment via CCR2 and alternative activation via IL-4R $\alpha$  as potential mechanisms leading to the biogenesis of thermogenic fat has been debated [62–64]. Nevertheless, it was recently uncovered that a subset of trMacs is tightly associated with the peripheral nervous system [65, 66], which could impact on nonshivering thermogenesis [67,68]. Mechanistically, these macrophages can regulate the sympathetic tone by at least two independent mechanisms (Fig. 2). First, macrophage expressing PlexinA4 can limit sympathetic tone-mediated BAT thermogenesis by repulsing *Sema6A*-expressing sympathetic axons to locally control neuronal density [69]. A recent report also suggested that sympathetic neuron-associated macrophages can locally reduce norepinephrine (NE) availability through its uptake and subsequent degradation, which represents an alternative mechanism of



**Fig. 2.** Subcutaneous and brown adipose tissue macrophage heterogeneity in thermogenesis. Macrophages control uncoupling protein 1 (UCP1)-dependent heat production in subcutaneous and brown adipose tissue. The contribution of tissue resident macrophages (trMacs) versus monocyte derived macrophages (moMacs) remains ill defined. Nevertheless, thermogenic stimulation such as cold exposure or  $\beta$ 3-adrenergic activation support bone marrow myelopoiesis and subsequent monocyte recruitment into thermogenic adipose depots. At least, three functions of macrophages have been linked to nonshivering thermogenesis. First, interactions between *Vcam1* on trMacs and integrin  $\alpha$ 4 on adipocytes control UCP1-dependent thermogenesis. Second, trMacs associated to peripheral nervous nerves can control the sympathetic tone by regulating *SEMA6A*-*PLXNA4* interactions and associated neuronal density or by uptaking and degrading norepinephrine (NE) through *SLC6A2* and *MAOA*, respectively.

thermogenesis regulation [70]. Overall, macrophages could be harnessed to fuel adipose tissue thermogenesis, facilitating fat burning and limiting obesity-associated comorbidities.

### 3. Liver macrophages in non-alcoholic fatty liver disease

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) encompasses two major clinical phenotypes, non-alcoholic fatty liver (NAFL) and non-alcoholic steatohepatitis (NASH). While NAFL has a limited impact on overall health, progression to NASH and its evolution towards cirrhosis and even hepatocellular carcinoma in some cases is life-threatening [71,72]. Steatosis, ballooning and inflammation, sometimes accompanied by fibrosis, are the key features typifying the development of NASH. While obesity contributes to NASH onset, NASH is now recognized as an independent risk factor for cardiovascular diseases. Thus, there is a strong interplay between the 3 pathological states of cardiometabolic disease.

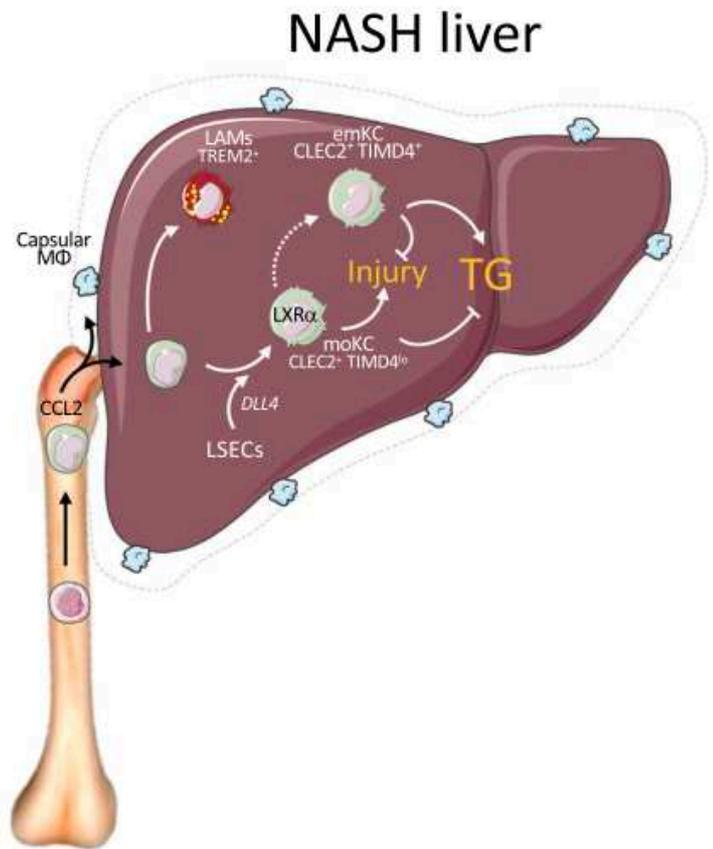
Hepatic injury during NASH is associated with the accumulation and activation of immune cells, including macrophages. However, while *trMac* inhabit the steady state liver, liver macrophage become more diverse during disease, and we are only starting to better appreciate such complexity and how this could impact on disease onset and progression.

#### 3.1. Origins and roles of liver macrophage subsets during NASH

KCs are the liver *trMac* population located in hepatic sinusoids, at the interface between the liver parenchyma and the blood circulation. Recently, a second liver *trMac* subset, located in the liver capsule was described [73]. While KCs develop during embryogenesis and maintain in the adult independently from the circulating monocyte pool [74–78], capsular Macs seem constantly replenished by monocytes [73] (Fig. 3).

Although embryonic KCs (emKCs) self-renew to maintain on the long-term, they can be replaced by monocyte-derived cells following their non-physiologic depletion [79–81]. Such monocyte-derived KCs (moKCs) eventually adopt a phenotype very similar to their emKCs counterparts [79–81] (Fig. 3). EmKCs depletion studies allowed to probe the sequence of moKCs generation and how liver stromal cells, especially liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) and hepatic stellate cells (HSCs), provided the cues necessary for KC specification at the enhancer and transcriptional levels [80,82]. Indeed, as an example, the Notch ligand *DLL4* produced by LSECs and HSCs [82] was critical to activate the emKC lineage-determining factor *LXRα* [80], recently described to control homeostatic emKC survival [83], and forge KC identity [80,82].

Upon hepatic injury, as occurring during NASH, circulating blood monocytes are recruited to the liver parenchyma where they can differentiate into macrophages and participate to the liver macrophage pool (Fig. 3). We and others recently described liver macrophages diversity in mouse models of NASH [84–86]. Single cell RNAseq analysis of liver leucocytes revealed distinct macrophages populations in NASH [84,85]. First, it highlighted a population of KC with low *Timd4* expression [84,85], similar to the vast majority of moKCs generated following emKCs depletion [80–82], suggesting moKCs were present during NASH. We came to a similar observation by fate-mapping monocytes and uncovering their participation to the KC pool during NASH [86]. We also provided evidence that emKCs were enriched in genes associated with lipotoxicity during NASH and were more prone to cell death [86]. Conversely, protecting emKCs from cell death limited moKCs generation during NASH [86]. Such KC diversity was also revealed by flow cytometry. Cell surface markers specific for KCs, such as *CLEC4F*, *VSIG4*, *TIMD4* and *CLEC2*, were instrumental to isolate KCs during NASH. Among those markers, we used *CLEC2*, the most rapidly induced KC-specific marker during monocyte to moKC differentiation [81], which proved efficient to selectively identify emKCs but also and above all moKCs in contrast to *VSIG4*, *CLEC4* and *TIMD4* [86]. Overall, *CLEC2* better capture KCs in their diversity as compared to other classical KC markers. When compared at the transcriptional level, moKC were more inflammatory than emKCs and did not acquire the full gene



**Fig. 3.** Liver macrophage heterogeneity in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Tissue resident Kupffer cells of embryonic origin (emKCs) are located in hepatic sinusoids while another population of capsular macrophages surrounds the liver. Upon hepatic injury, a large number of circulating bone marrow-derived monocytes enter the liver where they differentiate into Kupffer cells (moKCs). Their differentiation is supported in part by the Notch ligand *DLL4* secreted by sinusoidal endothelial cells (LSECs). The liver X receptor (*LXRα*) is critical to forge KC identity. As compared to moKCs, emKCs are less inflammatory and have a better ability to facilitate hepatic triglyceride storage as well as to limit hepatic injury. A subset of *TREM2*<sup>+</sup> moMacs, resembling to the lipid-associated macrophages (LAMs), also accumulates during NASH.

spectrum associated with emKCs accessory functions, notably erythrophagocytosis [86]. We also compared the functional impact of moKCs versus emKCs on NASH initiation and observed that mice mostly carrying emKCs were limited in their ability to safely store hepatic triglycerides, leading to increased liver injury [86] (Fig. 3). Thus, while they replenished the KC pool, moKC are not as protective as their emKC counterparts.

In addition, scRNAseq revealed that macrophages characterized by the expression of *Spp1*, *Itgax*, *Gprmb*, *Cd9* and *Trem2* (among other markers), which resemble to the lipid-associated macrophages (LAMs) described in obesity [37], accumulated during NASH [26,84,85,87]. LAMs are derived from monocytes, dominate in number the inflammatory infiltrate observed in steatohepatitis and were localized in crown-like structures [26]. However, their impact on NASH, as a definite cell type, remains to be determined. Previous studies made use of *Ccr2*-deficient mice that lack monocyte-derived cells, including moKCs and LAMs, and revealed these mice were protected from NASH [88]. Along these lines, cenicriviroc, a dual *CCR2/CCR5* inhibitor currently under evaluation for the treatment of NASH in humans, was shown to limit NASH development in mice and especially fibrosis [89–91]. In addition, osteopontin (encoded by *Spp1*) has been shown to promote NASH development and fibrosis [92,93]. However, since cholangiocytes are the main source of osteopontin in the liver [94] and 20% of LAMs are osteopontin positive at most [84], the functional impact of

LAMs-derived osteopontin on NASH pathology and associated fibrosis remains to be validated. By contrast, TREM2, one of the typical LAM markers (Fig. 3), seems protective in diet-induced obesity [37], but also liver diseases [95,96]. Thus, as LAMs can express genes known for their opposite effect on NASH physiopathology, further study will be needed to better appreciate how they impact on liver injury during NASH.

As mentioned above, CLEC2 was instrumental to identify KCs whatever their origin and stage of differentiation [86]. CLEC2 was further recognized as a marker allowing moKCs identification in their very early differentiation phase [84], when they are very similar in phenotype to LAMs. At this stage, depending on the gating strategy used, part of moKCs can be found in the LAM gate. Along these lines, we reported that moKCs, when compared to emKCs, were enriched in genes used to define LAMs (*Cd9*, *Itgax*, *Gprmb*) [86]. In addition, several LAMs markers were also induced by emKCs, albeit to a lesser extent than moKCs, during NASH [86]. Thus, the LAM signature seems to encompass diverse macrophage subsets during NASH and could be viewed as a meta-inflammation (“metabolic inflammation” [8]) signature.

### 3.2. Zonation of liver macrophages

In the steady state liver, KCs, which reside in liver sinusoids, were shown to have a preferential tropism toward portal veins (PVs) rather than central veins [97]. KCs concentrate around PVs in response to a chemokine gradient depending on CXCL9, produced by LSECs, and its receptor CXCR3 on KCs [97]. Mechanistically, periportal CXCL9 expression depended on the gut microbiota and its sensing through Myd88 signaling in LSECs [97].

Such proximity to the portal regions suggests KCs may have an important role in the communication axis operating between the gut and the liver. Indeed, KCs may impact on liver homeostasis by sensing and responding to mediators and metabolites present in the portal circulation and that eventually reach the liver. It was indeed previously reported that KCs internalize bacteria-derived metabolites released in the portal circulation [98]. More recently microbiota-derived D-lactate was shown to control KC ability to capture and kill blood-borne pathogens [99]. Finally, altering KCs tropism to portal regions impaired bacterial clearance by the liver and the host ability to combat infection [97]. All together, these studies highlighted the importance of microbiota-derived signals in the control of KCs zonation and function, which in turn were critical to efficiently clear bacteria and fight against infection.

During NASH, moKCs were shown to localize to hepatic sinusoids, similar to their emKCs counterparts. Whether KC subsets tropism towards PVs and ability to capture and kill bacteria are altered in NASH livers still remain to be evaluated. By contrast to KC subsets, monocyte-derived LAMs were present in the parenchyma [84,85] and enriched in regions of high desmin<sup>+</sup> HSC density [84]. This suggests LAMs are involved in a crosstalk with HSCs that this might alter HSCs fibrogenic functions and impact on liver fibrosis (Fig. 3). Thus, liver macrophage subsets seem to occupy specific anatomical niches depending on their origins and this might be crucial for their regulatory functions.

### 3.3. Metabolic regulation of liver macrophages

So far, little is known regarding the cellular metabolic features of KCs during homeostasis and disease. LXR $\alpha$  was recently described as a key transcription factor controlling both KC specification and survival at the steady state and during NASH [80,83,85]. LXR $\alpha$  is a nuclear receptor known to control lipid homeostasis in macrophages and its ligands include oxysterols and desmosterol [100]. Thus, in the lipid-rich environment of the liver, cholesterol-derivatives sensing by LXR $\alpha$  is crucial to maintain KCs survival and identity.

KCs are well known to efficiently break down old and damaged red blood cells [101]. Iron is an essential component of erythrocytes that KC must need to handle and safely metabolize for detoxification at the

steady state. Interestingly, a transient population of moMac<sup>s</sup> that resemble moKCs was shown to participate to red blood cells ingestion after intravenous injection of senescent erythrocytes [102]. The differentiation of this moKC subset depends on the antioxidant transcription factor Nrf2 and expresses high level of the iron-regulated transporter ferroportin 1 (FPN1, encoded by *Slc40a1*) that can recycle iron towards hepatocytes [102]. Whether KC-mediated erythrophagocytosis impacts NASH pathogenesis has not been studied yet.

Overall, our understanding of the cellular metabolic fluxes that control KC maintenance and functions remain to be studied.

## 4. Macrophages in atherosclerosis

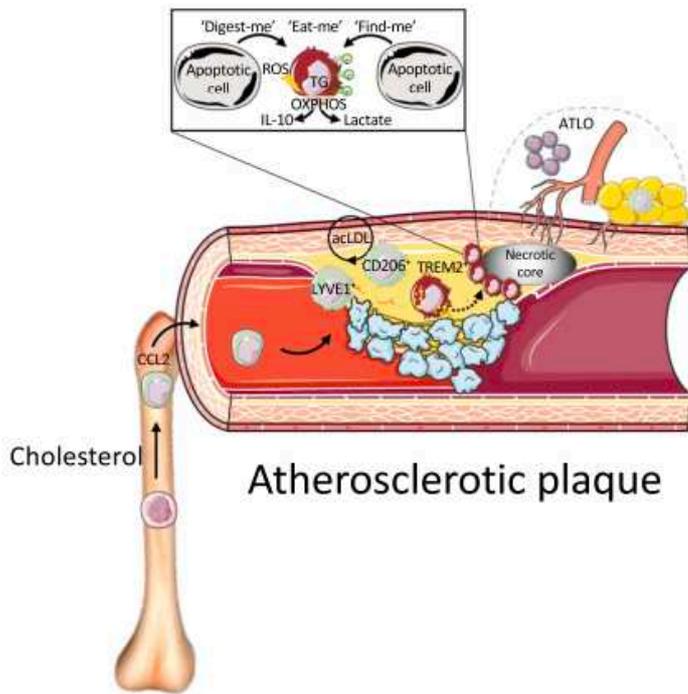
The pathogenesis of atherosclerosis begins with the accumulation and retention of cholesterol derived from lipoproteins within the vascular subendothelium [103]. This initiates a local inflammatory response dominated by macrophages.

### 4.1. Origin of atherosclerotic plaque macrophage subsets in atherosclerosis

The inflammatory response was originally restricted to macrophage defective lipid handling or an imbalance between pro-inflammatory “M1” macrophages and anti-inflammatory “M2” macrophages [100, 103–105]. Indeed, a key function of atherosclerotic plaque macrophages (APMs) has been attributed to their ability to handle lipids and clear apoptotic or even necrotic debris in a hypoxic and oxidative environment. Despite the ability of APMs to expand by in situ proliferation [106], pioneer studies have also revealed the requirement of inflammatory monocyte infiltration into the vessel wall for the initiation and progression of atherosclerosis [107–109]. We and others also found that atherogenic stimuli, such as hypercholesterolemia for instance, triggered bone marrow myelopoiesis supporting the hypothesis that the expansion of APMs in atherosclerosis partly originated from circulating monocytes as reviewed elsewhere [100,105] (Fig. 4). Of note, in humans, circulating monocytes have also been positively correlated with cardiovascular events [110–113]. Thus, the APM pool may rely on both trMac<sup>s</sup> expansion and moMac<sup>s</sup> infiltration. Overall, severe deficiency of monocytes and macrophages in osteopetrotic (*op/op*) mice, lacking the macrophage colony stimulating factor 1 (CSF1), led to protection against hypercholesterolemia-induced atherosclerosis [114–116]. Thus, clearing macrophages from the intimal space by inducing their death could limit atherosclerotic plaque burden. However, induction of macrophage apoptosis at an early or late stage of atherosclerosis development has revealed a more complex scenario [117]. Indeed, while efficient clearance of dying macrophages through efferocytosis at the early stage of the pathology is operative and limits plaque development, macrophage death at later stages is deleterious as efferocytosis become dysfunctional as plaques progress. Consistently, an imbalance between macrophage apoptosis and efferocytosis has been observed in advanced atherosclerosis lesions leading to secondary necrosis and formation of necrotic core [118] (Fig. 4). Overall, macrophages with different origins support the development and progression of the atherosclerotic plaque. However, in addition to their developmental diversity, the atherosclerotic plaque environment may also reprogram APMs and promote their functional diversity.

### 4.2. Diversity of atherosclerotic plaque macrophages in atherosclerosis

As recently summarized, scRNAseq and Cytometry by Time of Flight (CyTOF) technologies have recently extended our ability to comprehend immune cell diversity in atherosclerotic plaques [119]. Indeed, multiple studies applied scRNAseq to CD45<sup>+</sup> immune cells isolated from human plaque samples of endarterectomy patients [120] and to aortic cells extracted from control and atherosclerotic mice [121–125] in the past few years. Briefly, three APM subsets have been identified, considerably



**Fig. 4.** Atherosclerotic plaque macrophage heterogeneity in atherosclerosis. Hypercholesterolemia and modified low-density lipoprotein favor local and peripheral inflammation in atherosclerosis. It triggers bone marrow myelopoiesis supporting the hypothesis that the expansion of atherosclerotic plaque macrophages (APMs) partly originated from circulating monocytes. At least three APM subsets have been identified but their origin and function remain poorly understood. CD206<sup>+</sup> APMs could be tissue resident macrophages of embryonic origin, similar to the LYVE1<sup>+</sup> APMs that resemble the tissue-resident macrophages in close contact to blood vessels observed in other tissues. The TREM2<sup>+</sup> APM subset has been identified as the one becoming foam cells and is expected to localize around the necrotic core where they may primarily exert their phagocytic function. An increased number of macrophages has also been identified in artery tertiary lymphoid organs (ATLOs) but their role remains to be clarified.

changing the paradigm in the field. Despite the common use of the mannose receptor (MRC1 or CD206) as a canonical marker of alternatively activated anti-inflammatory macrophages, a CD206<sup>+</sup> APM subset unexpectedly expressed some markers of inflammation. It is yet unknown if this subset derived from recruited monocytes, which could partly explain the inflammatory status. A resident LYVE1<sup>+</sup> APM subset [126] was also identified and could reflect the population of macrophages in close contact to blood vessels found in several tissues [127], which are specialized to detect and phagocytose invading pathogens. Interestingly, similar to obese adipose tissue and fatty liver, a TREM2<sup>+</sup> APM subset has been characterized as the one becoming foam cells [121, 124]. Thus, one could expect the localization of this subset to be in close contact to the necrotic core, similar to their localization in the CLS of the adipose tissue, in order to clear lipids and cell debris (Fig. 4). Further investigation is now needed to decipher the developmental connection between APM subsets, highlight their zonation and assigned them with specific functions. Such work would uncover their potential roles in tissue inflammation and repair, and eventually understand how they participate to plaque remodeling.

#### 4.3. Metabolic rewiring of efferocytosis in atherosclerosis

We and others have extensively reviewed the immunometabolic regulation of macrophages, including during atherosclerosis, over the last few years [100,128–132]. We will thus only briefly summarize the recent and emerging role metabolism plays during efferocytosis and its consequence on the disease. Impaired efferocytosis is thought to be a

major mechanism driving plaque progression [133,134] and a process requiring an exquisite metabolic adaptation to face the huge amounts of excess cholesterol APM face in this context [135,136]. Recently, a novel solute carrier (SLC) program induced upon efferocytosis was shown to support early glucose uptake and subsequent lactate release, influencing surrounding cells [137] (Fig. 4). Consequently, specific deficiency of Slc2a1 in macrophages, their main glucose transporter, increased necrotic core area [137,138]. Besides glycolysis, the requirement of mitochondrial complex III and oxidative phosphorylation (OXPHOS) to the resolution of inflammation post efferocytosis was also recently uncovered [139] (Fig. 4). Interestingly, respiratory chain dysfunction was previously linked to enhanced mitochondrial oxidative stress, and this correlates with the progression of human and mouse atherosclerotic lesions [140]. Defective macrophage uncoupling protein 2 (UCP2)-dependent proton leaks following OXPHOS was also shown to be detrimental in atherosclerosis, in part by impairing efferocytosis [141–144]. We recently identified an upstream role of the lysosomal acid lipase (LIPA) in hydrolyzing fatty acid and cholesterol during efferocytosis [145]. This reprogrammed the mitochondria for efficient OXPHOS and in turn promoted continued clearance of apoptotic cells [145]. Consistently, TFEB, the master regulator of the autophagy-lysosomal program, protected against atherosclerosis in part by enhancing the degradative capacity of macrophages [146]. These findings highlight the importance of the two major metabolic routes (i.e. glycolysis and fatty acid oxidation) during efferocytosis and their impact on the metabolic inflammation observed in atherosclerosis. Importantly, metabolites released from apoptotic cells can also participate to the metabolic rewiring observed during efferocytosis [147]. For instance, arginine derived from apoptotic cells can be metabolized into the putrescine pathway to prepare cytoskeletal rearrangement and favor continual efferocytosis [148]. Although deficiency of myeloid Arginase 1 in mouse model of atherosclerosis was not sufficient to affect plaque development, it clearly limited plaque regression [148,149], during which efferocytosis is likely to play a leading role in clearing the intima space from cell debris. Thus, different metabolic pathways control the APM efferocytic response, highlighting their central immunometabolic role in atherosclerosis.

#### 4.4. Adventitial macrophages as part of the atherosclerotic plaque macrophage network

The progressive increase of macrophages, among other immune cells, in the adventitia surrounding arteries contributes to the development of organized artery tertiary lymphoid organs (ATLOs) as reviewed elsewhere [150,151] (Fig. 4). The role of macrophages, arising from both embryonic precursor and circulating monocytes after birth [152], in these structures remains poorly understood. Inflammation could also trigger the recruitment of myeloid cells to these structures [153,154]. To speculate about the role of ATLOs macrophages, we can make a parallel with the fat-associated lymphoid clusters (FALCs) described in the adipose tissue. In FALCs, monocyte-derived macrophages that express TNF $\alpha$  may participate to the communication with stromal cells [155]. Among stromal cells, the immediate connective tissue coat contains myofibroblasts, a loose network of extracellular matrix components, small blood and lymph vessels as well as adrenergic nerve axons. Thus, although ill defined, regulation of these adventitial constituents by immune cells could support arterial wall homeostasis, neuronal sensing and deliverance of nutrients and oxygen from small blood vessels to medium- and large-sized arteries [156,157]. While the topic has not been widely covered so far, it is expected to see an increase in studies aimed at identifying the role of adventitial macrophages in the future.

#### 5. Concluding remarks

Over the last decades, an explosion of fate-mapping approaches and imaging modalities to assess the origin, zonation and behavior of macrophages has provided new insights into the versatility of macrophages

in metabolic tissues such as the adipose tissue, liver and arterial wall at steady state or during cardiometabolic diseases. One of the common denominators in cardiometabolic diseases is the defect in the macrophage capacity to limit ectopic lipid storage in metabolic tissues during pathological states. However, challenges remain as to whether macrophage metabolic rewiring is causal to this defect. For instance, future works will be required to delineate the critical ying and yang function of the newly identified TREM2<sup>+</sup> moMac subset in cardiometabolic diseases. Another important defective process in pathological metabolic tissue is the defect in efferocytosis that limit the clearance of apoptotic cells present in fatty tissues. One of the simple explanations could be that handling of lipid deposition by macrophage could compete with their efferocytic function. However, macrophages are known to eat something bigger than their head [158]. Thus, understanding which macrophage subset sense the nutritional or necrotic status of the disease tissues will greatly benefit the development of new strategies aimed at targeting specialized macrophage subset in cardiometabolic diseases.

### Financial support

LYC was supported by grants from the Fondation de France (FDF), the National Agency for Research (ANR) and the European Research Council (ERC) consolidator program (ERC2016COG724838). ELG was supported by grants from the city of Paris (Programme Emergence), the Fondation de France and the National Agency for Research (ANR; ANR-17-CE14-0009-02, ANR-17-CE14-0023-01 and ANR-20-CE15-0018-02).

### Disclosures

The authors have declared that no conflict of interest exists.

### References

- E.L. Gautier, L. Yvan-Charvet, Understanding macrophage diversity at the ontogenic and transcriptomic levels, *Immunol. Rev.* 262 (2014) 85–95, <https://doi.org/10.1111/imr.12231>.
- D.M. Mosser, J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 958–969, <https://doi.org/10.1038/nri2448>.
- A. Sica, A. Mantovani, Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 787–795, <https://doi.org/10.1172/JCI59643>.
- P.R. Taylor, S. Gordon, Monocyte heterogeneity and innate immunity, *Immunity* 19 (2003) 2–4, [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(03\)00178-x](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(03)00178-x).
- E.L. Gautier, T. Shay, J. Miller, M. Greter, C. Jakubzick, S. Ivanov, J. Helt, A. Chow, K.G. Elpek, S. Gordonov, A.R. Mazloom, A. Ma'ayan, W.-J. Chua, T. H. Hansen, S.J. Turley, M. Merad, G.J. Randolph, Immunological Genome Consortium, Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages, *Nat. Immunol.* 13 (2012) 1118–1128, <https://doi.org/10.1038/ni.2419>.
- Y. Lavin, D. Winter, R. Blecher-Gonen, E. David, H. Keren-Shaul, M. Merad, S. Jung, I. Amit, Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment, *Cell* 159 (2014) 1312–1326, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.018>.
- D. Gosselin, V.M. Link, C.E. Romanoski, G.J. Fonseca, D.Z. Eichenfield, N. J. Spann, J.D. Stender, H.B. Chun, H. Garner, F. Geissmann, C.K. Glass, Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities, *Cell* 159 (2014) 1327–1340, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.023>.
- G.S. Hotamisligil, Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders, *Nature* 542 (2017) 177–185, <https://doi.org/10.1038/nature21363>.
- H.M. Silva, A. Báfica, G.F. Rodrigues-Luiz, J. Chi, P. d'Emery, A. Santos, B.S. Reis, D.P. Hoytema van Konijnenburg, A. Crane, R.D.N. Arifa, P. Martin, D.A.G. B. Mendes, D.S. Mansur, V.J. Torres, K. Cadwell, P. Cohen, D. Mucida, J. J. Lafaille, Vasculature-associated fat macrophages readily adapt to inflammatory and metabolic challenges, *J. Exp. Med.* 216 (2019) 786–806, <https://doi.org/10.1084/jem.20181049>.
- S.F. Hassnain Waqas, A. Noble, A.C. Hoang, G. Ampem, M. Popp, S. Strauß, M. Guille, T. Röszer, Adipose tissue macrophages develop from bone marrow-independent progenitors in *Xenopus laevis* and mouse, *J. Leukoc. Biol.* 102 (2017) 845–855, <https://doi.org/10.1189/jlb.1A0317-082RR>.
- S. Nishimura, I. Manabe, M. Nagasaki, K. Eto, H. Yamashita, M. Ohsugi, M. Otsu, K. Hara, K. Ueki, S. Sugiura, K. Yoshimura, T. Kadowaki, R. Nagai, CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity, *Nat. Med.* 15 (2009) 914–920, <https://doi.org/10.1038/nm.1964>.
- S.P. Weisberg, D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, A.W. Ferrante, Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 1796–1808, <https://doi.org/10.1172/JCI9246>.
- H. Xu, G.T. Barnes, Q. Yang, G. Tan, D. Yang, C.J. Chou, J. Sole, A. Nichols, J. S. Ross, L.A. Tartaglia, H. Chen, Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 1821–1830, <https://doi.org/10.1172/JCI9451>.
- A. Christ, P. Günther, M.A.R. Lauterbach, P. Duewell, D. Biswas, K. Pelka, C. J. Scholz, M. Oosting, K. Haendler, K. Bagler, K. Klee, J. Schulte-Schrepping, T. Ulas, S.J.C.F.M. Moorlag, V. Kumar, M.H. Park, L.A.B. Joosten, L.A. Groh, N. P. Riksen, T. Espevik, A. Schlitzer, Y. Li, M.L. Fitzgerald, M.G. Netea, J. L. Schultze, E. Latz, Western Diet Triggers NLRP3-Dependent Innate Immune Reprogramming, *Cell* 172 (2018) 162–175.e14, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.013>.
- N.S. Chandel, H. Jasper, T.T. Ho, E. Passequé, Metabolic regulation of stem cell function in tissue homeostasis and organismal ageing, *Nat. Cell Biol.* 18 (2016) 823–832, <https://doi.org/10.1038/nch3385>.
- L. Oburoglu, M. Romano, N. Taylor, S. Kinet, Metabolic regulation of hematopoietic stem cell commitment and erythroid differentiation, *Curr. Opin. Hematol.* 23 (2016) 198–205, <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000234>.
- O. Matilainen, P.M. Quirós, J. Auwerx, Mitochondria and Epigenetics - Crosstalk in Homeostasis and Stress, *Trends Cell Biol.* 27 (2017) 453–463, <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.02.004>.
- T. Próchnicki, E. Latz, Inflammasomes on the crossroads of innate immune recognition and metabolic control, *Cell Metab.* 26 (2017) 71–93, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.018>.
- K.V. Swanson, M. Deng, J.P.-Y. Ting, The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics, *Nat. Rev. Immunol.* 19 (2019) 477–489, <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>.
- S.P. Weisberg, D. Hunter, R. Huber, J. Lemieux, S. Slaymaker, K. Vaddi, I. Charo, R.L. Leibel, A.W. Ferrante, CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 115–124, <https://doi.org/10.1172/JCI24335>.
- S.U. Amano, J.L. Cohen, P. Vangala, M. Tencerova, S.M. Nicoloso, J.C. Yaw, Y. Shen, M.P. Czech, M. Aouadi, Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation, *Cell Metab.* 19 (2014) 162–171, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.017>.
- H. Kanda, S. Tateya, Y. Tamori, K. Kotani, K. Hiasa, R. Kitazawa, S. Kitazawa, H. Miyachi, S. Maeda, K. Egashira, M. Kasuga, MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 1494–1505, <https://doi.org/10.1172/JCI26498>.
- D. Patouris, P.-P. Li, D. Thapar, J. Chapman, J.M. Olefsky, J.G. Neels, Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals, *Cell Metab.* 8 (2008) 301–309, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.08.015>.
- C. Zheng, Q. Yang, C. Xu, P. Shou, J. Cao, M. Jiang, Q. Chen, G. Cao, Y. Han, F. Li, W. Cao, L. Zhang, L. Zhang, Y. Shi, Y. Wang, CD11b regulates obesity-induced insulin resistance via limiting alternative activation and proliferation of adipose tissue macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112 (2015) E7239–E7248, <https://doi.org/10.1073/pnas.1500396113>.
- H. Zhang, C.C. Hinkle, S.M. O'Neill, J. Shi, J. Caughey, E. Lynch, G. Lynch, M. Gerelus, A.S.D. Tsai, R. Shah, J.F. Fergusson, R.S. Ahima, M.P. Reilly, Synergistic modulation of inflammatory but not metabolic effects of high-fat feeding by CCR2 and CX3CR1, *Obes. (Silver Spring)* 25 (2017) 1410–1420, <https://doi.org/10.1002/oby.21900>.
- S. Daemen, A. Gainullina, G. Kalugotla, L. He, M.M. Chan, J.W. Beals, K.H. Liss, S. Klein, A.E. Feldstein, B.N. Finck, M.N. Artyomov, J.D. Schilling, Dynamic shifts in the composition of resident and recruited macrophages influence tissue remodeling in NASH, *Cell Rep.* 34 (2021), 108626, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108626>.
- Y. Kawano, J. Nakae, N. Watanabe, T. Kikuchi, S. Tateya, Y. Tamori, M. Kaneko, T. Abe, M. Onodera, H. Itoh, Colonic pro-inflammatory macrophages cause insulin resistance in an intestinal Ccl2/Ccr2-dependent manner, *Cell Metab.* 24 (2016) 295–310, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.07.009>.
- C.N. Lumeng, J.L. Bodzin, A.R. Saltiel, Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 175–184, <https://doi.org/10.1172/JCI29881>.
- C.N. Lumeng, J.B. DelProposto, D.J. Westcott, A.R. Saltiel, Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes, *Diabetes* 57 (2008) 3239–3246, <https://doi.org/10.2337/db08-0872>.
- S. Cinti, G. Mitchell, G. Barbatelli, I. Murano, E. Ceresi, E. Faloia, S. Wang, M. Fortier, A.S. Greenberg, M.S. Obin, Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans, *J. Lipid Res.* 46 (2005) 2347–2355, <https://doi.org/10.1194/jlr.M500294-JLR200>.
- I. Murano, G. Barbatelli, V. Parisani, C. Latini, G. Muzzonigro, M. Castellucci, S. Cinti, Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 1562–1568, <https://doi.org/10.1194/jlr.M800019-JLR200>.
- K.J. Strissel, Z. Stancova, H. Miyoshi, J.W. Perfield, J. DeFuria, Z. Jick, A. S. Greenberg, M.S. Obin, Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications, *Diabetes* 56 (2007) 2910–2918, <https://doi.org/10.2337/db07-0767>.
- S. Arandjelovic, K.S. Ravichandran, Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis, *Nat. Immunol.* 16 (2015) 907–917, <https://doi.org/10.1038/ni.3253>.

- [34] C.Z. Han, K.S. Ravichandran, Metabolic connections during apoptotic cell engulfment, *Cell* 147 (2011) 1442–1445, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.006>.
- [35] J. Braune, U. Weyer, C. Hobusch, J. Mauer, J.C. Brünning, I. Bechmann, M. Gericke, IL-6 regulates M2 polarization and local proliferation of adipose tissue macrophages in obesity, *J. Immunol.* 198 (2017) 2927–2934, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600476>.
- [36] D.A. Hill, H.-W. Lim, Y.H. Kim, W.Y. Ho, Y.H. Foong, V.L. Nelson, H.C.B. Nguyen, K. Chegireddy, J. Kim, A. Haberthuer, P. Vallabhajosyula, T. Kambayashi, K.-J. Won, M.A. Lazar, Distinct macrophage populations direct inflammatory versus physiological changes in adipose tissue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115 (2018) E5096–E5105, <https://doi.org/10.1073/pnas.1802611115>.
- [37] D.A. Jaitin, L. Adlung, C.A. Thaiss, A. Weiner, B. Li, H. Descamps, P. Lundgren, C. Blierot, Z. Liu, A. Deczkowska, H. Keren-Shaul, E. David, N. Zmora, S.M. Eldar, N. Lubetzky, O. Shibolet, D.A. Hill, M.A. Lazar, M. Colonna, F. Ginhoux, H. Shapiro, E. Elinav, I. Amit, Lipid-associated macrophages control metabolic homeostasis in a Trem2-dependent manner, *Cell* 178 (2019) 686–698.e14, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.054>.
- [38] A. Weinstock, E.J. Brown, M.L. Garabedian, S. Pena, M. Sharma, J. Lafaille, K. J. Moore, E.A. Fisher, Single-cell RNA sequencing of visceral adipose tissue leukocytes reveals that caloric restriction following obesity promotes the accumulation of a distinct macrophage population with features of phagocytic cells, *Immunometabolism* 1 (2019), <https://doi.org/10.20900/immunometab20190008>.
- [39] M. Kratz, B.R. Coats, K.B. Hisert, D. Hagman, V. Mutskov, E. Peris, K. Q. Schoenfeld, J.N. Kuzma, I. Larson, P.S. Billing, R.W. Landerholm, M. Crouthamel, D. Gozal, S. Hwang, P.K. Singh, L. Becker, Metabolic dysfunction drives a mechanistically distinct proinflammatory phenotype in adipose tissue macrophages, *Cell Metab.* 20 (2014) 614–625, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.08.010>.
- [40] P. Kotzbeck, A. Giordano, E. Mondini, I. Murano, I. Severi, V. Venema, M. P. Cecchini, E.E. Kershaw, G. Barbatelli, G. Haemmerle, R. Zechner, S. Cinti, Brown adipose tissue whitening leads to brown adipocyte death and adipose tissue inflammation, *J. Lipid Res.* 59 (2018) 784–794, <https://doi.org/10.1194/jlr.M079665>.
- [41] S.E. Flaherty, A. Grijalva, X. Xu, E. Ables, A. Noman, A.W. Ferrante, A lipase-independent pathway of lipid release and immune modulation by adipocytes, *Science* 363 (2019) 989–993, <https://doi.org/10.1126/science.aaw2586>.
- [42] C. Crewe, P.E. Scherer, Intercellular and interorgan crosstalk through adipocyte extracellular vesicles, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* (2021), <https://doi.org/10.1007/s11154-020-09625-x>.
- [43] J.R. Brestoff, C.B. Wilen, J.R. Moley, Y. Li, W. Zou, N.P. Malvin, M.N. Rowen, B. T. Saunders, H. Ma, M.R. Mack, B.L. Hykes, D.R. Balce, A. Orvedahl, J. W. Williams, N. Rohatgi, X. Wang, M.R. McAllister, S.A. Handley, B.S. Kim, J. G. Doench, B.H. Zinselmeyer, M.S. Diamond, H.W. Virgin, A.E. Gelman, S. L. Teitelbaum, Intercellular mitochondria transfer to macrophages regulates white adipose tissue homeostasis and is impaired in obesity, *Cell Metab.* 33 (2021) 270–282.e8, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.11.008>.
- [44] S. Jordan, N. Tung, M. Casanova-Acebes, C. Chang, C. Cantoni, D. Zhang, T. H. Wirtz, S. Naik, S.A. Rose, C.N. Brocker, A. Gainullina, D. Hornburg, S. Hornig, B.B. Maier, P. Cravedi, D. LeRoith, F.J. Gonzalez, F. Meissner, J. Ochando, A. Rahman, J.E. Chipuk, M.N. Artyomov, P.S. Frenette, L. Piccio, M.-L. Berres, E. J. Gallagher, M. Merad, Dietary intake regulates the circulating inflammatory monocyte pool, *Cell* 178 (2019) 1102–1114.e17, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.050>.
- [45] L. Yvan-Charvet, S. Ivanov, Metabolic reprogramming of macrophages in atherosclerosis: is it all about cholesterol? *J. Lipid Atheroscler.* 9 (2020) 231–242, <https://doi.org/10.12997/jla.2020.9.2.231>.
- [46] N. van Teijlingen Bakker, E.J. Pearce, Cell-intrinsic metabolic regulation of mononuclear phagocyte activation: findings from the tip of the iceberg, *Immunol. Rev.* 295 (2020) 54–67, <https://doi.org/10.1111/imr.12848>.
- [47] X. Xu, A. Grijalva, A. Skowronski, M. van Eijk, M.J. Serlie, A.W. Ferrante, Obesity activates a program of lysosomal-dependent lipid metabolism in adipose tissue macrophages independently of classic activation, *Cell Metab.* 18 (2013) 816–830, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.11.001>.
- [48] X. Wei, H. Song, L. Yin, M.G. Rizzo, R. Sidhu, D.F. Covey, D.S. Ory, C. F. Semenkovich, Fatty acid synthesis configures the plasma membrane for inflammation in diabetes, *Nature* 539 (2016) 294–298, <https://doi.org/10.1038/nature20117>.
- [49] R.G. Carroll, Z. Zaslona, S. Galván-Peña, E.L. Koppe, D.C. Sévin, S. Angiari, M. Triantafyllou, K. Triantafyllou, L.K. Modis, L.A. O'Neill, An unexpected link between fatty acid synthase and cholesterol synthesis in proinflammatory macrophage activation, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 5509–5521, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001921>.
- [50] G.I. Lancaster, K.G. Langley, N.A. Berglund, H.L. Kammoun, S. Reibe, E. Estevez, J. Weir, N.A. Mellett, G. Pernes, J.R.W. Conway, M.K.S. Lee, P. Timpson, A. J. Murphy, S.L. Masters, S. Gerondakis, N. Bartonicek, D.C. Kaczorowski, M. E. Dinger, P.J. Meikle, P.J. Bond, M.A. Febbraio, Evidence that TLR4 is not a receptor for saturated fatty acids but mediates lipid-induced inflammation by reprogramming macrophage metabolism, *Cell Metab.* 27 (2018) 1096–1110.e5, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.03.014>.
- [51] J.D. Schilling, H.M. Machkovech, L. He, A. Diwan, J.E. Schaffer, TLR4 activation under lipotoxic conditions leads to synergistic macrophage cell death through a TRIF-dependent pathway, *J. Immunol.* 190 (2013) 1285–1296, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202208>.
- [52] M.S. Han, D.Y. Jung, C. Morel, S.A. Lakhani, J.K. Kim, R.A. Flavell, R.J. Davis, JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation, *Science* 339 (2013) 218–222, <https://doi.org/10.1126/science.1227568>.
- [53] E.T. Chouchani, L. Kazak, B.M. Spiegelman, New advances in adaptive thermogenesis: UCP1 and beyond, *Cell Metab.* 29 (2019) 27–37, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.002>.
- [54] R.B. Burl, V.D. Ramseyer, E.A. Rondini, R. Pique-Regi, Y.-H. Lee, J.G. Granneman, Deconstructing adipogenesis induced by  $\beta$ 3-adrenergic receptor activation with single-cell expression profiling, *Cell Metab.* 28 (2018) 300–309.e4, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.025>.
- [55] Y.-H. Lee, A.P. Petkova, J.G. Granneman, Identification of an adipogenic niche for adipose tissue remodeling and restoration, *Cell Metab.* 18 (2013) 355–367, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.08.003>.
- [56] Y.-H. Lee, S.-N. Kim, H.-J. Kwon, K.R. Maddipati, J.G. Granneman, Adipogenic role of alternatively activated macrophages in  $\beta$ -adrenergic remodeling of white adipose tissue, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 310 (2016) R55–R65, <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00355.2015>.
- [57] Y.-H. Ho, R. Del Toro, J. Rivera-Torres, J. Rak, C. Korn, A. García-García, D. Macías, C. González-Gómez, A. Del Monte, M. Wittner, A.K. Waller, H. R. Foster, C. López-Otín, R.S. Johnson, C. Nerlov, C. Ghevaert, W. Vainchenker, F. Louache, V. Andrés, S. Méndez-Ferrer, Remodeling of bone marrow hematopoietic stem cell niches promotes myeloid cell expansion during premature or physiological aging, *Cell Stem Cell* 25 (2019) 407–418.e6, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.06.007>.
- [58] S. Méndez-Ferrer, D. Lucas, M. Battista, P.S. Frenette, Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations, *Nature* 452 (2008) 442–447, <https://doi.org/10.1038/nature06855>.
- [59] S.B. Vasamsetti, J. Florentin, E. Coppin, L.C.A. Stiekema, K.H. Zheng, M.U. Nisar, J. Sembrat, D.J. Levinthal, M. Rojas, E.S.G. Stroes, K. Kim, P. Dutta, Sympathetic neuronal activation triggers myeloid progenitor proliferation and differentiation, *Immunity* 49 (2018) 93–106.e7, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.05.004>.
- [60] S.Z. Chong, M. Evrard, S. Devi, J. Chen, J.Y. Lim, P. See, Y. Zhang, J.M. Adrover, B. Lee, L. Tan, J.L.Y. Li, K.H. Liong, C. Phua, A. Balachander, A. Boey, D. Liebl, S. M. Tan, J.K.Y. Chan, K. Balabanian, J.E. Harris, M. Bianchini, C. Weber, J. Duchene, J. Lum, M. Poidinger, Q. Chen, L. Rénia, C.-I. Wang, A. Larbi, G. J. Randolph, W. Weninger, M.R. Looney, M.F. Krummel, S.K. Biswas, F. Ginhoux, A. Hidalgo, F. Bachelier, L.G. Ng, CXCR4 identifies transitional bone marrow premonocytes that replenish the mature monocyte pool for peripheral responses, *J. Exp. Med.* 213 (2016) 2293–2314, <https://doi.org/10.1084/jem.20160800>.
- [61] C.-L. Tsou, W. Peters, Y. Si, S. Slaymaker, A.M. Aslanian, S.P. Weisberg, M. Mack, I.F. Charo, Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 902–909, <https://doi.org/10.1172/JCI29919>.
- [62] K. Fischer, H.H. Ruiz, K. Jhun, B. Finan, D.J. Oberlin, V. van der Heide, A. V. Kalinovich, N. Petrovic, Y. Wolf, C. Clemmensen, A.C. Shin, S. Divanovic, F. Brombacher, E. Glasmacher, S. Keipert, M. Jastroch, J. Nagler, K.-W. Schramm, D. Medrikova, G. Colden, S.C. Woods, S. Herzig, D. Homann, S. Jung, J. Nedergaard, B. Cannon, M.H. Tschöp, T.D. Müller, C. Buettner, Alternatively activated macrophages do not synthesize catecholamines or contribute to adipose tissue adaptive thermogenesis, *Nat. Med.* 23 (2017) 623–630, <https://doi.org/10.1038/nm.4316>.
- [63] K.D. Nguyen, Y. Qiu, X. Cui, Y.P.S. Goh, J. Mwangi, T. David, L. Mukundan, F. Brombacher, R.M. Locksley, A. Chawla, Alternatively activated macrophages produce catecholamines to sustain adaptive thermogenesis, *Nature* 480 (2011) 104–108, <https://doi.org/10.1038/nature10653>.
- [64] Y. Qiu, K.D. Nguyen, J.L. Odegaard, X. Cui, X. Tian, R.M. Locksley, R.D. Palmiter, A. Chawla, Eosinophils and type 2 cytokine signaling in macrophages orchestrate development of functional beige fat, *Cell* 157 (2014) 1292–1308, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.066>.
- [65] P.L. Wang, A.K.Y. Yim, K.-W. Kim, D. Avey, R.S. Czepliewski, M. Colonna, J. Milbrandt, G.J. Randolph, Peripheral nerve resident macrophages share tissue-specific programming and features of activated microglia, *Nat. Commun.* 11 (2020) 2552, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16355-w>.
- [66] E. Ydens, L. Amann, B. Asselbergh, C.L. Scott, L. Martens, D. Sichten, O. Mossad, T. Blank, S. De Prijck, D. Low, T. Masuda, Y. Saeys, V. Timmerman, R. Stumm, F. Ginhoux, M. Prinz, S. Janssens, M. Guillems, Profiling peripheral nerve macrophages reveals two macrophage subsets with distinct localization, transcriptome and response to injury, *Nat. Neurosci.* 23 (2020) 676–689, <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0618-6>.
- [67] S. Kajimura, B.M. Spiegelman, P. Seale, Brown and beige fat: physiological roles beyond heat generation, *Cell Metab.* 22 (2015) 546–559, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.007>.
- [68] M.L. Reitman, How does fat transition from white to beige? *Cell Metab.* 26 (2017) 14–16, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.06.011>.
- [69] Y. Wolf, S. Boura-Halfon, N. Cortese, Z. Haimon, H. Sar Shalom, Y. Kuperman, V. Kalchenko, A. Brandis, E. David, Y. Segal-Hayoun, L. Chappell-Maor, A. Yaron, S. Jung, Brown-adipose-tissue macrophages control tissue innervation and homeostatic energy expenditure, *Nat. Immunol.* 18 (2017) 665–674, <https://doi.org/10.1038/ni.3746>.
- [70] R.M. Pirzgalska, E. Seixas, J.S. Seidman, V.M. Link, N.M. Sánchez, I. Mahú, R. Mendes, V. Gres, N. Kubasova, I. Morris, B.A. Arús, C.M. Larabee, M. Vasques, F. Tortosa, A.L. Sousa, S. Anandan, E. Tranfield, M.K. Hahn, M. Iannacone, N. J. Spann, C.K. Glass, A.I. Domingos, Sympathetic neuron-associated macrophages contribute to obesity by importing and metabolizing norepinephrine, *Nat. Med.* 23 (2017) 1309–1318, <https://doi.org/10.1038/nm.4422>.

- [71] T. Hardy, F. Oakley, Q.M. Anstee, C.P. Day, Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and disease spectrum, *Annu. Rev. Pathol.* 11 (2016) 451–496, <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044224>.
- [72] A. Suzuki, A.M. Diehl, Nonalcoholic steatohepatitis, *Annu. Rev. Med.* 68 (2017) 85–98, <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051215-031109>.
- [73] F. Sierro, M. Evrard, S. Rizzetto, M. Melino, A.J. Mitchell, M. Florido, L. Beattie, S. B. Walters, S.S. Tay, B. Lu, L.E. Holz, B. Roediger, Y.C. Wong, A. Warren, W. Ritchie, C. McGuffog, W. Weninger, D.G. Le Couteur, F. Ginhoux, W.J. Britton, W.R. Heath, B.M. Saunders, G.W. McCaughan, F. Luciani, K.P.A. MacDonald, L. G. Ng, D.G. Bowen, P. Bertolino, A liver capsular network of monocyte-derived macrophages restricts hepatic dissemination of intraperitoneal bacteria by neutrophil recruitment, *Immunity* 47 (2017) 374–388.e6, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.07.018>.
- [74] S. Epelman, K.J. Lavine, A.E. Beaudin, D.K. Sojka, J.A. Carrero, B. Calderon, T. Brija, E.L. Gautier, S. Ivanov, A.T. Satpathy, J.D. Schilling, R. Schwendener, I. Sergin, B. Razani, E.C. Forsberg, W.M. Yokoyama, E.R. Unanue, M. Colonna, G. J. Randolph, D.L. Mann, Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation, *Immunity* 40 (2014) 91–104, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.11.019>.
- [75] E. Gomez Perdiguero, K. Klapproth, C. Schulz, K. Busch, E. Azzoni, L. Crozet, H. Garner, C. Trouillet, M.F. de Bruijn, F. Geissmann, H.-R. Rodewald, Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors, *Nature* 518 (2015) 547–551, <https://doi.org/10.1038/nature13989>.
- [76] D. Hashimoto, A. Chow, C. Noizat, P. Teo, M.B. Beasley, M. Leboeuf, C.D. Becker, P. See, J. Price, D. Lucas, M. Greter, A. Mortha, S.W. Boyer, E.C. Forsberg, M. Tanaka, N. van Rooijen, A. García-Sastre, E.R. Stanley, F. Ginhoux, P. S. Frenette, M. Merad, Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes, *Immunity* 38 (2013) 792–804, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.004>.
- [77] G. Hoeffel, J. Chen, Y. Lavin, D. Low, F.F. Almeida, P. See, A.E. Beaudin, J. Lum, I. Low, E.C. Forsberg, M. Poidinger, F. Zolezzi, A. Larbi, L.G. Ng, J.K.Y. Chan, M. Greter, B. Becher, I.M. Samokhvalov, M. Merad, F. Ginhoux, C-Myb(-) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages, *Immunity* 42 (2015) 665–678, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.011>.
- [78] Z. Liu, Y. Gu, S. Chakarov, C. Blierot, I. Kwok, X. Chen, A. Shin, W. Huang, R. J. Dress, C.-A. Dutertre, A. Schlitzer, J. Chen, L.G. Ng, H. Wang, Z. Liu, B. Su, F. Ginhoux, Fate mapping via Msa43-expression history traces monocyte-derived cells, *Cell* 178 (2019) 1509–1525.e19, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.009>.
- [79] L. Beattie, A. Sawtell, J. Mann, T.C.M. Frame, B. Teal, F. de Labastida Rivera, N. Brown, K. Walwyn-Brown, J.W.J. Moore, S. MacDonald, E.-K. Lim, J.E. Dalton, C.R. Engwerda, K.P. MacDonald, P.M. Kaye, Bone marrow-derived and resident liver macrophages display unique transcriptomic signatures but similar biological functions, *J. Hepatol.* 65 (2016) 758–768, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.037>.
- [80] M. Sakai, T.D. Troutman, J.S. Seidman, Z. Ouyang, N.J. Spann, Y. Abe, K.M. Ego, C.M. Bruni, Z. Deng, J.C.M. Schlachetzki, A. Nott, H. Bennett, J. Chang, B.T. Vu, M.P. Pasillas, V.M. Link, L. Texari, S. Heinz, B.M. Thompson, J.G. McDonald, F. Geissmann, C.K. Glass, Liver-derived signals sequentially reprogram myeloid enhancers to initiate and maintain kupffer cell identity, *Immunity* 51 (2019) 655–670, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.09.002>.
- [81] C.L. Scott, F. Zheng, P. De Baetselier, L. Martens, Y. Saey, S. De Prijck, S. Lippens, C. Abels, S. Schoonooghe, G. Raes, N. Devoogdt, B.N. Lambrecht, A. Beschin, M. Guilliams, Bone marrow-derived monocytes give rise to self-renewing and fully differentiated Kupffer cells, *Nat. Commun.* 7 (2016) 10321, <https://doi.org/10.1038/ncomms10321>.
- [82] J. Bonnarde, W. T'Jonck, D. Gaublomme, R. Browaeys, C.L. Scott, L. Martens, B. Vanneste, S. De Prijck, S.A. Nedospasov, A. Kremer, E. Van Hamme, P. Borghgraef, W. Toussaint, P. De Bleser, I. Mannaerts, A. Beschin, L.A. van Grunsven, B.N. Lambrecht, T. Taghon, S. Lippens, D. Elewaut, Y. Saey, M. Guilliams, Stellate cells, hepatocytes, and endothelial cells imprint the Kupffer cell identity on monocytes colonizing the liver macrophage niche, *Immunity* 51 (2019) 638–654, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.08.017>.
- [83] C.L. Scott, W. T'Jonck, L. Martens, H. Todorov, D. Sichen, B. Soen, J. Bonnarde, S. De Prijck, N. Vandamme, R. Cannoodt, W. Saelens, B. Vanneste, W. Toussaint, P. De Bleser, N. Takahashi, P. Vandenabeele, S. Henri, C. Pridans, D.A. Hume, B. N. Lambrecht, P. De Baetselier, S.W.F. Milling, J.A. Van Ginderachter, B. Malissen, G. Bercx, A. Beschin, Y. Saey, M. Guilliams, The transcription factor ZEB2 is required to maintain the tissue-specific identities of macrophages, *Immunity* 49 (2018) 312–325.e5, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.004>.
- [84] A. Remmerie, L. Martens, T. Thoné, A. Castoldi, R. Seurinck, B. Pavie, J. Roels, B. Vanneste, S. De Prijck, M. Vanhockerhout, M. Binte Abdul Latif, L. Devisscher, A. Hoorens, J. Bonnarde, N. Vandamme, A. Kremer, P. Borghgraef, H. Van Vlierberghe, S. Lippens, E. Pearce, Y. Saey, C.L. Scott, Osteopontin expression identifies a subset of recruited macrophages distinct from kupffer cells in the fatty liver, *Immunity* 53 (2020) 641–657.e14, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.08.004>.
- [85] J.S. Seidman, T.D. Troutman, M. Sakai, A. Gola, N.J. Spann, H. Bennett, C. M. Bruni, Z. Ouyang, R.Z. Li, X. Sun, B.T. Vu, M.P. Pasillas, K.M. Ego, D. Gosselin, V.M. Link, L.-W. Chong, R.M. Evans, B.M. Thompson, J.G. McDonald, M. Hosseini, J.L. Witzum, R.N. Germain, C.K. Glass, Niche-specific reprogramming of epigenetic landscapes drives myeloid cell diversity in nonalcoholic steatohepatitis, *Immunity* 52 (2020) 1057–1074.e7, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.001>.
- [86] S. Tran, I. Baba, L. Poupel, S. Dussaud, M. Moreau, A. Gelineau, G. Marcelin, E. Magréau-Davy, M. Ouhachi, P. Lesnik, A. Boissonnas, W. Le Goff, B.E. Clausen, L. Yvan-Charvet, F. Sennlaub, T. Huby, E.L. Gautier, Impaired Kupffer cell self-renewal alters the liver response to lipid overload during non-alcoholic steatohepatitis, *Immunity* 53 (2020) 627–640.e5, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.06.003>.
- [87] X. Xiong, H. Kuang, S. Ansari, T. Liu, J. Gong, S. Wang, X.-Y. Zhao, Y. Ji, C. Li, L. Guo, L. Zhou, Z. Chen, P. Leon-Mimila, M.T. Chung, K. Kurabayashi, J. Opp, F. Campos-Pérez, H. Villamil-Ramírez, S. Canizales-Quintero, R. Lyons, C. N. Lumeng, B. Zhou, L. Qi, A. Huertas-Vazquez, A.J. Lusis, X.Z.S. Xu, S. Li, Y. Yu, J.Z. Li, J.D. Lin, Landscape of intercellular crosstalk in healthy and NASH liver revealed by single-cell secretome gene analysis, *Mol. Cell* 75 (2019) 644–660.e5, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.028>.
- [88] K. Miura, L. Yang, N. van Rooijen, H. Ohnishi, E. Seki, Hepatic recruitment of macrophages promotes nonalcoholic steatohepatitis through CCR2, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302 (2012) G1310–G1321, <https://doi.org/10.1152/ajpgp.00365.2011>.
- [89] O. Krenkel, T. Puengel, O. Govaere, A.T. Abdallah, J.C. Mossanen, M. Kohlhepp, A. Liepelt, E. Lefebvre, T. Luedde, C. Hellerbrand, R. Weiskirchen, T. Longrich, I. G. Costa, Q.M. Anstee, C. Trautwein, F. Tacke, Therapeutic inhibition of inflammatory monocyte recruitment reduces steatohepatitis and liver fibrosis, *Hepatology* 67 (2018) 1270–1283, <https://doi.org/10.1002/hep.29544>.
- [90] A.J. Kruger, B.C. Fuchs, R. Masia, J.A. Holmes, S. Salloum, M. Sojoodi, D. S. Ferreira, S.M. Rutledge, P. Caravan, N. Alatrakchi, P. Vig, E. Lefebvre, R. T. Chung, Prolonged cenicriviroc therapy reduces hepatic fibrosis despite steatohepatitis in a diet-induced mouse model of nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatol. Commun.* 2 (2018) 529–545, <https://doi.org/10.1002/hep4.1160>.
- [91] E. Lefebvre, G. Moyle, R. Reshef, L.P. Richman, M. Thompson, F. Hong, H.-L. Chou, T. Hashiguchi, C. Plato, D. Poulin, T. Richards, H. Yoneyama, H. Jenkins, G. Wolfgang, S.L. Friedman, Antifibrotic effects of the dual CCR2/CCR5 antagonist cenicriviroc in animal models of liver and kidney fibrosis, *PLoS One* 11 (2016), 0158156, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158156>.
- [92] M. Honda, C. Kimura, T. Ueda, S. Kon, Neutralizing antibody against osteopontin attenuates non-alcoholic steatohepatitis in mice, *J. Cell Commun. Signal.* 14 (2020) 223–232, <https://doi.org/10.1007/s12079-020-00554-7>.
- [93] W.-K. Syn, S.S. Choi, E. Liaskou, G.F. Karaca, K.M. Agboola, Y.H. Oo, Z. Mi, T. A. Pereira, M. Zdanowicz, P. Malladi, Y. Chen, C. Moylan, Y. Jung, S. D. Bhattacharya, V. Teaberry, A. Omenetti, M.F. Abdelmalek, C.D. Guy, D. H. Adams, P.C. Kuo, G.A. Michelotti, P.F. Whittington, A.M. Diehl, Osteopontin is induced by hedgehog pathway activation and promotes fibrosis progression in nonalcoholic steatohepatitis, *Hepatology* 53 (2011) 106–115, <https://doi.org/10.1002/hep.23998>.
- [94] R. Español-Suñer, R. Carpentier, N. Van Hul, V. Legry, Y. Achouri, S. Cordi, P. Jacquemin, F. Lemaigre, I.A. Leclercq, Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice, *Gastroenterology* 143 (2012) 1564–1575.e7, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.08.024>.
- [95] A. Esparza-Baquer, I. Labiano, O. Sharif, A. Aguirre-Lizaso, F. Oakley, P. M. Rodrigues, E. Zhuravleva, C.J. O'Rourke, E. Hijona, R. Jimenez-Aguero, I. Riaño, A. Landa, A. La Casta, M.Y.W. Zaki, P. Munoz-Garrido, M. Azkargorta, F. Elortza, A. Vogel, G. Schabbauer, P. Aspichueta, J.B. Andersen, S. Knapp, D. A. Mann, L. Bujanda, J.M. Banales, M.J. Perugorria, TREM-2 defends the liver against hepatocellular carcinoma through multifactorial protective mechanisms, *Gut* 70 (2021) 1345–1361, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319227>.
- [96] M.J. Perugorria, A. Esparza-Baquer, F. Oakley, I. Labiano, A. Korosec, A. Jais, J. Mann, D. Tiniakos, A. Santos-Laso, A. Arbelaz, R. Gawish, A. Sampedro, A. Fontanellas, E. Hijona, R. Jimenez-Aguero, H. Esterbauer, D. Stoiber, L. Bujanda, J.M. Banales, S. Knapp, O. Sharif, D.A. Mann, Non-parenchymal TREM-2 protects the liver from immune-mediated hepatocellular damage, *Gut* 68 (2019) 533–546, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314107>.
- [97] A. Gola, M.G. Dorrington, E. Speranza, C. Sala, R.M. Shih, A.J. Radtke, H. S. Wong, A.P. Baptista, J.M. Hernandez, G. Castellani, L.D.C. Fraser, R. N. Germain, Commensal-driven immune zonation of the liver promotes host defence, *Nature* 589 (2021) 131–136, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2977-2>.
- [98] M.L. Balmer, E. Slack, A. de Gottardi, M.A.E. Lawson, S. Hapfelmeier, L. Miele, A. Grieco, H. Van Vlierberghe, R. Fahrner, N. Patuto, C. Bernsmeier, F. Ronchi, M. Wyss, D. Stroka, N. Dickgreber, M.H. Heim, K.D. McCoy, A.J. Macpherson, The liver may act as a firewall mediating mutualism between the host and its gut commensal microbiota, *Sci. Transl. Med.* 6 (2014) 237, <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008618>.
- [99] B. McDonald, A.Z. Zucoloto, I.-L. Yu, R. Burkhard, K. Brown, M.B. Geuking, K. D. McCoy, Programming of an intravascular immune firewall by the gut microbiota protects against pathogen dissemination during infection, *Cell Host Microbe* 28 (2020) 660–668.e4, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.07.014>.
- [100] A.R. Tall, L. Yvan-Charvet, Cholesterol, inflammation and innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (2015) 104–116, <https://doi.org/10.1038/nri3793>.
- [101] O. Krenkel, F. Tacke, Liver macrophages in tissue homeostasis and disease, *Nat. Rev. Immunol.* 17 (2017) 306–321, <https://doi.org/10.1038/nri.2017.11>.
- [102] I. Theurl, I. Hilgendorf, M. Nairz, P. Tymoszek, D. Haschka, M. Asshoff, S. He, L. M.S. Gerhardt, T.A.W. Holderried, M. Seifert, S. Sopper, A.M. Fenn, A. Anzai, S. Rattik, C. McAlpine, M. Theurl, P. Wieghofer, Y. Iwamoto, G.F. Weber, N. K. Harder, B.G. Chousterman, T.L. Arvedson, M. McKee, F. Wang, O.M.D. Lutz, E. Rezoagli, J.L. Babitt, L. Berra, M. Prinz, M. Nahrendorf, G. Weiss, R. Weissleder, H.Y. Lin, F.K. Swirski, On-demand erythrocyte disposal and iron

- recycling requires transient macrophages in the liver, *Nat. Med.* 22 (2016) 945–951, <https://doi.org/10.1038/nm.4146>.
- [103] K.J. Moore, I. Tabas, Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis, *Cell* 145 (2011) 341–355, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.005>.
- [104] P. Libby, G.K. Hansson, From focal lipid storage to systemic inflammation: JACC review topic of the week, *J. Am. Coll. Cardiol.* 74 (2019) 1594–1607, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.07.061>.
- [105] F.K. Swirski, M. Nahrendorf, Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease, *Nat. Rev. Immunol.* 18 (2018) 733–744, <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0065-8>.
- [106] C.S. Robbins, I. Hilgendorf, G.F. Weber, I. Theurl, Y. Iwamoto, J.-L. Figueiredo, R. Gorbato, G.K. Sukhova, L.M.S. Gerhardt, D. Smyth, C.C.J. Zavitz, E. A. Shikatan, M. Parsons, N. van Rooijen, H.Y. Lin, M. Husain, P. Libby, M. Nahrendorf, R. Weissleder, F.K. Swirski, Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis, *Nat. Med.* 19 (2013) 1166–1172, <https://doi.org/10.1038/nm.3258>.
- [107] L. Boring, J. Gosling, M. Cleary, I.F. Charo, Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis, *Nature* 394 (1998) 894–897, <https://doi.org/10.1038/29788>.
- [108] F.K. Swirski, P. Libby, E. Aikawa, P. Alcaide, F.W. Luscinskas, R. Weissleder, M. J. Pittet, Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytes and give rise to macrophages in atheromata, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 195–205, <https://doi.org/10.1172/JCI29950>.
- [109] F. Tacke, D. Alvarez, T.J. Kaplan, C. Jakubzick, R. Spanbroek, J. Llodra, A. Garin, J. Liu, M. Mack, N. van Rooijen, S.A. Lira, A.J. Habenicht, G.J. Randolph, Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 185–194, <https://doi.org/10.1172/JCI28549>.
- [110] C.M.L. Chapman, J.P. Beilby, B.M. McQuillan, P.L. Thompson, J. Hung, Monocyte count, but not C-reactive protein or interleukin-6, is an independent risk marker for subclinical carotid atherosclerosis, *Stroke* 35 (2004) 1619–1624, <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000130857.19423.ad>.
- [111] B.S. Collier, Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 658–670, <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000156877.94472.a5>.
- [112] K. Nasir, E. Guallar, A. Navas-Acien, M.H. Criqui, J.A.C. Lima, Relationship of monocyte count and peripheral arterial disease: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 1966–1971, <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000175296.02550.e4>.
- [113] R. Olivares, P. Ducimetière, J.R. Claude, Monocyte count: a risk factor for coronary heart disease? *Am. J. Epidemiol.* 137 (1993) 49–53, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a116601>.
- [114] J.H. Qiao, J. Tripathi, N.K. Mishra, Y. Cai, S. Tripathi, X.P. Wang, S. Ims, M. C. Fishbein, S.K. Clinton, P. Libby, A.J. Lusis, T.B. Rajavashisth, Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice, *Am. J. Pathol.* 150 (1997) 1687–1699.
- [115] T. Rajavashisth, J.H. Qiao, S. Tripathi, J. Tripathi, N. Mishra, M. Hua, X.P. Wang, A. Loussarian, S. Clinton, P. Libby, A. Lusis, Heterozygous osteopetrotic (op) mutation reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 2702–2710, <https://doi.org/10.1172/JCI119891>.
- [116] J.D. Smith, E. Trojan, M. Ginsberg, C. Grigaux, J. Tian, M. Miyata, Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995) 8264–8268, <https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8264>.
- [117] E.L. Gautier, T. Huby, J.L. Witztum, B. Ouzilleau, E.R. Miller, F. Saint-Charles, P. Aucouturier, M.J. Chapman, P. Lesnik, Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage, *Circulation* 119 (2009) 1795–1804, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.806158>.
- [118] D.M. Schrijvers, G.R.Y. De Meyer, M.M. Kockx, A.G. Herman, W. Martinet, Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 1256–1261, <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000166517.18801.a7>.
- [119] J.W. Williams, H. Winkels, C.P. Durant, K. Zaitsev, Y. Ghosheh, K. Ley, Single Cell RNA Sequencing in Atherosclerosis Research, *Circ. Res.* 126 (2020) 1112–1126, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315940>.
- [120] D.M. Fernandez, A.H. Rahman, N.F. Fernandez, A. Chudnovskiy, E.-A.D. Amir, L. Amadori, N.S. Khan, C.K. Wong, R. Shamailova, C.A. Hill, Z. Wang, R. Remark, J.R. Li, C. Pina, C. Faries, A.J. Awad, N. Moss, J.L.M. Bjorkegren, S. Kim-Schulze, S. Gnjatic, A. Ma'ayan, J. Mocca, P. Faries, M. Merad, C. Giannarelli, Single-cell immune landscape of human atherosclerotic plaques, *Nat. Med.* 25 (2019) 1576–1588, <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0590-4>.
- [121] C. Cochain, E. Vafadarnejad, P. Arampatzis, J. Pelisek, H. Winkels, K. Ley, D. Wolf, A.-E. Saliba, A. Zernecke, Single-cell RNA-seq reveals the transcriptional landscape and heterogeneity of aortic macrophages in murine atherosclerosis, *Circ. Res.* 122 (2018) 1661–1674, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312509>.
- [122] J.E. Cole, I. Park, D.J. Ahern, C. Kassiteridi, D. Danso Abeam, M.E. Goddard, P. Green, P. Maffia, C. Monaco, Immune cell census in murine atherosclerosis: cytometry by time of flight illuminates vascular myeloid cell diversity, *Cardiovasc. Res.* 114 (2018) 1360–1371, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy109>.
- [123] A.S. Kalluri, S.K. Vellarikkal, E.R. Edelman, L. Nguyen, A. Subramanian, P. T. Ellnor, A. Regev, S. Kathiresan, R.M. Gupta, Single-cell analysis of the normal mouse aorta reveals functionally distinct endothelial cell populations, *Circulation* 140 (2019) 147–163, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038362>.
- [124] K. Kim, D. Shim, J.S. Lee, K. Zaitsev, J.W. Williams, K.-W. Kim, M.-Y. Jang, H. Seok Jang, T.J. Yun, S.H. Lee, W.K. Yoon, A. Prat, N.G. Seidah, J. Choi, S.-P. Lee, S.-H. Yoon, J.W. Nam, J.K. Seong, G.T. Oh, G.J. Randolph, M.N. Artyomov, C. Cheong, J.-H. Choi, Transcriptome analysis reveals nonfoamy rather than foamy plaque macrophages are proinflammatory in atherosclerotic murine models, *Circ. Res.* 123 (2018) 1127–1142, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312804>.
- [125] H. Winkels, E. Ehinger, M. Vassallo, K. Buscher, H.Q. Dinh, K. Kobiyama, A.A. J. Hamers, C. Cochain, E. Vafadarnejad, A.-E. Saliba, A. Zernecke, A.B. Pramod, A. K. Ghosh, N. Anto Michel, N. Hoppe, I. Hilgendorf, A. Zirlirk, C.C. Hedrick, K. Ley, D. Wolf, Atlas of the immune cell repertoire in mouse atherosclerosis defined by single-cell RNA-sequencing and mass cytometry, *Circ. Res.* 122 (2018) 1675–1688, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312513>.
- [126] H.Y. Lim, S.Y. Lim, C.K. Tan, C.H. Thiam, C.C. Goh, D. Carbajo, S.H.S. Chew, P. See, S. Chakarov, X.N. Wang, L.H. Lim, L.A. Johnson, J. Lum, C.Y. Fong, A. Bongso, A. Biswas, C. Goh, M. Evrard, K.P. Yeo, R. Basu, J.K. Wang, Y. Tan, R. Jain, S. Tikoo, C. Choong, W. Weninger, M. Poidinger, R.E. Stanley, M. Collin, N.S. Tan, L.G. Ng, D.G. Jackson, F. Ginhoux, V. Angeli, Hyaluronan receptor LYVE-1-expressing macrophages maintain arterial tone through hyaluronan-mediated regulation of smooth muscle cell collagen, *Immunity* 49 (2018) 326–341.e7, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.06.008>.
- [127] S. Chakarov, H.Y. Lim, L. Tan, S.Y. Lim, P. See, J. Lum, X.-M. Zhang, S. Foo, S. Nakamizo, K. Duan, W.T. Kong, R. Gentek, A. Balachander, D. Carbajo, C. Blierot, B. Malleret, J.K.C. Tam, S. Baig, M. Shabeer, S.-A.E.S. Toh, A. Schlitzer, A. Larbi, T. Marichal, B. Malissen, J. Chen, M. Poidinger, K. Kabashima, M. Bajenoff, L.G. Ng, V. Angeli, F. Ginhoux, Two distinct interstitial macrophage populations coexist across tissues in specific subcellular niches, *Science* 363 (2019), <https://doi.org/10.1126/science.aau0964>.
- [128] A. Dumont, M. Lee, T. Barouillet, A. Murphy, L. Yvan-Charvet, Mitochondria orchestrate macrophage effector functions in atherosclerosis, *Mol. Asp. Med.* 77 (2021), 100922, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100922>.
- [129] D.F.J. Ketelhuth, E. Lutgens, M. Bäck, C.J. Binder, J. Van den Bossche, C. Daniel, I.E. Dumitriu, I. Hoefer, P. Libby, L. O'Neill, C. Weber, P.C. Evans, Immunometabolism and atherosclerosis: perspectives and clinical significance: a position paper from the Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology of the European Society of Cardiology, *Cardiovasc. Res.* 115 (2019) 1385–1392, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz166>.
- [130] G.J. Koelwyn, E.M. Corr, E. Erbay, K.J. Moore, Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis, *Nat. Immunol.* 19 (2018) 526–537, <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0113-3>.
- [131] I. Tabas, K.E. Bornfeldt, Intracellular and Intercellular Aspects of Macrophage Immunometabolism in Atherosclerosis, *Circ. Res.* 126 (2020) 1209–1227, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.315939>.
- [132] L. Yvan-Charvet, F. Bonacina, R.R. Guinamard, G.D. Norata, Immunometabolic function of cholesterol in cardiovascular disease and beyond, *Cardiovasc. Res.* 115 (2019) 1393–1407, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz127>.
- [133] M.F. Linton, V.R. Babaev, J. Huang, E.F. Linton, H. Tao, P.G. Yancey, Macrophage apoptosis and efferocytosis in the pathogenesis of atherosclerosis, *Circ. J.* 80 (2016) 2259–2268, <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-16-0924>.
- [134] A. Yurdagul, A.C. Doran, B. Cai, G. Fredman, I.A. Tabas, Mechanisms and consequences of defective efferocytosis in atherosclerosis, *Front. Cardiovasc. Med.* 4 (2017) 86, <https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00086>.
- [135] N. A-Gonzalez, S.J. Bensinger, C. Hong, S. Beceiro, M.N. Bradley, N. Zelcer, J. Deniz, C. Ramirez, M. Diaz, G. Gallardo, C.R. de Galarreta, J. Salazar, F. Lopez, P. Edwards, J. Parks, M. Andujar, P. Tontonoz, A. Castrillo, Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR, *Immunity* 31 (2009) 245–258, <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.018>.
- [136] L. Yvan-Charvet, T.A. Pagler, T.A. Seimon, E. Thorp, C.L. Welch, J.L. Witztum, I. Tabas, A.R. Tall, ABCA1 and ABCG1 protect against oxidative stress-induced macrophage apoptosis during efferocytosis, *Circ. Res.* 106 (2010) 1861–1869, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.217281>.
- [137] S. Morioka, J.S.A. Perry, M.H. Raymond, C.B. Medina, Y. Zhu, L. Zhao, V. Serbulea, S. Onengut-Gumuscu, N. Leitinger, S. Kucenas, J.C. Rathmell, L. Makowski, K.S. Ravichandran, Efferocytosis induces a novel SLC program to promote glucose uptake and lactate release, *Nature* 563 (2018) 714–718, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0735-5>.
- [138] A.J. Freerman, L. Zhao, A.K. Pingili, B. Teng, A.J. Cozzo, A.M. Fuller, A. R. Johnson, J.J. Milner, M.F. Lim, J.A. Galanck, M.A. Beck, J.E. Bear, J.D. Rotty, L. Bezavada, H.S. Smallwood, M.A. Puchowicz, J. Liu, J.W. Locasale, D.P. Lee, B. J. Bennett, E.D. Abel, J.C. Rathmell, L. Makowski, Myeloid Slc2a1-deficient murine model revealed macrophage activation and metabolic phenotype are fueled by GLUT1, *J. Immunol.* 202 (2019) 1265–1286, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800002>.
- [139] S. Zhang, S. Weinberg, M. DeBerge, A. Gainullina, M. Schipma, J.M. Kinchen, I. Ben-Sahra, D.R. Gius, L. Yvan-Charvet, N.S. Chandel, P.T. Schumacker, E. B. Thorp, Efferocytosis fuels requirements of fatty acid oxidation and the electron transport chain to polarize macrophages for tissue repair, *Cell Metab.* 29 (2019) 443–456.e5, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.12.004>.
- [140] Y. Wang, G.Z. Wang, P.S. Rabinovitch, I. Tabas, Macrophage mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and nuclear factor- $\kappa$ B-mediated inflammation in macrophages, *Circ. Res.* 114 (2014) 421–433, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302153>.
- [141] J. Blanc, M.C. Alves-Guerra, B. Esposito, S. Rousset, P. Gourdy, D. Ricquier, A. Tedgui, B. Miroux, Z. Mallat, Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis, *Circulation* 107 (2003) 388–390, <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000051722.66074.60>.

- [142] R. De Simone, M.A. Ajmone-Cat, M. Pandolfi, A. Bernardo, C. De Nuccio, L. Minghetti, S. Visentin, The mitochondrial uncoupling protein-2 is a master regulator of both M1 and M2 microglial responses, *J. Neurochem.* 135 (2015) 147–156, <https://doi.org/10.1111/jnc.13244>.
- [143] F. Moukdar, J. Robidoux, O. Lyght, J. Pi, K.W. Daniel, S. Collins, Reduced antioxidant capacity and diet-induced atherosclerosis in uncoupling protein-2-deficient mice, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 59–70, <https://doi.org/10.1194/jlr.M800273-JLR200>.
- [144] D. Park, C.Z. Han, M.R. Elliott, J.M. Kinchen, P.C. Trampont, S. Das, S. Collins, J. Lysiak, K.L. Hoehn, K.S. Ravichandran, Continued clearance of apoptotic cells critically depends on the phagocyte Ucp2 protein, *Nature* 477 (2011) 220–224, <https://doi.org/10.1038/nature10340>.
- [145] M. Viaud, S. Ivanov, N. Vujic, M. Duta-Mare, L.-E. Aira, T. Barouillet, E. Garcia, F. Orange, I. Dugail, I. Hainault, C. Stehlik, S. Marchetti, L. Boyer, R. Guinamard, F. Foulle, A. Bochem, K.G. Hovingh, E.B. Thorp, E.L. Gautier, D. Kratky, P. Dasilva-Jardine, L. Yvan-Charvet, Lysosomal cholesterol hydrolysis couples efferocytosis to anti-inflammatory oxysterol production, *Circ. Res.* 122 (2018) 1369–1384, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312333>.
- [146] I. Sergin, T.D. Evans, X. Zhang, S. Bhattacharya, C.J. Stokes, E. Song, S. Ali, B. Dehestani, K.B. Holloway, P.S. Micevych, A. Javaheri, J.R. Crowley, A. Ballabio, J.D. Schilling, S. Epelman, C.C. Weihl, A. Diwan, D. Fan, M.A. Zayed, B. Razani, Exploiting macrophage autophagy-lysosomal biogenesis as a therapy for atherosclerosis, *Nat. Commun.* 8 (2017) 15750, <https://doi.org/10.1038/ncomms15750>.
- [147] C.B. Medina, P. Mehrotra, S. Arandjelovic, J.S.A. Perry, Y. Guo, S. Morioka, B. Barron, S.F. Walk, B. Ghesquiere, A.S. Krupnick, U. Lorenz, K.S. Ravichandran, Metabolites released from apoptotic cells act as tissue messengers, *Nature* 580 (2020) 130–135, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2121-3>.
- [148] A. Yurdagul, M. Subramanian, X. Wang, S.B. Crown, O.R. Ilkayeva, L. Darville, G. K. Kolluru, C.C. Rymond, B.D. Gerlach, Z. Zheng, G. Kuriakose, C.G. Kevil, J. M. Koomen, J.L. Cleveland, D.M. Muoio, I. Tabas, Macrophage metabolism of apoptotic cell-derived arginine promotes continual efferocytosis and resolution of injury, *Cell Metab.* 31 (2020) 518–533.e10, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.01.001>.
- [149] B. Ren, E. Van Kampen, T.J.C. Van Berkel, S.M. Cruickshank, M. Van Eck, Hematopoietic arginase 1 deficiency results in decreased leukocytosis and increased foam cell formation but does not affect atherosclerosis, *Atherosclerosis* 256 (2017) 35–46, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.11.018>.
- [150] Y. Hu, Q. Xu, Adventitial biology: differentiation and function, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (2011) 1523–1529, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.221176>.
- [151] C. Yin, S.K. Mohanta, P. Srikakulapu, C. Weber, A.J.R. Habenicht, Artery tertiary lymphoid organs: powerhouses of atherosclerosis immunity, *Front. Immunol.* 7 (2016) 387, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00387>.
- [152] S. Ensan, A. Li, R. Besla, N. Degousee, J. Cosme, M. Roufaiel, E.A. Shikatani, M. El-Maklizi, J.W. Williams, L. Robins, C. Li, B. Lewis, T.J. Yun, J.S. Lee, P. Wieghofer, R. Khattar, K. Farrokhi, J. Byrne, M. Ouzounian, C.C.J. Zavitz, G. A. Levy, C.M.T. Bauer, P. Libby, M. Husain, F.K. Swirski, C. Cheong, M. Prinz, I. Hilgendorf, G.J. Randolph, S. Epelman, A.O. Gramolini, M.I. Cybulsky, B. B. Rubin, C.S. Robbins, Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth, *Nat. Immunol.* 17 (2016) 159–168, <https://doi.org/10.1038/ni.3343>.
- [153] E.C. Boyle, D.G. Sedding, A. Haverich, Targeting vasa vasorum dysfunction to prevent atherosclerosis, *Vasc. Pharmacol.* 96–98 (2017) 5–10, <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.08.003>.
- [154] G. Tellides, J.S. Pober, Inflammatory and immune responses in the arterial media, *Circ. Res.* 116 (2015) 312–322, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.301312>.
- [155] C. Bénézech, N.-T. Luu, J.A. Walker, A.A. Kruglov, Y. Loo, K. Nakamura, Y. Zhang, S. Nayar, L.H. Jones, A. Flores-Langarica, A. McIntosh, J. Marshall, F. Barone, G. Besra, K. Miles, J.E. Allen, M. Gray, G. Kollias, A.F. Cunningham, D.R. Withers, K.M. Toellner, N.D. Jones, M. Veldhoen, S.A. Nedospasov, A.N.J. McKenzie, J. H. Caamaño, Inflammation-induced formation of fat-associated lymphoid clusters, *Nat. Immunol.* 16 (2015) 819–828, <https://doi.org/10.1038/ni.3215>.
- [156] S. Sartore, A. Chiavegato, E. Faggini, R. Franch, M. Puato, S. Ausoni, P. Pualetto, Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant, *Circ. Res.* 89 (2001) 1111–1121, <https://doi.org/10.1161/hh2401.100844>.
- [157] K.R. Stenmark, M.E. Yeager, K.C. El Kasmi, E. Nozik-Grayck, E. V. Gerasimovskaya, M. Li, S.R. Riddle, M.G. Frid, The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function, *Annu. Rev. Physiol.* 75 (2013) 23–47, <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183802>.
- [158] A. Aderem, How to eat something bigger than your head, *Cell* 110 (2002) 5–8, [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00819-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00819-x).

## **Références bibliographiques**

- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H., & Krieger, M. (1996). Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science*, 271(5248), 518-520.
- Addabbo, F., Chen, Q., Patel, D. P., Rabadi, M., Ratliff, B., Zhang, F., Jasmin, J.-F., Wolin, M., Lisanti, M., Gross, S. S., & Goligorsky, M. S. (2013). Glutamine supplementation alleviates vasculopathy and corrects metabolic profile in an in vivo model of endothelial cell dysfunction. *PloS One*, 8(6), e65458.
- Adeva-Andany, M. M., Adeva-Contreras, L., Fernández-Fernández, C., González-Lucán, M., & Funcasta-Calderón, R. (2021). Elastic tissue disruption is a major pathogenic factor to human vascular disease. *Molecular Biology Reports*, 48(5), 4865-4878.
- Akhavanpoor, M., Gleissner, C. A., Akhavanpoor, H., Lasitschka, F., Doesch, A. O., Katus, H. A., & Erbel, C. (2018). Adventitial tertiary lymphoid organ classification in human atherosclerosis. *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 32, 8-14.
- Aledo, J. C., Gómez-Fabre, P. M., Olalla, L., & Márquez, J. (2000). Identification of two human glutaminase loci and tissue-specific expression of the two related genes. *Mammalian Genome*, 11(12), 1107-1110.
- Allahverdian, S., Chehroudi, A. C., McManus, B. M., Abraham, T., & Francis, G. A. (2014). Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation*, 129(15), 1551-1559.
- Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2016). From Krebs to Clinic : Glutamine Metabolism to Cancer Therapy. *Nature reviews. Cancer*, 16(10), 619-634.
- Anand, S. S., Yi, Q., Gerstein, H., Lonn, E., Jacobs, R., Vuksan, V., Teo, K., Davis, B., Montague, P., & Yusuf, S. (2003). Relationship of Metabolic Syndrome and Fibrinolytic Dysfunction to Cardiovascular Disease. *Circulation*, 108(4), 420-425.
- Andersen, J. V., McNair, L. F., Schousboe, A., & Waagepetersen, H. S. (2017). Specificity of exogenous acetate and glutamate as astrocyte substrates examined in acute brain slices from female mice using methionine sulfoximine (MSO) to inhibit glutamine synthesis. *Journal of Neuroscience Research*, 95(11), 2207-2216.
- Andersson, C., & Vasan, R. S. (2018). Epidemiology of cardiovascular disease in young individuals. *Nature Reviews Cardiology*, 15(4), 230-240.
- Arribas, S. M., Hinek, A., & González, M. C. (2006). Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*, 111(3), 771-791.
- Atkins, G. B., & Simon, D. I. (2013). Interplay between NF- $\kappa$ B and Kruppel-like factors in vascular inflammation and atherosclerosis : Location, location, location. *Journal of the American Heart Association*, 2(3), e000290.
- Bäck, M., Yurdagul, A., Tabas, I., Öörni, K., & Kovanen, P. T. (2019). Inflammation and its resolution in atherosclerosis : Mediators and therapeutic opportunities. *Nature Reviews. Cardiology*, 16(7), 389-406.

- Bank, R. P. D., & Karlberg, T., en Berg, S., Weigelt, J., Holmberg-Schiavone, L., Structural Genomics Consortium (SGC). (s. d.). *RCSB PDB - 2QC8 : Crystal structure of human glutamine synthetase in complex with ADP and methionine sulfoximine phosphate*. Consulté 9 octobre 2022, à l'adresse <https://www.rcsb.org/structure/2QC8>
- Barter, P. J., Brewer, H. B., Chapman, M. J., Hennekens, C. H., Rader, D. J., & Tall, A. R. (2003). Cholesteryl ester transfer protein : A novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(2), 160-167.
- Basatemur, G. L., Jørgensen, H. F., Clarke, M. C. H., Bennett, M. R., & Mallat, Z. (2019). Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nature Reviews. Cardiology*, 16(12), 727-744.
- Beninati, S., Piacentini, M., & Bergamini, C. M. (2017). Transglutaminase 2, a double face enzyme. *Amino Acids*, 49(3), 415-423.
- Bennett, M. R., Sinha, S., & Owens, G. K. (2016). Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Circulation research*, 118(4), 692-702.
- Bentley, H. R., McDERMOTT, E. E., Pace, J., Whitehead, J. K., & Moran, T. (1950). Toxic Factor from 'Agenized' Proteins : Methionine as the Essential Reactant. *Nature*, 165(4187), Art. 4187.
- Bentzon, J. F., & Falk, E. (2010). Atherosclerotic lesions in mouse and man : Is it the same disease? *Current Opinion in Lipidology*, 21(5), 434-440.
- Bertero, T., Oldham, W. M., Cottrill, K. A., Pisano, S., Vanderpool, R. R., Yu, Q., Zhao, J., Tai, Y., Tang, Y., Zhang, Y.-Y., Rehman, S., Sugahara, M., Qi, Z., Gorcsan, J., Vargas, S. O., Saggari, R., Saggari, R., Wallace, W. D., Ross, D. J., ... Chan, S. Y. (2016). Vascular stiffness mechanoactivates YAP/TAZ-dependent glutaminolysis to drive pulmonary hypertension. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(9), 3313-3335.
- Binder, C. J., Papac-Milicevic, N., & Witztum, J. L. (2016). Innate sensing of oxidation-specific epitopes in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 16(8), 485-497.
- Bjørklund, M. M., Hollensen, A. K., Hagensen, M. K., Dagnæs-Hansen, F., Christoffersen, C., Mikkelsen, J. G., & Bentzon, J. F. (2014). Induction of Atherosclerosis in Mice and Hamsters Without Germline Genetic Engineering. *Circulation Research*, 114(11), 1684-1689.
- Bond, A. R., & Jackson, C. L. (2010). The Fat-Fed Apolipoprotein E Knockout Mouse Brachiocephalic Artery in the Study of Atherosclerotic Plaque Rupture. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, e379069.
- Boren, J., Lee, I., Zhu, W., Arnold, K., Taylor, S., & Innerarity, T. L. (1998). Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. *The Journal of Clinical Investigation*, 101(5), 1084-1093.

- Bots, S. H., Peters, S. A. E., & Woodward, M. (2017). Sex differences in coronary heart disease and stroke mortality : A global assessment of the effect of ageing between 1980 and 2010. *BMJ Global Health*, 2(2), e000298.
- Bott, A. J., Peng, I.-C., Fan, Y., Faubert, B., Zhao, L., Li, J., Neidler, S., Sun, Y., Jaber, N., Krokowski, D., Lu, W., Pan, J.-A., Powers, S., Rabinowitz, J., Hatzoglou, M., Murphy, D. J., Jones, R., Wu, S., Girnun, G., & Zong, W.-X. (2015). Oncogenic Myc induces expression of glutamine synthetase through promoter demethylation. *Cell metabolism*, 22(6), 1068-1077.
- Breslow, J. L. (1985). Human apolipoprotein molecular biology and genetic variation. *Annual Review of Biochemistry*, 54, 699-727.
- Breslow, J. L. (1996). Mouse models of atherosclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5262), 685-688.
- Brunzell, J. D., Hazzard, William R., Porte, D., & Bierman, E. L. (1973). Evidence for a Common, Saturable, Triglyceride Removal Mechanism for Chylomicrons and Very Low Density Lipoproteins in Man. *Journal of Clinical Investigation*, 52(7), 1578-1585.
- Buonassisi, V. (1973). Sulfated mucopolysaccharide synthesis and secretion in endothelial cell cultures. *Experimental Cell Research*, 76(2), 363-368.
- Buono, M. F., Slenders, L., Wesseling, M., Hartman, R. J. G., Monaco, C., den Ruijter, H. M., Pasterkamp, G., & Mokry, M. (2021). The changing landscape of the vulnerable plaque : A call for fine-tuning of preclinical models. *Vascular Pharmacology*, 141, 106924.
- Cameron, A. J., Shaw, J. E., & Zimmet, P. Z. (2004). The metabolic syndrome : Prevalence in worldwide populations. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 33(2), 351-375.
- Cardona, C., Sánchez-Mejías, E., Dávila, J. C., Martín-Rufián, M., Campos-Sandoval, J. A., Vitorica, J., Alonso, F. J., Matés, J. M., Segura, J. A., Norenberg, M. D., Rama Rao, K. V., Jayakumar, A. R., Gutiérrez, A., & Márquez, J. (2015). Expression of Gls and Gls2 glutaminase isoforms in astrocytes. *Glia*, 63(3), 365-382.
- Cariou, B., Si-Tayeb, K., & Le May, C. (2015). Role of PCSK9 beyond liver involvement. *Current Opinion in Lipidology*, 26(3), 155-161.
- Cassago, A., Ferreira, A. P. S., Ferreira, I. M., Fornezari, C., Gomes, E. R. M., Greene, K. S., Pereira, H. M., Garratt, R. C., Dias, S. M. G., & Ambrosio, A. L. B. (2012). Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), 1092-1097.
- Castell, L., Vance, C., Abbott, R., Marquez, J., & Eggleton, P. (2004). Granule localization of glutaminase in human neutrophils and the consequence of glutamine utilization for neutrophil activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 13305-13310.

- Chappell, J., Harman, J. L., Narasimhan, V. M., Yu, H., Foote, K., Simons, B. D., Bennett, M. R., & Jørgensen, H. F. (2016). Extensive Proliferation of a Subset of Differentiated, yet Plastic, Medial Vascular Smooth Muscle Cells Contributes to Neointimal Formation in Mouse Injury and Atherosclerosis Models. *Circulation Research*, *119*(12), 1313-1323.
- Chen, J., Zhang, S., Wu, J., Wu, S., Xu, G., & Wei, D. (2020). Essential Role of Nonessential Amino Acid Glutamine in Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *DNA and Cell Biology*, *39*(1), 8-15.
- Chen, S., Ma, J., Chi, J., Zhang, B., Zheng, X., Chen, J., & Liu, J. (2022). Roles and potential clinical implications of tissue transglutaminase in cardiovascular diseases. *Pharmacological Research*, *177*, 106085.
- Cheng, D., Talib, J., Stanley, C. P., Rashid, I., Michaëlsson, E., Lindstedt, E.-L., Croft, K. D., Kettle, A. J., Maghzal, G. J., & Stocker, R. (2019). Inhibition of MPO (Myeloperoxidase) Attenuates Endothelial Dysfunction in Mouse Models of Vascular Inflammation and Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *39*(7), 1448-1457.
- Cheng, S., Rhee, E. P., Larson, M. G., Lewis, G. D., McCabe, E. L., Shen, D., Palma, M. J., Roberts, L. D., Dejam, A., Souza, A. L., Deik, A. A., Magnusson, M., Fox, C. S., O'Donnell, C. J., Vasan, R. S., Melander, O., Clish, C. B., Gerszten, R. E., & Wang, T. J. (2012). Metabolite Profiling Identifies Pathways Associated with Metabolic Risk in Humans. *Circulation*, *125*(18), 2222-2231.
- Christ, A., Lauterbach, M., & Latz, E. (2019). Western Diet and the Immune System : An Inflammatory Connection. *Immunity*, *51*(5), 794-811.
- Chung-Bok, M. I., Vincent, N., Jhala, U., & Watford, M. (1997). Rat hepatic glutaminase : Identification of the full coding sequence and characterization of a functional promoter. *Biochemical Journal*, *324*(Pt 1), 193-200.
- Cifarelli, V., & Abumrad, N. A. (2018). Intestinal CD36 and Other Key Proteins of Lipid Utilization : Role in Absorption and Gut Homeostasis. In R. Terjung (Éd.), *Comprehensive Physiology* (1<sup>re</sup> éd., p. 493-507). Wiley.
- Clancy, K. P., Berger, R., Cox, M., Bleskan, J., Walton, K. A., Hart, I., & Patterson, D. (1996). Localization of the L-Glutamine Synthetase Gene to Chromosome 1q23. *Genomics*, *38*(3), 418-420.
- Cocciolone, A. J., Hawes, J. Z., Staiculescu, M. C., Johnson, E. O., Murshed, M., & Wagenseil, J. E. (2018). Elastin, arterial mechanics, and cardiovascular disease. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *315*(2), H189-H205.
- Conjard, A., Komaty, O., Delage, H., Boghossian, M., Martin, M., Ferrier, B., & Baverel, G. (2003). Inhibition of Glutamine Synthetase in the Mouse Kidney. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(40), 38159-38166.

- Cruzat, V., Macedo Rogero, M., Noel Keane, K., Curi, R., & Newsholme, P. (2018). Glutamine : Metabolism and Immune Function, Supplementation and Clinical Translation. *Nutrients*, *10*(11), Art. 11.
- Curthoys, N. P., & Watford, M. (1995). Regulation of Glutaminase Activity and Glutamine Metabolism. *Annual Review of Nutrition*, *15*(1), 133-159.
- de la Rosa, V., Campos-Sandoval, J. A., Martín-Rufián, M., Cardona, C., Matés, J. M., Segura, J. A., Alonso, F. J., & Márquez, J. (2009). A novel glutaminase isoform in mammalian tissues. *Neurochemistry International*, *55*(1-3), 76-84.
- DeBerardinis, R. J., & Cheng, T. (2010). Q's next : The diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene*, *29*(3), 313-324.
- de Carvalho Fernandes, G., Turchetto-Zolet, A. C., & Pereira Passaglia, L. M. (2022). Glutamine synthetase evolutionary history revisited : Tracing back beyond the Last Universal Common Ancestor. *Evolution*, *76*(3), 605-622.
- DeLaBarre, B., Gross, S., Fang, C., Gao, Y., Jha, A., Jiang, F., Song J, J., Wei, W., & Hurov, J. B. (2011). Full-length human glutaminase in complex with an allosteric inhibitor. *Biochemistry*, *50*(50), 10764-10770.
- Deroissart, J., Porsch, F., Koller, T., & Binder, C. J. (2021). Anti-inflammatory and Immunomodulatory Therapies in Atherosclerosis. In A. von Eckardstein & C. J. Binder (Éds.), *Prevention and Treatment of Atherosclerosis* (Vol. 270, p. 359-404). Springer International Publishing.
- Deweid, L., Hadjabdelhafid-Parisien, A., Lafontaine, K., Rochet, L. N. C., Kolmar, H., & Pelletier, J. N. (2020). Glutamine-walking : Creating reactive substrates for transglutaminase-mediated protein labeling. *Methods in Enzymology*, *644*, 121-148.
- Dubois, C., Eelen, G., & Carmeliet, P. (2019). [New non-metabolic role for glutamine synthetase in angiogenesis]. *Medecine Sciences: M/S*, *35*(5), 407-409.
- Durante, W. (2019). The Emerging Role of l-Glutamine in Cardiovascular Health and Disease. *Nutrients*, *11*(9), E2092.
- Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P., & Foufelle, F. (2004). SREBP transcription factors : Master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*, *86*(11), 839-848.
- Eckel, R. H., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet (London, England)*, *365*(9468), 1415-1428.
- Eelen, G., Dubois, C., Cantelmo, A. R., Goveia, J., Brüning, U., DeRan, M., Jarugumilli, G., van Rijssel, J., Saladino, G., Comitani, F., Zecchin, A., Rocha, S., Chen, R., Huang, H., Vandekeere, S., Kalucka, J., Lange, C., Morales-Rodriguez, F., Cruys, B., ... Carmeliet, P. (2018). Role of glutamine synthetase in angiogenesis beyond glutamine synthesis. *Nature*, *561*(7721), 63-69.
- Eid, T., Thomas, M., Spencer, D., Rundén-Pran, E., Lai, J., Malthankar, G., Kim, J., Danbolt, N., Ottersen, O., & de Lanerolle, N. (2004). Loss of glutamine synthetase in the

- human epileptogenic hippocampus : Possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *The Lancet*, 363(9402), 28-37.
- Eisenberg, D., Gill, H. S., Pfluegl, G. M. U., & Rotstein, S. H. (2000). Structure–function relationships of glutamine synthetases. This review is dedicated to Professor Hans Neurath on his 90th birthday. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1477(1), 122-145.
- Elgadi, K. M., Meguid, R. A., Qian, M., Souba, W. W., & Abcouwer, S. F. (1999). Cloning and analysis of unique human glutaminase isoforms generated by tissue-specific alternative splicing. *Physiological Genomics*, 1(2), 51-62.
- Emini Veseli, B., Perrotta, P., De Meyer, G. R. A., Roth, L., Van der Donckt, C., Martinet, W., & De Meyer, G. R. Y. (2017). Animal models of atherosclerosis. *European Journal of Pharmacology*, 816, 3-13.
- Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T., & Protter, A. A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(16), 11811-11816.
- Fahed, G., Aoun, L., Bou Zerdan, M., Allam, S., Bou Zerdan, M., Bouferraa, Y., & Assi, H. I. (2022). Metabolic Syndrome : Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 786.
- Falk, E. (2006). Pathogenesis of Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(8), C7-C12.
- Farrelly, L. A., Thompson, R. E., Zhao, S., Lepack, A. E., Lyu, Y., Bhanu, N. V., Zhang, B., Loh, Y.-H. E., Ramakrishnan, A., Vadodaria, K. C., Heard, K. J., Erikson, G., Nakadai, T., Bastle, R. M., Lukasak, B. J., Zebroski, H., Alenina, N., Bader, M., Berton, O., ... Maze, I. (2019). Histone serotonylation is a permissive modification that enhances TFIID binding to H3K4me3. *Nature*, 567(7749), 535-539.
- Feingold, K. R. (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. In K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W. W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, J. M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C. S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, M. Levy, E. A. McGee, ... D. P. Wilson (Éds.), *Endotext*. MDText.com, Inc. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>
- Feng, B., Banner, C., & Max, S. R. (1990). Effect of diabetes on glutamine synthetase expression in rat skeletal muscles. *The American Journal of Physiology*, 258(5 Pt 1), E762-766.
- Ferreira, A. P. S., Cassago, A., Gonçalves, K. de A., Dias, M. M., Adamoski, D., Ascensão, C. F. R., Honorato, R. V., de Oliveira, J. F., Ferreira, I. M., Fornezari, C., Bettini, J., Oliveira, P. S. L., Paes Leme, A. F., Portugal, R. V., Ambrosio, A. L. B., & Dias, S. M. G. (2013). Active glutaminase C self-assembles into a supratetrameric oligomer that can be disrupted by an allosteric inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(39), 28009-28020.
- Ferreira, I. M., Quesñay, J. E. N., Bastos, A. CS., Rodrigues, C. T., Vollmar, M., Krojer, T., Strain-Damerell, C., Burgess-Brown, N. A., von Delft, F., Yue, W. W., Dias, S. MG.,

- & Ambrosio, A. LB. (2021). Structure and activation mechanism of the human liver-type glutaminase GLS2. *Biochimie*, 185, 96-104.
- Fève, B., Bastard, C., Fellahi, S., Bastard, J.-P., & Capeau, J. (2016). New adipokines. *Annales D'endocrinologie*, 77(1), 49-56.
- Fhayli, W., Boëté, Q., Harki, O., Briançon-Marjollet, A., Jacob, M.-P., & Faury, G. (2019). Rise and fall of elastic fibers from development to aging. Consequences on arterial structure-function and therapeutical perspectives. *Matrix Biology*, 84, 41-56.
- Fiuza-Luces, C., Santos-Lozano, A., Joyner, M., Carrera-Bastos, P., Picazo, O., Zugaza, J. L., Izquierdo, M., Ruilope, L. M., & Lucia, A. (2018). Exercise benefits in cardiovascular disease : Beyond attenuation of traditional risk factors. *Nature Reviews Cardiology*, 15(12), 731-743.
- Fournet, M., Bonté, F., & Desmoulière, A. (2018). Glycation Damage : A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging. *Aging and Disease*, 9(5), 880-900.
- Ganda, A., Magnusson, M., Yvan-Charvet, L., Hedblad, B., Engström, G., Ai, D., Wang, T. J., Gerszten, R. E., Melander, O., & Tall, A. R. (2013). Mild Renal Dysfunction and Metabolites Tied to Low HDL Cholesterol Are Associated With Monocytosis and Atherosclerosis. *Circulation*, 127(9), 988-996.
- Garçon, D., Moreau, F., Ayer, A., Dijk, W., Prieur, X., Arnaud, L., Roubtsova, A., Seidah, N., Prat, A., Cariou, B., & Le May, C. (2020). Circulating Rather Than Intestinal PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9) Regulates Postprandial Lipemia in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40(9), 2084-2094.
- Gebhardt, R., & Williams, G. M. (1995). Glutamine synthetase and hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis*, 16(8), 1673-1681.
- George, J., Rapsomaniki, E., Pujades-Rodriguez, M., Shah, A. D., Denaxas, S., Herrett, E., Smeeth, L., Timmis, A., & Hemingway, H. (2015). How Does Cardiovascular Disease First Present in Women and Men? Incidence of 12 Cardiovascular Diseases in a Contemporary Cohort of 1,937,360 People. *Circulation*, 132(14), 1320-1328.
- Getz, G. S., & Reardon, C. A. (2009). Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl, S156-161.
- Getz, G. S., & Reardon, C. A. (2012). Animal Models of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(5), 1104-1115.
- Gijbels, M. J. J., van der Cammen, M., van der Laan, L. J. W., Emeis, J. J., Havekes, L. M., Hofker, M. H., & Kraal, G. (1999). Progression and regression of atherosclerosis in APOE3-Leiden transgenic mice : An immunohistochemical study. *Atherosclerosis*, 143(1), 15-25.
- Gleeson, M. (2008). Dosing and efficacy of glutamine supplementation in human exercise and sport training. *The Journal of Nutrition*, 138(10), 2045S-2049S.
- Gómez-Fabre, P. M., Aledo, J. C., Del Castillo-Olivares, A., Alonso, F. J., Núñez De Castro, I., Campos, J. A., & Márquez, J. (2000). Molecular cloning, sequencing and

- expression studies of the human breast cancer cell glutaminase. *The Biochemical Journal*, 345 Pt 2, 365-375.
- Gonçalves, G. A. R., & Paiva, R. de M. A. (2017). Gene therapy : Advances, challenges and perspectives. *Einstein*, 15(3), 369-375.
- Gräbner, R., Lötzer, K., Döpping, S., Hildner, M., Radke, D., Beer, M., Spanbroek, R., Lippert, B., Reardon, C. A., Getz, G. S., Fu, Y.-X., Hehlhans, T., Mebius, R. E., van der Wall, M., Kruspe, D., Englert, C., Lovas, A., Hu, D., Randolph, G. J., ... Habenicht, A. J. R. (2009). Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE<sup>-/-</sup> mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(1), 233-248.
- Grajeda-Iglesias, C., & Aviram, M. (2018). Specific Amino Acids Affect Cardiovascular Diseases and Atherogenesis via Protection against Macrophage Foam Cell Formation : Review Article. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 9(3), e0022.
- Greaves, D. R., & Gordon, S. (2009). The macrophage scavenger receptor at 30 years of age : Current knowledge and future challenges. *Journal of Lipid Research*, 50 Suppl, S282-286.
- group Janke : Tubulin Polymodifications. (2012, juillet 24).  
<https://web.archive.org/web/20120724002022/https://perso.curie.fr/Carsten.Janke/>
- Groux-Degroote, S., Cavdarli, S., Uchimura, K., Allain, F., & Delannoy, P. (2020). Glycosylation changes in inflammatory diseases. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 119, 111-156.
- Grover, S. P., & Mackman, N. (2020). Tissue factor in atherosclerosis and atherothrombosis. *Atherosclerosis*, 307, 80-86.
- Gudelj, I., & Lauc, G. (2018). Protein N-Glycosylation in Cardiovascular Diseases and Related Risk Factors. *Current Cardiovascular Risk Reports*, 12(6), 16.
- Ha, Y. C., Calvert, G. D., McIntosh, G. H., & Barter, P. J. (1981). A physiologic role for the esterified cholesterol transfer protein : In vivo studies in rabbits and pigs. *Metabolism*, 30(4), 380-383.
- Harth, G., & Horwitz, M. A. (1999). An inhibitor of exported Mycobacterium tuberculosis glutamine synthetase selectively blocks the growth of pathogenic mycobacteria in axenic culture and in human monocytes : Extracellular proteins as potential novel drug targets. *The Journal of Experimental Medicine*, 189(9), 1425-1436.
- Hastie, E., & Samulski, R. J. (2015). Adeno-Associated Virus at 50 : A Golden Anniversary of Discovery, Research, and Gene Therapy Success—A Personal Perspective. *Human Gene Therapy*, 26(5), 257-265.
- Häussinger, D., Hallbrucker, C., Saha, N., Lang, F., & Gerok, W. (1992). Cell volume and bile acid excretion. *The Biochemical Journal*, 288 ( Pt 2), 681-689.
- Häussinger, D., & Schliess, F. (2007). Glutamine metabolism and signaling in the liver. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 12, 371-391.

- He, Y., Hakvoort, T. B. M., Köhler, S. E., Vermeulen, J. L. M., de Waart, D. R., de Theije, C., ten Have, G. A. M., van Eijk, H. M. H., Kunne, C., Labruyere, W. T., Houten, S. M., Sokolovic, M., Ruijter, J. M., Deutz, N. E. P., & Lamers, W. H. (2010). Glutamine Synthetase in Muscle Is Required for Glutamine Production during Fasting and Extrahepatic Ammonia Detoxification. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(13), 9516-9524.
- He, Y., Kothari, V., & Bornfeldt, K. E. (2018). High-Density Lipoprotein Function in Cardiovascular Disease and Diabetes Mellitus. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(2).
- He, Y.-X., Gui, L., Liu, Y.-Z., Du, Y., Zhou, Y., Li, P., & Zhou, C.-Z. (2009). Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* glutamine synthetase Gln1 suggests a nanotube-like supramolecular assembly. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 76(1), 249-254.
- Heeren, J., & Scheja, L. (2021). Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. *Molecular Metabolism*, 50, 101238.
- Heyland, D., Muscedere, J., Wischmeyer, P. E., Cook, D., Jones, G., Albert, M., Elke, G., Berger, M. M., & Day, A. G. (2013). A Randomized Trial of Glutamine and Antioxidants in Critically Ill Patients. *New England Journal of Medicine*, 368(16), 1489-1497.
- High, K. A., & Roncarolo, M. G. (2019). Gene Therapy. *New England Journal of Medicine*, 381(5), 455-464.
- Hotamisligil, G. S. (2006). Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444(7121), 860-867.
- Hu, W., Zhang, C., Wu, R., Sun, Y., Levine, A., & Feng, Z. (2010). Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), 7455-7460.
- Huang, L., Chambliss, K. L., Gao, X., Yuhanna, I. S., Behling-Kelly, E., Bergaya, S., Ahmed, M., Michaely, P., Luby-Phelps, K., Darehshouri, A., Xu, L., Fisher, E. A., Ge, W.-P., Mineo, C., & Shaul, P. W. (2019). SR-B1 drives endothelial cell LDL transcytosis via DOCK4 to promote atherosclerosis. *Nature*, 569(7757), Art. 7757.
- Hwang, A.-R., Nam, J.-O., & Kang, Y. J. (2018). Fluvastatin inhibits advanced glycation end products-induced proliferation, migration, and extracellular matrix accumulation in vascular smooth muscle cells by targeting connective tissue growth factor. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 22(2), 193.
- Ignatowski, A. (1909). Über die Wirkung des tierischen Eiweißes auf die Aorta und die parenchymatösen Organe der Kaninchen. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 198(2), 248-270.
- Ikeda, J., Scipione, C. A., Hyduk, S. J., Althagafi, M. G., Atif, J., Dick, S. A., Rajora, M., Jang, E., Emoto, T., Murakami, J., Ikeda, N., Ibrahim, H. M., Polenz, C. K., Gao, X., Tai, K., Jongstra-Bilen, J., Nakashima, R., Epelman, S., Robbins, C. S., ... Cybulsky,

- M. I. (2021). Radiation Impacts Early Atherosclerosis by Suppressing Intimal LDL Accumulation. *Circulation Research*, 128(4), 530-543.
- Imanishi, T., Ikejima, H., Tsujioka, H., Kuroi, A., Ishibashi, K., Komukai, K., Tanimoto, T., Ino, Y., Takeshita, T., & Akasaka, T. (2010). Association of monocyte subset counts with coronary fibrous cap thickness in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis*, 212(2), 628-635.
- Incalza, M. A., D'Oria, R., Natalicchio, A., Perrini, S., Laviola, L., & Giorgino, F. (2018). Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascular Pharmacology*, 100, 1-19.
- Ionita, M. G., van den Borne, P., Catanzariti, L. M., Moll, F. L., de Vries, J.-P. P. M., Pasterkamp, G., Vink, A., & de Kleijn, D. P. V. (2010). High Neutrophil Numbers in Human Carotid Atherosclerotic Plaques Are Associated With Characteristics of Rupture-Prone Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(9), 1842-1848.
- Ishibashi, S., Brown, M. S., Goldstein, J. L., Gerard, R. D., Hammer, R. E., & Herz, J. (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *The Journal of Clinical Investigation*, 92(2), 883-893.
- Ishibashi, S., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Herz, J., & Burns, D. K. (1994). Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 93(5), 1885-1893.
- Isomaa, B., Almgren, P., Tuomi, T., Forsén, B., Lahti, K., Nissén, M., Taskinen, M. R., & Groop, L. (2001). Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*, 24(4), 683-689.
- Jacque, N. (2015). *Etude du métabolisme de la glutamine dans les leucémies aiguës myéloïdes*. 138.
- Jaffe, E. A. (1987). Cell biology of endothelial cells. *Human Pathology*, 18(3), 234-239.
- Janke, C., & Magiera, M. M. (2020). The tubulin code and its role in controlling microtubule properties and functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 21(6), 307-326.
- Jha, A. K., Huang, S. C.-C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., Chmielewski, K., Stewart, K. M., Ashall, J., Everts, B., Pearce, E. J., Driggers, E. M., & Artyomov, M. N. (2015). Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*, 42(3), 419-430.
- Joo, H. K., Park, Y. W., Jang, Y. Y., & Lee, J. Y. (2018). Structural Analysis of Glutamine Synthetase from *Helicobacter pylori*. *Scientific Reports*, 8(1), Art. 1.
- Jordan, S., Tung, N., Casanova-Acebes, M., Chang, C., Cantoni, C., Zhang, D., Wirtz, T. H., Naik, S., Rose, S. A., Brocker, C. N., Gainullina, A., Hornburg, D., Horng, S., Maier, B. B., Cravedi, P., LeRoith, D., Gonzalez, F. J., Meissner, F., Ochando, J., ... Merad,

- M. (2019). Dietary Intake Regulates the Circulating Inflammatory Monocyte Pool. *Cell*, 178(5), 1102-1114.e17.
- Joseph, P., Leong, D., McKee, M., Anand, S. S., Schwalm, J.-D., Teo, K., Mente, A., & Yusuf, S. (2017). Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1 : The Epidemiology and Risk Factors. *Circulation Research*, 121(6), 677-694.
- Karnik, S. K., Brooke, B. S., Bayes-Genis, A., Sorensen, L., Wythe, J. D., Schwartz, R. S., Keating, M. T., & Li, D. Y. (2003). A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development (Cambridge, England)*, 130(2), 411-423.
- Katt, W. P., Lukey, M. J., & Cerione, R. A. (2017). A tale of two glutaminases : Homologous enzymes with distinct roles in tumorigenesis. *Future Medicinal Chemistry*, 9(2), 223-243.
- Keillor, J. W., Apperley, K. Y. P., & Akbar, A. (2015). Inhibitors of tissue transglutaminase. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(1), 32-40.
- Keillor, J. W., & Johnson, G. V. W. (2021). Transglutaminase 2 as a therapeutic target for neurological conditions. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 25(9), 721-731.
- Kettunen, J., Tukiainen, T., Sarin, A.-P., Ortega-Alonso, A., Tikkanen, E., Lyytikäinen, L.-P., Kangas, A. J., Soininen, P., Würtz, P., Silander, K., Dick, D. M., Rose, R. J., Savolainen, M. J., Viikari, J., Kähönen, M., Lehtimäki, T., Pietiläinen, K. H., Inouye, M., McCarthy, M. I., ... Ripatti, S. (2012). Genome-wide association study identifies multiple loci influencing human serum metabolite levels. *Nature genetics*, 44(3), 269-276.
- Keul, P., Peters, S., von Wnuck Lipinski, K., Schröder, N. H., Nowak, M. K., Duse, D. A., Polzin, A., Weske, S., Gräler, M. H., & Levkau, B. (2022). Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Lyase Inhibition Aggravates Atherosclerosis and Induces Plaque Rupture in ApoE<sup>-/-</sup> Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17), Art. 17.
- Kiss, M. G., & Binder, C. J. (2022). The multifaceted impact of complement on atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 351, 29-40.
- Knowles, J. W., & Maeda, N. (2000). Genetic Modifiers of Atherosclerosis in Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(11), 2336-2345.
- Koo, A., Dewey, C. F., & García-Cardena, G. (2013). Hemodynamic shear stress characteristic of atherosclerosis-resistant regions promotes glycocalyx formation in cultured endothelial cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 304(2), C137-146.
- Kovanen, P. T. (2019). Mast Cells as Potential Accelerators of Human Atherosclerosis—From Early to Late Lesions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4479.
- Krajewski, W. W., Collins, R., Holmberg-Schiavone, L., Jones, T. A., Karlberg, T., & Mowbray, S. L. (2008). Crystal Structures of Mammalian Glutamine Synthetases Illustrate Substrate-Induced Conformational Changes and Provide Opportunities for Drug and Herbicide Design. *Journal of Molecular Biology*, 375(1), 217-228.

- Krebs, H. A. (1935). Metabolism of amino-acids : The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. *The Biochemical Journal*, 29(8), 1951-1969.
- Krettek, A., Sukhova, G. K., & Libby, P. (2003). Elastogenesis in Human Arterial Disease : A Role for Macrophages in Disordered Elastin Synthesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(4), 582-587.
- Kühnast, S., van der Tuin, S. J. L., van der Hoorn, J. W. A., van Klinken, J. B., Simic, B., Pieterman, E., Havekes, L. M., Landmesser, U., Lüscher, T. F., Willems van Dijk, K., Rensen, P. C. N., Jukema, J. W., & Princen, H. M. G. (2015). Anacetrapib reduces progression of atherosclerosis, mainly by reducing non-HDL-cholesterol, improves lesion stability and adds to the beneficial effects of atorvastatin. *European Heart Journal*, 36(1), 39-50.
- Kumada, Y., Benson, D. R., Hillemann, D., Hosted, T. J., Rochefort, D. A., Thompson, C. J., Wohlleben, W., & Tateno, Y. (1993). Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest existing and functioning genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(7), 3009-3013.
- Kung, H.-N., Marks, J. R., & Chi, J.-T. (2011). Glutamine synthetase is a genetic determinant of cell type-specific glutamine independence in breast epithelia. *PLoS Genetics*, 7(8), e1002229.
- Kuzan, A., Chwiłkowska, A., Pezowicz, C., Witkiewicz, W., Gamian, A., Maksymowicz, K., & Kobielarz, M. (2017). The content of collagen type II in human arteries is correlated with the stage of atherosclerosis and calcification foci. *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology*, 28, 21-27.
- Kylin, E. Studien. (1923). Kylin E. Studien. Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämiesyndrome. *Zentralblatt für innere Medizin* (44). 1923.
- Labow, B. I., Souba, W. W., & Abcouwer, S. F. (1999). Glutamine synthetase expression in muscle is regulated by transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *The American Journal of Physiology*, 276(6), E1136-1145.
- Lacy, M., Atzler, D., Liu, R., de Winther, M., Weber, C., & Lutgens, E. (2019). Interactions between dyslipidemia and the immune system and their relevance as putative therapeutic targets in atherosclerosis. *Pharmacology & Therapeutics*, 193, 50-62.
- Lampugnani, M. G. (2012). Endothelial Cell-to-Cell Junctions : Adhesion and Signaling in Physiology and Pathology. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(10), a006528-a006528.
- Laterza, O. F., & Curthoys, N. P. (2000). Effect of Acidosis on the Properties of the Glutaminase mRNA pH-Response Element Binding Protein. *Journal of the American Society of Nephrology*, 11(9), 1583-1588.
- Lawton, J. S., Tamis-Holland, J. E., Bangalore, S., Bates, E. R., Beckie, T. M., Bischoff, J. M., Bittl, J. A., Cohen, M. G., DiMaio, J. M., Don, C. W., Fremes, S. E., Gaudino, M. F., Goldberger, Z. D., Grant, M. C., Jaswal, J. B., Kurlansky, P. A., Mehran, R., Metkus, T. S., Nnacheta, L. C., ... Zwischenberger, B. A. (2022). 2021

ACC/AHA/SCAI Guideline for Coronary Artery Revascularization : Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*, 145(3).

- Le May, C., Berger, J. M., Lespine, A., Pillot, B., Prieur, X., Letessier, E., Hussain, M. M., Collet, X., Cariou, B., & Costet, P. (2013). Transintestinal Cholesterol Excretion Is an Active Metabolic Process Modulated by PCSK9 and Statin Involving ABCB1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(7), 1484-1493.
- Lechner, K., McKenzie, A. L., Kränkel, N., Von Schacky, C., Worm, N., Nixdorff, U., Lechner, B., Scherr, J., Weingärtner, O., & Krauss, R. M. (2020). High-Risk Atherosclerosis and Metabolic Phenotype : The Roles of Ectopic Adiposity, Atherogenic Dyslipidemia, and Inflammation. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 18(4), 176-185.
- Lee, Y.-Z., Yang, C.-W., Chang, H.-Y., Hsu, H.-Y., Chen, I.-S., Chang, H.-S., Lee, C.-H., Lee, J., Kumar, C. R., Qiu, Y.-Q., Chao, Y.-S., & Lee, S.-J. (2014). Discovery of selective inhibitors of Glutaminase-2, which inhibit mTORC1, activate autophagy and inhibit proliferation in cancer cells. *Oncotarget*, 5(15), 6087-6101.
- Leening, M. J. G., Ferket, B. S., Steyerberg, E. W., Kavousi, M., Deckers, J. W., Nieboer, D., Heeringa, J., Portegies, M. L. P., Hofman, A., Ikram, M. A., Hunink, M. G. M., Franco, O. H., Stricker, B. H., Witteman, J. C. M., & Roos-Hesselink, J. W. (2014). Sex differences in lifetime risk and first manifestation of cardiovascular disease : Prospective population based cohort study. *BMJ*, 349, g5992.
- Lewis, G. F., & Rader, D. J. (2005). New Insights Into the Regulation of HDL Metabolism and Reverse Cholesterol Transport. *Circulation Research*, 96(12), 1221-1232.
- Li, B., Lu, X., Wang, J., He, X., Gu, Q., Wang, L., & Yang, Y. (2018). The metabonomics study of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) deficiency inhibiting the progression of atherosclerosis in LDLR<sup>-/-</sup> mice. *International Journal of Biological Sciences*, 14(1), 36-46.
- Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., Tokgözoğlu, L., & Lewis, E. F. (2019). Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*, 5(1), Art. 1.
- Libby, P., Loscalzo, J., Ridker, P. M., Farkouh, M. E., Hsue, P. Y., Fuster, V., Hasan, A. A., & Amar, S. (2018). Inflammation, Immunity, and Infection in Atherothrombosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(17), 2071-2081.
- Limberis, M. P., Vandenberghe, L. H., Zhang, L., Pickles, R. J., & Wilson, J. M. (2009). Transduction Efficiencies of Novel AAV Vectors in Mouse Airway Epithelium In Vivo and Human Ciliated Airway Epithelium In Vitro. *Molecular Therapy*, 17(2), 294-301.
- Linton, M. F., Atkinson, J. B., & Fazio, S. (1995). Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5200), 1034-1037.

- Liu, X., Wu, H., Byrne, M., Krane, S., & Jaenisch, R. (1997). Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), 1852-1856.
- Lovett, J. K., Gallagher, P. J., Hands, L. J., Walton, J., & Rothwell, P. M. (2004). Histological Correlates of Carotid Plaque Surface Morphology on Lumen Contrast Imaging. *Circulation*, 110(15), 2190-2197.
- Lupieri, A., Blaise, R., Ghigo, A., Smirnova, N., Sarthou, M.-K., Malet, N., Limon, I., Vincent, P., Hirsch, E., Gayral, S., Ramel, D., & Laffargue, M. (2020). A non-catalytic function of PI3K $\gamma$  drives smooth muscle cell proliferation after arterial damage. *Journal of Cell Science*, 133(13), jcs245969.
- Lutgens, E., Daemen, M., Kockx, M., Doevendans, P., Hofker, M., Havekes, L., Wellens, H., & de Muinck, E. D. (1999). Atherosclerosis in APOE\*3-Leiden Transgenic Mice. *Circulation*, 99(2), 276-283.
- Ma, W., Heianza, Y., Huang, T., Wang, T., Sun, D., Zheng, Y., Hu, F. B., Rexrode, K. M., Manson, J. E., & Qi, L. (2018). Dietary glutamine, glutamate and mortality : Two large prospective studies in US men and women. *International Journal of Epidemiology*, 47(1), 311-320.
- Maagdenberg, A. M. van den, Hofker, M. H., Krimpenfort, P. J., Bruijn, I. de, Vlijmen, B. van, Boom, H. van der, Havekes, L. M., & Frants, R. R. (1993). Transgenic mice carrying the apolipoprotein E3-Leiden gene exhibit hyperlipoproteinemia. *Journal of Biological Chemistry*, 268(14), 10540-10545.
- Mach, F., Baigent, C., Catapano, A. L., Koskinas, K. C., Casula, M., Badimon, L., Chapman, M. J., De Backer, G. G., Delgado, V., Ference, B. A., Graham, I. M., Halliday, A., Landmesser, U., Mihaylova, B., Pedersen, T. R., Riccardi, G., Richter, D. J., Sabatine, M. S., Taskinen, M.-R., ... Patel, R. S. (2020). 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias : Lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European Heart Journal*, 41(1), 111-188.
- Mäkinen, P. I., Koponen, J. K., Kärkkäinen, A.-M., Malm, T. M., Pulkkinen, K. H., Koistinaho, J., Turunen, M. P., & Ylä-Herttuala, S. (2006). Stable RNA interference : Comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain. *The Journal of Gene Medicine*, 8(4), 433-441.
- Mansour, A., Mohajeri-Tehrani, M. R., Qorbani, M., Heshmat, R., Larijani, B., & Hosseini, S. (2015). Effect of glutamine supplementation on cardiovascular risk factors in patients with type 2 diabetes. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 31(1), 119-126.
- Mao, L., Yin, R., Yang, L., & Zhao, D. (2022). Role of advanced glycation end products on vascular smooth muscle cells under diabetic atherosclerosis. *Frontiers in Endocrinology*, 13, 983723.
- Mao, X., Chen, H., Lin, A. Z., Kim, S., Burczynski, M. E., Na, E., Halasz, G., Sleeman, M. W., Murphy, A. J., Okamoto, H., & Cheng, X. (2022). Glutaminase 2 knockdown reduces hyperammonemia and associated lethality of urea cycle disorder mouse model. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 45(3), 470-480.

- Mariko, B., Pezet, M., Escoubet, B., Bouillot, S., Andrieu, J.-P., Starcher, B., Quaglino, D., Jacob, M.-P., Huber, P., Ramirez, F., & Faury, G. (2011). Fibrillin-1 genetic deficiency leads to pathological ageing of arteries in mice : Arterial ageing in fibrillin-1-deficient mice. *The Journal of Pathology*, 224(1), 33-44.
- Marques, L. R., Diniz, T. A., Antunes, B. M., Rossi, F. E., Caperuto, E. C., Lira, F. S., & Gonçalves, D. C. (2018). Reverse Cholesterol Transport : Molecular Mechanisms and the Non-medical Approach to Enhance HDL Cholesterol. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.00526>
- Márquez, J., López de la Oliva, A. R., Matés, J. M., Segura, J. A., & Alonso, F. J. (2006). Glutaminase : A multifaceted protein not only involved in generating glutamate. *Neurochemistry International*, 48(6), 465-471.
- Márquez, J., Matés, J. M., & Campos-Sandoval, J. A. (2016). Glutaminases. *Advances in Neurobiology*, 13, 133-171.
- Martinez-Hernandez, A., Bell, K. P., & Norenberg, M. D. (1977). Glutamine Synthetase : Glial Localization in Brain. *Science*, 195(4284), 1356-1358.
- Martín-Rufián, M., Nascimento-Gomes, R., Higuero, A., Crisma, A. R., Campos-Sandoval, J. A., Gómez-García, M. C., Cardona, C., Cheng, T., Lobo, C., Segura, J. A., Alonso, F. J., Szeliga, M., Albrecht, J., Curi, R., Márquez, J., Colquhoun, A., DeBerardinis, R. J., & Matés, J. M. (2014). Both GLS silencing and GLS2 overexpression synergize with oxidative stress against proliferation of glioma cells. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 92(3), 277-290.
- Martín-Rufián, M., Tosina, M., Campos-Sandoval, J. A., Manzanares, E., Lobo, C., Segura, J. A., Alonso, F. J., Matés, J. M., & Márquez, J. (2012). Mammalian Glutaminase Gls2 Gene Encodes Two Functional Alternative Transcripts by a Surrogate Promoter Usage Mechanism. *PLoS ONE*, 7(6), e38380.
- Matés, J. M., Campos-Sandoval, J. A., & Márquez, J. (2018). Glutaminase isoenzymes in the metabolic therapy of cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, 1870(2), 158-164.
- Mates, J., Segura, J., Alonso, F., & Marquez, J. (2011). Glutaminase. *Amino Acids in Human Nutrition and Health*, 121-136.
- Matlung, H. L., Neele, A. E., Groen, H. C., van Gaalen, K., Tuna, B. G., van Weert, A., de Vos, J., Wentzel, J. J., Hoogenboezem, M., van Buul, J. D., VanBavel, E., & Bakker, E. N. T. P. (2012). Transglutaminase activity regulates atherosclerotic plaque composition at locations exposed to oscillatory shear stress. *Atherosclerosis*, 224(2), 355-362.
- Maurice, P., Blaise, S., Gayral, S., Debelle, L., Laffargue, M., Hornebeck, W., & Duca, L. (2013). Elastin fragmentation and atherosclerosis progression : The elastokine concept. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 23(6), 211-221.
- Mays, L. E., Wang, L., Lin, J., Bell, P., Crawford, A., Wherry, E. J., & Wilson, J. M. (2014). AAV8 Induces Tolerance in Murine Muscle as a Result of Poor APC Transduction, T

- Cell Exhaustion, and Minimal MHCI Upregulation on Target Cells. *Molecular Therapy*, 22(1), 28-41.
- McCarty, D. M. (2008). Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(10), 1648-1656.
- McCarty, D. M., Monahan, P. E., & Samulski, R. J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Therapy*, 8(16), 1248-1254.
- Medina-Leyte, D. J., Zepeda-García, O., Domínguez-Pérez, M., González-Garrido, A., Villarreal-Molina, T., & Jacobo-Albavera, L. (2021). Endothelial Dysfunction, Inflammation and Coronary Artery Disease : Potential Biomarkers and Promising Therapeutical Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3850.
- Medley, T. L., Cole, T. J., Gatzka, C. D., Wang, W. Y. S., Dart, A. M., & Kingwell, B. A. (2002). Fibrillin-1 Genotype Is Associated With Aortic Stiffness and Disease Severity in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation*, 105(7), 810-815.
- Mehrotra, P., & Ravichandran, K. S. (2022). Drugging the efferocytosis process : Concepts and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(8), 601-620.
- Meigs, J. B., Mittleman, M. A., Nathan, D. M., Tofler, G. H., Singer, D. E., Murphy-Sheehy, P. M., Lipinska, I., D'Agostino, R. B., & Wilson, P. W. (2000). Hyperinsulinemia, hyperglycemia, and impaired hemostasis : The Framingham Offspring Study. *JAMA*, 283(2), 221-228.
- Mendis, S., Graham, I., & Narula, J. (s. d.). Addressing the Global Burden of Cardiovascular Diseases; Need for Scalable and Sustainable Frameworks. *Global Heart*, 17(1), 48.
- Mendivil, C. O., Furtado, J., Morton, A. M., Wang, L., & Sacks, F. M. (2016). Novel Pathways of Apolipoprotein A-I Metabolism in High-Density Lipoprotein of Different Sizes in Humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(1), 156-165.
- Merlin, J., Ivanov, S., Dumont, A., Sergushichev, A., Gall, J., Stunault, M., Ayrault, M., Vaillant, N., Castiglione, A., Swain, A., Orange, F., Gallerand, A., Berton, T., Martin, J.-C., Carobbio, S., Masson, J., Gaisler-Salomon, I., Maechler, P., Rayport, S., ... Yvan-Charvet, L. (2021). Non-canonical glutamine transamination sustains efferocytosis by coupling redox buffering to oxidative phosphorylation. *Nature metabolism*, 3(10), 1313-1326.
- Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *Journal of Cellular Physiology*, 196(3), 430-443.
- Mill, J. F., Mearow, K. M., Purohit, H. J., Haleem-Smith, H., King, R., & Freese, E. (1991). Cloning and functional characterization of the rat glutamine synthetase gene. *Molecular Brain Research*, 9(3), 197-207.
- Miller, R. A., Shi, Y., Lu, W., Pirman, D. A., Jatkar, A., Blatnik, M., Wu, H., Cárdenas, C., Wan, M., Foskett, J. K., Park, J. O., Zhang, Y., Holland, W. L., Rabinowitz, J. D., &

- Birnbaum, M. J. (2018). Targeting hepatic glutaminase activity to ameliorate hyperglycemia. *Nature Medicine*, *24*(4), 518-524.
- Mock, B., Kozak, C., Seldin, M. F., Ruff, N., D'Hoostelaere, L., Szpirer, C., Seuanez, H., O'Brien, S., & Banner, C. (1989). A glutaminase (Gls) gene maps to mouse chromosome 1, rat chromosome 9, and human chromosome 2. *Genomics*, *5*(2), 291-297.
- Morrow, V. A., Foufelle, F., Connell, J. M. C., Petrie, J. R., Gould, G. W., & Salt, I. P. (2003). Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(34), 31629-31639.
- Mundi, S., Massaro, M., Scoditti, E., Carluccio, M. A., van Hinsbergh, V. W. M., Iruela-Arispe, M. L., & De Caterina, R. (2018). Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors—A review. *Cardiovascular Research*, *114*(1), 35-52.
- Münzel, T., Sinning, C., Post, F., Warnholtz, A., & Schulz, E. (2008). Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Annals of Medicine*, *40*(3), 180-196.
- Murphy, A. J., Akhtari, M., Tolani, S., Pagler, T., Bijl, N., Kuo, C.-L., Wang, M., Sanson, M., Abramowicz, S., Welch, C., Bochem, A. E., Kuivenhoven, J. A., Yvan-Charvet, L., & Tall, A. R. (2011). ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *121*(10), 4138-4149.
- Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., & Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology*, *14*(1), 133-140.
- Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., & Strohl, W. R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *Biodrugs*, *31*(4), 317-334.
- Nathwani, A. C., Tuddenham, E. G. D., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D. C., Chowdary, P., Riddell, A., Pie, A. J., Harrington, C., O'Beirne, J., Smith, K., Pasi, J., Glader, B., Rustagi, P., Ng, C. Y. C., Kay, M. A., Zhou, J., Spence, Y., ... Davidoff, A. M. (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *The New England Journal of Medicine*, *365*(25), 2357-2365.
- National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). (2002). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, *106*(25), 3143-3421.
- Navazio, F., Gerritsen, T., & Wright, G. J. (1961). Relationship of ammonia intoxication to convulsions and coma in rats. *Journal of Neurochemistry*, *8*, 146-151.
- Negre-Salvayre, A., Guerby, P., Gayral, S., Laffargue, M., & Salvayre, R. (2020). Role of reactive oxygen species in atherosclerosis : Lessons from murine genetic models. *Free Radical Biology & Medicine*, *149*, 8-22.

- Newgard, C. B., An, J., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Lien, L. F., Haqq, A. M., Shah, S. H., Arlotto, M., Slentz, C. A., Rochon, J., Gallup, D., Ilkayeva, O., Wenner, B. R., Yancy, W. S., Eisensohn, H., Musante, G., Surwit, R. S., Millington, D. S., ... Svetkey, L. P. (2009). A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metabolism*, 9(4), 311-326.
- Nie, L., Das Thakur, M., Wang, Y., Su, Q., Zhao, Y., & Feng, Y. (2010). Regulation of U6 promoter activity by transcriptional interference in viral vector-based RNAi. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 8(3), 170-179.
- Nilsson, M. T., Krajewski, W. W., Yellagunda, S., Prabhurthy, S., Chamarahally, G. N., Siddamadappa, C., Srinivasa, B. R., Yahiaoui, S., Larhed, M., Karlén, A., Jones, T. A., & Mowbray, S. L. (2009). Structural Basis for the Inhibition of Mycobacterium tuberculosis Glutamine Synthetase by Novel ATP-Competitive Inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, 393(2), 504-513.
- Nissim, I. (1999). Newer aspects of glutamine/glutamate metabolism : The role of acute pH changes. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 277(4), F493-F497.
- Nurminskaya, M. V., & Belkin, A. M. (2012). Cellular Functions of Tissue Transglutaminase. *International review of cell and molecular biology*, 294, 1-97.
- Oikonomou, E. K., & Antoniades, C. (2019). The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease. *Nature Reviews. Cardiology*, 16(2), 83-99.
- Olalla, L., Aledo, J. C., Bannenberg, G., & Márquez, J. (2001). The C-terminus of human glutaminase L mediates association with PDZ domain-containing proteins. *FEBS Letters*, 488(3), 116-122.
- Olalla, L., Gutiérrez, A., Campos, J. A., Khan, Z. U., Alonso, F. J., Segura, J. A., Márquez, J., & Aledo, J. C. (2002). Nuclear Localization of L-type Glutaminase in Mammalian Brain\*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41), 38939-38944.
- Olivecrona, G. (2016). Role of lipoprotein lipase in lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 27(3), 233-241.
- O'Neill, L. A. J., & Pearce, E. J. (2016). Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *Journal of Experimental Medicine*, 213(1), 15-23.
- Opara, E. C., Petro, A., Tevrizian, A., Feinglos, M. N., & Surwit, R. S. (1996). L-glutamine supplementation of a high fat diet reduces body weight and attenuates hyperglycemia and hyperinsulinemia in C57BL/6J mice. *The Journal of Nutrition*, 126(1), 273-279.
- Oppi, S., Lüscher, T. F., & Stein, S. (2019). Mouse Models for Atherosclerosis Research- Which Is My Line? *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6, 46.
- Orekhov, A. N., Bobryshev, Y. V., & Chistiakov, D. A. (2014). The complexity of cell composition of the intima of large arteries : Focus on pericyte-like cells. *Cardiovascular Research*, 103(4), 438-451.

- Paalvast, Y., Gerding, A., Wang, Y., Bloks, V. W., van Dijk, T. H., Havinga, R., Willems van Dijk, K., Rensen, P. C. N., Bakker, B. M., Kuivenhoven, J. A., & Groen, A. K. (2017). Male apoE\*3-Leiden.CETP mice on high-fat high-cholesterol diet exhibit a biphasic dyslipidemic response, mimicking the changes in plasma lipids observed through life in men. *Physiological Reports*, 5(19), e13376.
- Packer, M. (2018). Epicardial Adipose Tissue May Mediate Deleterious Effects of Obesity and Inflammation on the Myocardium. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(20), 2360-2372.
- Pasterkamp, G., den Ruijter, H. M., & Giannarelli, C. (2022). False Utopia of One Unifying Description of the Vulnerable Atherosclerotic Plaque : A Call for Recalibration That Appreciates the Diversity of Mechanisms Leading to Atherosclerotic Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 42(4).
- Patel, M., & McGivan, J. D. (1984). Partial purification and properties of rat liver glutaminase. *Biochemical Journal*, 220(2), 583-590.
- Paxton, S., Peckham, M., & Knibbs, A. (2003). *The Leeds Histology Guide*. [https://www.histology.leeds.ac.uk/circulatory/circ\\_common\\_str.php](https://www.histology.leeds.ac.uk/circulatory/circ_common_str.php)
- Paynter, N. P., Balasubramanian, R., Giulianini, F., Wang, D. D., Tinker, L. F., Gopal, S., Deik, A. A., Bullock, K., Pierce, K. A., Scott, J., Martínez-González, M. A., Estruch, R., Manson, J. E., Cook, N. R., Albert, C. M., Clish, C. B., & Rexrode, K. M. (2018). Metabolic Predictors of Incident Coronary Heart Disease in Women. *Circulation*, 137(8), 841-853.
- Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2012). Muscles, exercise and obesity : Skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*, 8(8), 457-465.
- Penumatsa, K., Abualkhair, S., Wei, L., Warburton, R., Preston, I., Hill, N. S., Watts, S. W., Fanburg, B. L., & Toksoz, D. (2014). Tissue transglutaminase promotes serotonin-induced AKT signaling and mitogenesis in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Cellular Signalling*, 26(12), 2818-2825.
- Pérez-Gómez, C., Campos-Sandoval, J. A., Alonso, F. J., Segura, J. A., Manzanares, E., Ruiz-Sánchez, P., González, M. E., Márquez, J., & Matés, J. M. (2005). Co-expression of glutaminase K and L isoenzymes in human tumour cells. *The Biochemical Journal*, 386(Pt 3), 535-542.
- Pérez-Gómez, C., Matés, J. M., Gómez-Fabre, P. M., del Castillo-Olivares, A., Alonso, F. J., & Márquez, J. (2003). Genomic organization and transcriptional analysis of the human l-glutaminase gene. *The Biochemical Journal*, 370(Pt 3), 771-784.
- Peters, E. L., & Tower, D. B. (1959). Glutamic acid and glutamine metabolism in cerebral cortex after seizures induced by methionine sulphoximine. *Journal of Neurochemistry*, 5, 80-90.
- Piacentini, M., D'Eletto, M., Farrace, M. G., Rodolfo, C., Del Nonno, F., Ippolito, G., & Falasca, L. (2014). Characterization of distinct sub-cellular location of transglutaminase type II : Changes in intracellular distribution in physiological and pathological states. *Cell and Tissue Research*, 358(3), 793-805.

- Pirillo, A., Catapano, A. L., & Norata, G. D. (2019). Biological Consequences of Dysfunctional HDL. *Current Medicinal Chemistry*, 26(9), 1644-1664.
- Pirillo, A., Svecla, M., Catapano, A. L., Holleboom, A. G., & Norata, G. D. (2021). Impact of protein glycosylation on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Cardiovascular Research*, 117(4), 1033-1045.
- Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M., & Breslow, J. L. (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*, 71(2), 343-353.
- Porsch, F., Mallat, Z., & Binder, C. J. (2021). Humoral immunity in atherosclerosis and myocardial infarction : From B cells to antibodies. *Cardiovascular Research*, cvab285.
- Pothiwala, P., Jain, S. K., & Yaturu, S. (2009). Metabolic Syndrome and Cancer. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 7(4), 279-287.
- Powell, S. K., Rivera-Soto, R., & Gray, S. J. (2015). Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy. *Discovery medicine*, 19(102), 49-57.
- Pries, A. R., Secomb, T. W., & Gaehtgens, P. (2000). The endothelial surface layer. *Pflügers Archiv*, 440(5), 653-666.
- Proler, M., & Kellaway, P. (1962). The Methionine Sulfoximine Syndrome in the Cat. *Epilepsia*, 3(1), 117-130.
- Qi, L., Qi, Q., Prudente, S., Mendonca, C., Andreozzi, F., di Pietro, N., Sturma, M., Novelli, V., Mannino, G. C., Formoso, G., Gervino, E. V., Hauser, T. H., Muehlschlegel, J. D., Niewczas, M. A., Krolewski, A. S., Biolo, G., Pandolfi, A., Rimm, E., Sesti, G., ... Doria, A. (2013). Association Between a Genetic Variant Related to Glutamic Acid Metabolism and Coronary Heart Disease in Individuals With Type 2 Diabetes. *JAMA*, 310(8), 821-828.
- Rao, D. D., Vorhies, J. S., Senzer, N., & Nemunaitis, J. (2009). siRNA vs. shRNA : Similarities and differences. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(9), 746-759.
- Ren, W., Xia, Y., Chen, S., Wu, G., Bazer, F. W., Zhou, B., Tan, B., Zhu, G., Deng, J., & Yin, Y. (2019). Glutamine Metabolism in Macrophages : A Novel Target for Obesity/Type 2 Diabetes. *Advances in Nutrition*, 10(2), 321-330.
- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), a004978.
- Richman, P. G., Orłowski, M., & Meister, A. (1973). Inhibition of gamma-glutamylcysteine synthetase by L-methionine-S-sulfoximine. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(19), 6684-6690.
- Ridker, P. M., Everett, B. M., Pradhan, A., MacFadyen, J. G., Solomon, D. H., Zaharris, E., Mam, V., Hasan, A., Rosenberg, Y., Iturriaga, E., Gupta, M., Tsigoulis, M., Verma,

- S., Clearfield, M., Libby, P., Goldhaber, S. Z., Seagle, R., Ofori, C., Saklayen, M., ... Glynn, R. J. (2019). Low-Dose Methotrexate for the Prevention of Atherosclerotic Events. *New England Journal of Medicine*, 380(8), 752-762.
- Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S. D., Kastelein, J. J. P., Cornel, J. H., Pais, P., Pella, D., Genest, J., Cifkova, R., Lorenzatti, A., Forster, T., Kobalava, Z., ... Glynn, R. J. (2017). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New England Journal of Medicine*, 377(12), 1119-1131.
- Ried, M. U., Girod, A., Leike, K., Büning, H., & Hallek, M. (2002). Adeno-Associated Virus Capsids Displaying Immunoglobulin-Binding Domains Permit Antibody-Mediated Vector Retargeting to Specific Cell Surface Receptors. *Journal of Virology*, 76(9), 4559-4566.
- Robbins, P. D., & Ghivizzani, S. C. (1998). Viral vectors for gene therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, 80(1), 35-47.
- Roche-Molina, M., Sanz-Rosa, D., Cruz, F. M., García-Prieto, J., López, S., Abia, R., Muriana, F. J. G., Fuster, V., Ibáñez, B., & Bernal, J. A. (2015). Induction of Sustained Hypercholesterolemia by Single Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer of Mutant hPCSK9. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(1), 50-59.
- Rom, O., Grajeda-Iglesias, C., Najjar, M., Abu-Saleh, N., Volkova, N., Dar, D. E., Hayek, T., & Aviram, M. (2017). Atherogenicity of amino acids in the lipid-laden macrophage model system in vitro and in atherosclerotic mice : A key role for triglyceride metabolism. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 45, 24-38.
- Rosenson, R. S., Brewer, H. B., 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., & Yvan-Charvet, L. (2012). Cholesterol Efflux and Atheroprotection : Advancing the Concept of Reverse Cholesterol Transport. *Circulation*, 125(15), 1905-1919.
- Roth, E. (2008). Nonnutritive effects of glutamine. *The Journal of Nutrition*, 138(10), 2025S-2031S.
- Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., Barengo, N. C., Beaton, A. Z., Benjamin, E. J., Benziger, C. P., Bonny, A., Brauer, M., Brodmann, M., Cahill, T. J., Carapetis, J., Catapano, A. L., Chugh, S. S., Cooper, L. T., Coresh, J., ... Fuster, V. (2020). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(25), 2982-3021.
- Rucker, R. B., & Tinker, D. (1977). Structure and metabolism of arterial elastin. *International Review of Experimental Pathology*, 17, 1-47.
- Sacco, R. L., Benjamin, E. J., Broderick, J. P., Dyken, M., Easton, J. D., Feinberg, W. M., Goldstein, L. B., Gorelick, P. B., Howard, G., Kittner, S. J., Manolio, T. A., Whisnant, J. P., & Wolf, P. A. (1997). Risk Factors. *Stroke*, 28(7), 1507-1517.

- Samulski, R. J., & Muzyczka, N. (2014). AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annual Review of Virology*, 1(1), 427-451.
- Santiago-Ortiz, J. L., & Schaffer, D. V. (2016). Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in Cancer Gene Therapy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 240, 287-301.
- Sasahara, T., Nestel, P., Fidge, N., & Sviridov, D. (1998). Cholesterol transport between cells and high density lipoprotein subfractions from obese and lean subjects. *Journal of Lipid Research*, 39(3), 544-554.
- Scipione, C. A., & Cybulsky, M. I. (2022). Early atherogenesis : New insights from new approaches. *Current Opinion in Lipidology*, 33(5), 271-276.
- Sellmann, C., Baumann, A., Brandt, A., Jin, C. J., Nier, A., & Bergheim, I. (2017). Oral Supplementation of Glutamine Attenuates the Progression of Nonalcoholic Steatohepatitis in C57BL/6J Mice. *The Journal of Nutrition*, 147(11), 2041-2049.
- Shah, S. H., Bain, J. R., Muehlbauer, M. J., Stevens, R. D., Crosslin, D. R., Haynes, C., Dungan, J., Newby, L. K., Hauser, E. R., Ginsburg, G. S., Newgard, C. B., & Kraus, W. E. (2010). Association of a Peripheral Blood Metabolic Profile With Coronary Artery Disease and Risk of Subsequent Cardiovascular Events. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 3(2), 207-214.
- Shankman, L. S., Gomez, D., Cherepanova, O. A., Salmon, M., Alencar, G. F., Haskins, R. M., Swiatlowska, P., Newman, A. A. C., Greene, E. S., Straub, A. C., Isakson, B., Randolph, G. J., & Owens, G. K. (2015). KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nature Medicine*, 21(6), 628-637.
- Shapiro, S. D., Endicott, S. K., Province, M. A., Pierce, J. A., & Campbell, E. J. (1991). Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate and nuclear weapons-related radiocarbon. *Journal of Clinical Investigation*, 87(5), 1828-1834.
- Shen, Y., Zhang, Y., Li, W., Chen, K., Xiang, M., & Ma, H. (2021). Glutamine metabolism : From proliferating cells to cardiomyocytes. *Metabolism*, 121, 154778.
- Shrikhande, G. V., Scali, S. T., Silva, C. G. da, Damrauer, S. M., Csizmadia, E., Putheti, P., Matthey, M., Arjoon, R., Patel, R., Siracuse, J. J., Maccariello, E. R., Andersen, N. D., Monahan, T., Peterson, C., Essayagh, S., Studer, P., Guedes, R. P., Kocher, O., Usheva, A., ... Ferran, C. (2010). O-Glycosylation Regulates Ubiquitination and Degradation of the Anti-Inflammatory Protein A20 to Accelerate Atherosclerosis in Diabetic ApoE-Null Mice. *PLOS ONE*, 5(12), e14240.
- Shulman, G. I. (2014). Ectopic fat in insulin resistance, dyslipidemia, and cardiometabolic disease. *The New England Journal of Medicine*, 371(12), 1131-1141.
- Silveira Rossi, J. L., Barbalho, S. M., Reverete de Araujo, R., Bechara, M. D., Sloan, K. P., & Sloan, L. A. (2022). Metabolic syndrome and cardiovascular diseases : Going beyond traditional risk factors. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 38(3), e3502.

- Simon, J., Nuñez-García, M., Fernández-Tussy, P., Barbier-Torres, L., Fernández-Ramos, D., Gómez-Santos, B., Buqué, X., Lopitz-Otsoa, F., Goikoetxea-Usandizaga, N., Serrano-Macia, M., Rodríguez-Agudo, R., Bizkarguenaga, M., Zubiete-Franco, I., Gutiérrez-de Juan, V., Cabrera, D., Alonso, C., Iruzubieta, P., Romero-Gomez, M., van Liempd, S., ... Martínez-Chantar, M. L. (2020). Targeting Hepatic Glutaminase 1 Ameliorates Non-alcoholic Steatohepatitis by Restoring Very-Low-Density Lipoprotein Triglyceride Assembly. *Cell Metabolism*, 31(3), 605-622.e10.
- Simonelli, F., Maguire, A. M., Testa, F., Pierce, E. A., Mingozi, F., Bennicelli, J. L., Rossi, S., Marshall, K., Banfi, S., Surace, E. M., Sun, J., Redmond, T. M., Zhu, X., Shindler, K. S., Ying, G.-S., Ziviello, C., Acerra, C., Wright, J. F., McDonnell, J. W., ... Auricchio, A. (2010). Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(3), 643-650.
- Slenders, L., Tessels, D. E., van der Laan, S. W., Pasterkamp, G., & Mokry, M. (2022). The Applications of Single-Cell RNA Sequencing in Atherosclerotic Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 9, 826103.
- Sloboda, N., Fève, B., Thornton, S. N., Nzietchueng, R., Regnault, V., Simon, G., Labat, C., Louis, H., Max, J.-P., Muscat, A., Osborne-Pellegrin, M., Lacolley, P., & Benetos, A. (2012). Fatty acids impair endothelium-dependent vasorelaxation : A link between obesity and arterial stiffness in very old Zucker rats. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 67(9), 927-938.
- Smith, L. C., Pownall, H. J., & Gotto, A. M. (1978). The plasma lipoproteins : Structure and metabolism. *Annual Review of Biochemistry*, 47, 751-757.
- Spodenkiewicz, M., Diez-Fernandez, C., Rüfenacht, V., Gemperle-Britschgi, C., & Häberle, J. (2016). Minireview on Glutamine Synthetase Deficiency, an Ultra-Rare Inborn Error of Amino Acid Biosynthesis. *Biology*, 5(4), E40.
- Strydom, H. C., Blankenhorn, D. H., Chandler, A. B., Glagov, S., Insull, W., Richardson, M., Rosenfeld, M. E., Schaffer, S. A., Schwartz, C. J., & Wagner, W. D. (1992). A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 85(1), 391-405.
- Strydom, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D., & Wissler, R. W. (1995). A Definition of Advanced Types of Atherosclerotic Lesions and a Histological Classification of Atherosclerosis. *Circulation*, 92(5), 1355-1374.
- 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., & 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. *Circulation*, 89(5), 2462-2478.

- Stumvoll, M., Perriello, G., Meyer, C., & Gerich, J. (1999). Role of glutamine in human carbohydrate metabolism in kidney and other tissues. *Kidney International*, 55(3), 778-792.
- Suhre, K., Shin, S.-Y., Petersen, A.-K., Mohny, R. P., Meredith, D., Wägele, B., Altmaier, E., CARDIoGRAM, Deloukas, P., Erdmann, J., Grundberg, E., Hammond, C. J., de Angelis, M. H., Kastenmüller, G., Köttgen, A., Kronenberg, F., Mangino, M., Meisinger, C., Meitinger, T., ... Gieger, C. (2011). Human metabolic individuality in biomedical and pharmaceutical research. *Nature*, 477(7362), 54-60
- Sun, J., Sukhova, G. K., Wolters, P. J., Yang, M., Kitamoto, S., Libby, P., MacFarlane, L. A., Clair, J. M.-S., & Shi, G.-P. (2007). Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nature Medicine*, 13(6), 719-724.
- Sutherland, J. P., McKinley, B., & Eckel, R. H. (2004). The metabolic syndrome and inflammation. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 2(2), 82-104.
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., ... Kodama, T. (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*, 386(6622), 292-296.
- Suzuki, S., Tanaka, T., Poyurovsky, M. V., Nagano, H., Mayama, T., Ohkubo, S., Lokshin, M., Hosokawa, H., Nakayama, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Sato, E., Nagao, T., Yokote, K., Tatsuno, I., & Prives, C. (2010). Phosphate-activated glutaminase (GLS2), a p53-inducible regulator of glutamine metabolism and reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(16), 7461-7466.
- Swirski, F. K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., Weissleder, R., & Pittet, M. J. (2007). Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *Journal of Clinical Investigation*, 117(1), 195-205.
- Swirski, F. K., Pittet, M. J., Kircher, M. F., Aikawa, E., Jaffer, F. A., Libby, P., & Weissleder, R. (2006). Monocyte accumulation in mouse atherogenesis is progressive and proportional to extent of disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(27), 10340-10345.
- Szabó, Z., Levi-Minzi, S. A., Christiano, A. M., Struminger, C., Stoneking, M., Batzer, M. A., & Boyd, C. D. (1999). Sequential Loss of Two Neighboring Exons of the Tropoelastin Gene During Primate Evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 49(5), 664-671.
- Szeliga, M., Bogacińska-Karaś, M., Różycka, A., Hilgier, W., Marquez, J., & Albrecht, J. (2014). Silencing of GLS and overexpression of GLS2 genes cooperate in decreasing the proliferation and viability of glioblastoma cells. *Tumor Biology*, 35(3), 1855-1862.
- Szeliga, M., Sidoryk, M., Matyja, E., Kowalczyk, P., & Albrecht, J. (2005). Lack of expression of the liver-type glutaminase (LGA) mRNA in human malignant gliomas. *Neuroscience Letters*, 374(3), 171-173.

- Tabas, I., García-Cardena, G., & Owens, G. K. (2015). Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *Journal of Cell Biology*, 209(1), 13-22.
- Tall, A. R., & Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nature reviews. Immunology*, 15(2), 104-116.
- Tani, S., Nagao, K., Anazawa, T., Kawamata, H., Furuya, S., Takahashi, H., Iida, K., Matsumoto, M., Washio, T., Kumabe, N., & Hirayama, A. (2010). Coronary Plaque Regression and Lifestyle Modification in Patients Treated With Pravastatin - Assessment Mainly by Daily Aerobic Exercise and an Increase in the Serum Level of High-Density Lipoprotein Cholesterol - : – Assessment Mainly by Daily Aerobic Exercise and an Increase in the Serum Level of High-Density Lipoprotein Cholesterol -. *Circulation Journal*, 74(5), 954-961.
- Tavakoli, S., Downs, K., Short, J. D., Nguyen, H. N., Lai, Y., Jerabek, P. A., Goins, B., Toczek, J., Sadeghi, M. M., & Asmis, R. (2017). Characterization of Macrophage Polarization States Using Combined Measurement of 2-Deoxyglucose and Glutamine Accumulation : Implications for Imaging of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 37(10), 1840-1848.
- Tegos, T. J., Kalodiki, E., Sabetai, M. M., & Nicolaidis, A. N. (2001). The Genesis of Atherosclerosis and Risk Factors : A Review. *Angiology*, 52(2), 89-98.
- Thangavelu, K., Chong, Q. Y., Low, B. C., & Sivaraman, J. (2014). Structural basis for the active site inhibition mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA). *Scientific Reports*, 4, 3827.
- The Emerging Risk Factors Collaboration\*. (2009). Major Lipids, Apolipoproteins, and Risk of Vascular Disease. *JAMA*, 302(18), 1993.
- Tinajero, M. G., & Gotlieb, A. I. (2020). Recent Developments in Vascular Adventitial Pathobiology. *The American Journal of Pathology*, 190(3), 520-534.
- Torrino, S., Grasset, E. M., Audebert, S., Belhadj, I., Lacoux, C., Haynes, M., Pisano, S., Abélanet, S., Brau, F., Chan, S. Y., Mari, B., Oldham, W. M., Ewald, A. J., & Bertero, T. (2021). Mechano-induced cell metabolism promotes microtubule glutamylation to force metastasis. *Cell Metabolism*, 33(7), 1342-1357.e10.
- Triggle, C. R., Samuel, S. M., Ravishankar, S., Marei, I., Arunachalam, G., & Ding, H. (2012). The endothelium : Influencing vascular smooth muscle in many ways. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 90(6), 713-738.
- Turner, A., & McGivan, J. D. (2003). Glutaminase isoform expression in cell lines derived from human colorectal adenomas and carcinomas. *The Biochemical Journal*, 370(Pt 2), 403-408.
- Unno, H., Uchida, T., Sugawara, H., Kurisu, G., Sugiyama, T., Yamaya, T., Sakakibara, H., Hase, T., & Kusunoki, M. (2006). Atomic structure of plant glutamine synthetase : A key enzyme for plant productivity. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(39), 29287-29296.

- Vaarhorst, A. A. M., Verhoeven, A., Weller, C. M., Böhringer, S., Göröler, S., Meissner, A., Deelder, A. M., Henneman, P., Gorgels, A. P. M., van den Brandt, P. A., Schouten, L. J., van Greevenbroek, M. M., Merry, A. H. H., Verschuren, W. M. M., van den Maagdenberg, A. M. J. M., van Dijk, K. W., Isaacs, A., Boomsma, D., Oostra, B. A., ... Slagboom, P. E. (2014). A metabolomic profile is associated with the risk of incident coronary heart disease. *American Heart Journal*, *168*(1), 45-52.e7.
- van den Berg, B. M., Nieuwdorp, M., Stroes, E. S. G., & Vink, H. (2006). Glycocalyx and endothelial (dys) function : From mice to men. *Pharmacological Reports: PR*, *58 Suppl*, 75-80.
- Van der Donckt, C., Van Herck, J. L., Schrijvers, D. M., Vanhoutte, G., Verhoye, M., Blockx, I., Van Der Linden, A., Bauters, D., Lijnen, H. R., Sluimer, J. C., Roth, L., Van Hove, C. E., Franssen, P., Knaapen, M. W., Hervent, A.-S., De Keulenaer, G. W., Bult, H., Martinet, W., Herman, A. G., & De Meyer, G. R. Y. (2015). Elastin fragmentation in atherosclerotic mice leads to intraplaque neovascularization, plaque rupture, myocardial infarction, stroke, and sudden death. *European Heart Journal*, *36*(17), 1049-1058.
- van der Hel, W. S., Notenboom, R. G. E., Bos, I. W. M., van Rijen, P. C., van Veelen, C. W. M., & de Graan, P. N. E. (2005). Reduced glutamine synthetase in hippocampal areas with neuron loss in temporal lobe epilepsy. *Neurology*, *64*(2), 326-333.
- van der Velde, A. E., Vrans, C. L. J., van den Oever, K., Seemann, I., Oude Elferink, R. P. J., van Eck, M., Kuipers, F., & Groen, A. K. (2008). Regulation of direct transintestinal cholesterol excretion in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, *295*(1), G203-G208.
- Van Herck, J. L., De Meyer, G. R. Y., Martinet, W., Van Hove, C. E., Foubert, K., Theunis, M. H., Apers, S., Bult, H., Vrints, C. J., & Herman, A. G. (2009). Impaired Fibrillin-1 Function Promotes Features of Plaque Instability in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Circulation*, *120*(24), 2478-2487.
- Vanderlaan, P. A., & Reardon, C. A. (2005). Thematic review series : The immune system and atherogenesis. The unusual suspects:an overview of the minor leukocyte populations in atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, *46*(5), 829-838.
- VanderLaan, P. A., Reardon, C. A., & Getz, G. S. (2004). Site Specificity of Atherosclerosis : Site-Selective Responses to Atherosclerotic Modulators. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*(1), 12-22.
- Viles-Gonzalez, J. F., Anand, S. X., Zafar, M. U., Fuster, V., & Badimon, J. J. (2004). Tissue Factor Coagulation Pathway : A New Therapeutic Target in Atherothrombosis: *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *43*(5), 669-676.
- Vlijmen, B. J. van, Maagdenberg, A. M. van den, Gijbels, M. J., Boom, H. van der, HogenEsch, H., Frants, R. R., Hofker, M. H., & Havekes, L. M. (1994). Diet-induced hyperlipoproteinemia and atherosclerosis in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *93*(4), 1403-1410.
- Wang, D., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature reviews. Drug discovery*, *18*(5), 358-378.

- Wang, H. H., Lee, D. K., Liu, M., Portincasa, P., & Wang, D. Q.-H. (2020). Novel Insights into the Pathogenesis and Management of the Metabolic Syndrome. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*, 23(3), 189.
- Wang, S., & Smith, J. D. (2014). ABCA1 and nascent HDL biogenesis. *BioFactors (Oxford, England)*, 40(6), 547-554.
- Wang, Z.-M., Gao, X.-F., Zhang, J.-J., & Chen, S.-L. (2021). Primary Cilia and Atherosclerosis. *Frontiers in Physiology*, 12, 640774.
- Warrington, K. H., Gorbatyuk, O. S., Harrison, J. K., Opie, S. R., Zolotukhin, S., & Muzyczka, N. (2004). Adeno-Associated Virus Type 2 VP2 Capsid Protein Is Nonessential and Can Tolerate Large Peptide Insertions at Its N Terminus. *Journal of Virology*, 78(12), 6595-6609.
- Watford, M. (1993). Hepatic glutaminase expression : Relationship to kidney-type glutaminase and to the urea cycle. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 7(15), 1468-1474.
- Watts, S. W., Priestley, J. R. C., & Thompson, J. M. (2009). Serotonylation of Vascular Proteins Important to Contraction. *PLOS ONE*, 4(5), e5682.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1796-1808.
- Westerterp, M., van der Hoogt, C. C., de Haan, W., Offerman, E. H., Dallinga-Thie, G. M., Jukema, J. W., Havekes, L. M., & Rensen, P. C. N. (2006). Cholesteryl Ester Transfer Protein Decreases High-Density Lipoprotein and Severely Aggravates Atherosclerosis in *APOE\*3-Leiden* Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(11), 2552-2559.
- Wezel, A., Lagraauw, H. M., van der Velden, D., de Jager, S. C. A., Quax, P. H. A., Kuiper, J., & Bot, I. (2015). Mast cells mediate neutrophil recruitment during atherosclerotic plaque progression. *Atherosclerosis*, 241(2), 289-296.
- White, M. G., Shaw, J. A. M., & Taylor, R. (2016). Type 2 Diabetes : The Pathologic Basis of Reversible  $\beta$ -Cell Dysfunction. *Diabetes Care*, 39(11), 2080-2088.
- Williams, J. W., Martel, C., Potteaux, S., Esaulova, E., Ingersoll, M. A., Elvington, A., Saunders, B. T., Huang, L.-H., Habenicht, A. J., Zinselmeyer, B. H., & Randolph, G. J. (2018). Limited Macrophage Positional Dynamics in Progressing or Regressing Murine Atherosclerotic Plaques-Brief Report. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(8), 1702-1710.
- Witting, P. K., Pettersson, K., Östlund-Lindqvist, A.-M., Westerlund, C., Eriksson, A. W., & Stocker, R. (1999). Inhibition by a coantioxidant of aortic lipoprotein lipid peroxidation and atherosclerosis in apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor gene double knockout mice. *The FASEB Journal*, 13(6), 667-675.
- Wloga, D., Joachimiak, E., Louka, P., & Gaertig, J. (2017). Posttranslational Modifications of Tubulin and Cilia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(6), a028159.

- Wu, Z., Asokan, A., & Samulski, R. J. (2006). Adeno-associated virus serotypes : Vector toolkit for human gene therapy. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 14(3), 316-327.
- Würtz, P., Raiko, J. R., Magnussen, C. G., Soininen, P., Kangas, A. J., Tynkkynen, T., Thomson, R., Laatikainen, R., Savolainen, M. J., Laurikka, J., Kuukasjärvi, P., Tarkka, M., Karhunen, P. J., Jula, A., Viikari, J. S., Kähönen, M., Lehtimäki, T., Juonala, M., Ala-Korpela, M., & Raitakari, O. T. (2012). High-throughput quantification of circulating metabolites improves prediction of subclinical atherosclerosis. *European Heart Journal*, 33(18), 2307-2316.
- Xiang, L., Xie, G., Liu, C., Zhou, J., Chen, J., Yu, S., Li, J., Pang, X., Shi, H., & Liang, H. (2013). Knock-down of glutaminase 2 expression decreases glutathione, NADH, and sensitizes cervical cancer to ionizing radiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(12), 2996-3005.
- Xu, S., Ilyas, I., Little, P. J., Li, H., Kamato, D., Zheng, X., Luo, S., Li, Z., Liu, P., Han, J., Harding, I. C., Ebong, E. E., Cameron, S. J., Stewart, A. G., & Weng, J. (2021). Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond : From Mechanism to Pharmacotherapies. *Pharmacological Reviews*, 73(3), 924-967.
- Yoo, H. C., Yu, Y. C., Sung, Y., & Han, J. M. (2020). Glutamine reliance in cell metabolism. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(9), Art. 9.
- Young, S., Veniant, M., Beigneux, A., Bensadoun, A., & Fong, L. (2008). Lipoprotein Size and Susceptibility to Atherosclerosis—Insights from Genetically Modified Mouse Models. *Current Drug Targets*, 9(3), 174-189.
- Yu, S. Y. (1971). Cross-linking of elastin in human atherosclerotic aortas. I. A preliminary study. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 25(2), 121-125.
- Yvan-Charvet, L., & Cariou, B. (2018). Poststatin era in atherosclerosis management : Lessons from epidemiologic and genetic studies. *Current Opinion in Lipidology*, 29(3), 246-258.
- Zennaro, M.-C., Caprio, M., & Fève, B. (2009). Mineralocorticoid receptors in the metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 20(9), 444-451.
- Zhang, S. H., Reddick, R. L., Piedrahita, J. A., & Maeda, N. (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5081), 468-471.
- Zhang, T., Chen, J., Tang, X., Luo, Q., Xu, D., & Yu, B. (2019). Interaction between adipocytes and high-density lipoprotein:new insights into the mechanism of obesity-induced dyslipidemia and atherosclerosis. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 223.
- Zhang, Y., McGillicuddy, F. C., Hinkle, C. C., O'Neill, S., Glick, J. M., Rothblat, G. H., & Reilly, M. P. (2010). Adipocyte modulation of high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation*, 121(11), 1347-1355.

- Zhao, T. X., & Mallat, Z. (2019). Targeting the Immune System in Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(13), 1691-1706.
- Zheng, Y., Hu, F. B., Ruiz-Canela, M., Clish, C. B., Dennis, C., Salas-Salvado, J., Hruby, A., Liang, L., Toledo, E., Corella, D., Ros, E., Fitó, M., Gómez-Gracia, E., Arós, F., Fiol, M., Lapetra, J., Serra-Majem, L., Estruch, R., & Martínez-González, M. A. (2016). Metabolites of Glutamate Metabolism Are Associated With Incident Cardiovascular Events in the PREDIMED PREvención con DIeta MEDiterránea (PREDIMED) Trial. *Journal of the American Heart Association*, 5(9), e003755.
- Zhuang, T., Liu, J., Chen, X., Pi, J., Kuang, Y., Wang, Y., Tomlinson, B., Chan, P., Zhang, Q., Li, Y., Yu, Z., Zheng, X., Reilly, M., Morrissey, E., Zhang, L., Liu, Z., & Zhang, Y. (2019). Cell-Specific Effects of GATA (GATA Zinc Finger Transcription Factor Family)-6 in Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cells on Vascular Injury Neointimal Formation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(5), 888-901.