



THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de :
Docteur de l'Université de Strasbourg

Sciences du vivant
Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Soutenue publiquement par

Estelle WOLDT

Le 29 Octobre 2009

Implication de LRP1 dans l'athérosclérose et la calcification vasculaire

Jury :

Pr. Bart Staels

Dr. Robert Dante

Dr. Christian Gachet

Pr. Philippe Boucher

Dr. Rachel Matz-Westphal

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Rapporteur interne

Directeur de Thèse

Membre invité

Remerciements

*Monsieur le Professeur Bart Staels, Monsieur le Docteur Robert Dante
et Monsieur le Docteur Christian Gachet*

Je souhaite vous remercier pour avoir accepté de juger ce travail de thèse en tant que rapporteur. J'en suis extrêmement honorée.

Monsieur le Professeur Philippe Boucher

Merci Philippe pour avoir accepté de diriger mon travail de thèse. Je tenais également à vous remercier pour votre aide et votre soutien lors des recherches de financement. Et encore merci pour toutes les connaissances que vous m'avez apportées.

Madame le Docteur Rachel Matz-Westphal

Je souhaite profiter de cette thèse pour te remercier de m'avoir accueilli et encadré durant mon DEA. Je souhaite également te remercier de m'avoir initié à la paillasse et donné goût au monde de la recherche. Merci également pour tes précieux conseils et pour tes encouragements constants depuis le début. Merci pour ces longues heures que tu as passé à corriger mes dossiers de demande de financement. Et encore mille Mercis d'avoir accepté de corriger ma thèse.

Monsieur le Docteur Jérôme Terrand

'Ô, Grand Chef !' Comment pourrai-je faire des remerciements à la hauteur ?
MERCI, merci pour tout ! Merci pour tes grandes compétences scientifiques et tes précieux conseils. Merci pour ta grande disponibilité, ta générosité, ton soutien quotidien et ton écoute. Merci pour ces conversations intéressantes qui m'ont beaucoup aidé pour la rédaction de ma thèse. Merci pour tous ces coups de main à la paillasse surtout à la fin quand il était temps pour moi de la quitter et de me plonger dans mon PC pour rédiger ma thèse. Et encore Merci beaucoup d'avoir participé à la correction de ma thèse.
Ce fut très enrichissant et un réel plaisir d'avoir travaillé avec toi pendant ces 4 années de thèse.

La « Boucher's Team »

Merci *Véronique* pour ta disponibilité, ton aide et ton soutien durant ces années passées au labo. Merci *Sophie, Zeina et Mohamed* d'avoir contribué à la bonne ambiance au labo et de m'avoir soutenu durant cette thèse. Merci à ceux qui sont passés par là mais qui nous ont abandonné, je pense surtout à *Céline* et à *Elodie* avec qui j'ai passé de très bons moments et qui ont largement contribué à mon travail. Je vous remercie chaleureusement.

Mes colocataires de bureau

Sans vous je pense que les journées au labo auraient été bien plus pénibles. *Ma Tikā*, ta joie de vivre, tes fous rires au quotidien, ton soutien, tes conseils, ton écoute, m'ont apporté énormément et je ne sais comment t'en remercier ! Ta présence me manquera terriblement. *David*, Merci pour ces moments d'humour passer avec tes proverbes majestueux et tes blagues à coucher dehors. Merci pour ton soutien, ton aide et les supers bons chocolats que tu nous amenais tous les jours. Et Merci à tous ceux qui sont passés par là.

L'unité CNRS 7034 puis 7175 et enfin 7213

Merci à tous ceux qui m'ont supporté durant cette thèse. Merci à *Ingrid* et *Marlyse* pour leur soutien administratif. Merci à *Allison*, *Stéphanie*, et *Cie* pour votre soutien et les bons moments passés ensemble. Merci à *Sophie*, *Monique*, *Mme Lugnier*, *Evelyne*, *Thérèse*, *Christian*, ... pour vos précieux conseils scientifiques. Un grand merci à toutes les personnes que je n'ai pas cité.

La NSFÀ, la FRM

Puisque ce travail n'aurait pu voir le jour sans le soutien financier de la *NSFÀ* (Nouvelle Société Française d'Athérosclérose) et de la *FRM* (Fédération de Recherche Médicale), je tiens à leur adresser mes plus profonds remerciements pour la confiance qu'ils m'ont accordée tout au long de cette thèse.

A ma Famille

Toute ma reconnaissance va à l'ensemble de *ma famille*, *Mémé Marguerite*, *Frédéric*, *Estelle*, *José*, *Anita*, *Guy*, *Muriel*, *Marylou*, *mes puces Cindy*, *Noémie* et *Chloé*, *toute ma bande de cousins, cousines, oncles et tantes...*, je tiens à vous remercier pour votre soutien indispensable tout au long de ces longues années estudiantines.

Je remercie tout particulièrement *Mes Parents* pour leur amour, leur confiance et leurs encouragements constants. Mille Mercis à vous deux d'avoir toujours cru en moi.

Aurélien, Merci d'avoir été à mes côtés pendant ces longs mois de durs labeurs. Merci pour ta grande patience, ton optimisme, toutes tes attentions et tes encouragements... Merci d'être là !!!

Résumé

L'athérosclérose est une pathologie évolutive qui implique de multiples processus tels que la prolifération cellulaire, la différenciation adipocytaire et chondrocytaire, pouvant conduire à la calcification de l'intima.

Le low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) est un récepteur transmembranaire multifonctionnel appartenant à la famille des récepteurs aux LDL [Herz et al.,1988] et protège de l'athérosclérose [Boucher et al.,2003]. Il est capable de lier de nombreux ligands et de contrôler de nombreux processus physiologiques tels que la prolifération cellulaire et le métabolisme lipidique.

Notre hypothèse était de comprendre par quels mécanismes d'action LRP1 contrôle la formation des lésions athéroscléreuses. Nous avons étudié son implication dans les phénomènes de différenciation et de prolifération cellulaire.

Nos résultats montrent, *in vivo* que l'absence de LRP1 dans les CML des souris sous régime riche en cholestérol provoque la formation de cellules spumeuses avec ou sans la présence de PPAR γ . En revanche la présence de LRP1 et l'absence de PPAR γ entraînent la formation de cellules de type chondrocyte au sein de la plaque d'athérome. Le phénomène de chondrogenèse est sous la dépendance de SPARC, une protéine de la matrice extracellulaire et de Wnt5a. SPARC en se liant au LRP1 va migrer dans le noyau et activer le programme de différenciation chondrocytaire en activant l'expression de Sox9 et Cart1. Wnt5a est exprimée en présence de LRP1 et permet d'induire l'expression de Sox9 et de Cart1. PPAR γ bloque la formation de chondrocytes *in vivo* en induisant l'expression de SFRP2, un inhibiteur de la voie de signalisation de Wnt5a.

LRP1, SPARC et Wnt5a sont donc nécessaires à l'activation du programme de différenciation chondrocytaire.

De plus, nous avons montré que le LRP1 est capable de contrôler la voie de l'IGF-1 qui est impliquée dans la croissance et la stabilité de la plaque d'athérome. LRP1 oriente la cascade de signalisation de l'IGF-I vers la voie de signalisation ShcA/Grb2/Ras/Erk1/2 et la détourne de la voie de signalisation Akt/mTOR qui serait impliquée dans l'hypertrophie et/ou la différenciation cellulaire. De plus nous avons montré que l'absence de ShcA comme l'absence de LRP1 induit, en réponse à l'IGF-1, l'activation de Akt.

Ce travail contribue à une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans l'évolution de la plaque d'athérome et décrit LRP1 comme un puissant régulateur de la différenciation et de la prolifération cellulaire.

Liste des Abréviations

A

ADRP:	<i>Adipocyte Differentiation Related Protein</i>
AG :	Acide Gras
Apo :	Apoprotéines
ARN:	Acide RiboNucléique
ASK1:	<i>Apoptosis Signal regulating Kinase 1</i>
AVC :	Accidents Vasculaires Cérébraux

B

BHE:	Barrière Hémato-Encéphalique
BSA:	Bovine Serum Albumine

C

C :	Cholestérol
Cbl :	<i>Casitas b-lineage Lymphoma</i>
CE :	Cellule Endothéliale
CM :	Chylomicron
CML:	Cellule Musculaire Lisse
CART1 :	<i>Cartilage homeoprotein-1</i>

E

EDHF:	<i>Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor</i>
ERK ½:	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2</i>

F

FBS:	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FGFb:	<i>Fibroblast Growth Factor basic</i>
Frz:	Frizzled

H

HDL:	<i>High-Density Lipoprotein</i>
HL:	Lipase Hépatique

I

ICAM-1:	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
ICD-LRP1 :	Domaine intracellulaire de LRP1
IDL :	<i>Intermediate-Density Lipoprotein</i>
IDM:	Infarctus Du Myocarde
IGF-1:	<i>Insulin like Growth Factor- 1</i>
IGFBP:	<i>IGF binding protein</i>
IL:	<i>Interleukin</i>

IRF-3: *Interferon Regulatory Factor-3*

IRS : *Insulin Receptor Substrate*

K

KO: *Knock Out*

L

LDL: *Low Density Lipoprotein*

LDLr: *Récepteur des LDL*

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

Lp (a): *Lipoprotéine (a)*

LPL: *Lipoprotéine Lipase*

LPS: *Lipopolysaccharide*

LRP1: *Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1*

M

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MCP-1: *Monocyte Chemotactic Protein-1*

M-CST: *Monocyte-Colony Stimulating Factor*

MEF: *Mouse Embryonic Fibroblast*

MOI: *Multiplicity Of Infection*

N

NO: *Monoxide d'azote*

O

Ox-LDL: *LDL oxydé*

P

P: *Phospholipides*

PAI-1: *Plasminogen Activator Inhibitor -1*

PDGF: *Platelet-derived growth factor*

PDGFr: *Récepteur au PDGF*

PGI2: *Prostacycline*

Pi3K: *Phosphatidyl-inositone 3 Kinase*

PPAR γ : *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*

PPRE: *PPAR Response Element*

PTB: *Phosphotyrosine-binding*

R

RAP: *Recepteur-Associated Protein*

RUNX2: *Runt-related transcription factor 2*

RXR: *9-cis Retinoic acid Receptor*

S

SFRP2:	<i>Secreted Frizzled-Related Protein 2</i>
SH2:	<i>Src Homology 2</i>
ShcA:	<i>Src Homology and collagen A</i>
SHP-2:	<i>Src-homology 2-containing phosphotyrosine phosphatase-2</i>
SHPS-1:	<i>SHP-2 substrate-1</i>
Sox9:	<i>SRY-box containing gene 9</i>
SPARC:	<i>Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine</i>
SR-A:	<i>Scavenger Receptor A</i>

T

TG :	Triglycéride
TGFB :	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF-BR-V :	récepteur-BV du TGF
t-PA :	<i>tissue-type Plasminogen Activator</i>
TXA2:	Thromboxane A2

V

VCAM-1:	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLDL :	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

Table des matières

Remerciements	1
Résumé	3
Liste des abréviations	4
Table des matières	7

Introduction Générale:

De l'Athérosclérose au LRP-1

1. Physiopathologie de l'athérosclérose	16
1.1. L'Athérosclérose	16
1.1.1. Généralité et origine	16
1.1.2. Définition	16
1.1.3. Manifestations cliniques	17
1.2. Genèse des plaques d'athérome	17
1.2.1. Physiologie de la paroi vasculaire saine.....	18
1.2.1.1. L'intima	18
1.2.1.2. La média	18
1.2.1.3. L'adventice	19
1.2.2. Cellules impliquées dans la formation de la plaque d'athérome	19
1.2.2.1. Les cellules de la paroi vasculaire.....	19
1.2.2.1.1. Cellules endothéliales de l'intima	19
1.2.2.1.2. Cellules musculaires lisses	21
1.2.2.2. Les éléments circulants sanguins	21
1.2.2.2.1. Les monocytes et les macrophages	21
1.2.2.2.2. Les lymphocytes	22
1.2.2.3. Les lipoprotéines	23

1.2.2.3.1. Structure des lipoprotéines	23
1.2.2.3.2. Métabolisme des lipoprotéines	25
1.2.2.3.3. Rôle des lipoprotéines dans l'athérosclérose	27
1.2.3. Evolution de la plaque d'athérome	28
1.2.3.1. La dysfonction endothéliale : Déclencheur de l'athérosclérose	28
1.2.3.2. Formation de la plaque mature : un centre athéromateux et une chape fibreuse	29
1.2.3.3. La plaque d'athérosclérose compliquée	30
1.2.4. Processus impliqués dans le développement de la plaque d'athérome	32
1.2.4.1. La différenciation cellulaire	32
1.2.4.1.1. La différenciation des monocytes en macrophages et en cellules spumeuses	
1.2.4.1.2. La différenciation des CML contractiles de la média en CML synthétiques de l'intima	33
1.2.4.1.3. La différenciation des CML en cellules spumeuses	34
1.2.4.1.4. La différenciation des CML en cellules ostéo-chondrocytaires	34
1.2.4.1.5. La différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules vasculaires	35
1.2.4.2. La prolifération cellulaire	36
1.2.4.2.1. La prolifération des CML	36
2. Implication de LRP1 dans l'athérosclérose	37
2.1. Le LRP1 : Généralités et Origine	37
2.1.1. Structure	37
2.1.2. Fonctions	39
2.1.2.1. Protéolyse par endocytose	39
2.1.2.2. Modulateur des voies de signalisation intracellulaires	40
2.2. Implication de LRP1 dans l'athérosclérose	42
2.2.1. Rôle de LRP1 dans les CML vasculaire	42
2.2.1.1. LRP1 contrôle la prolifération des CML	42
2.2.1.1.1. La voie du PDGF dans l'évolution de la plaque d'athérome	42

2.2.1.1.2. Contrôle de la voie du PDGF par le LRP des CML	43
2.2.1.2. LRP1 contrôle la différenciation des CML en cellules spumeuses	44
2.2.2. Rôle de LRP1 hépatique	45
2.2.3. Rôle de LRP1 dans les macrophages	46
2.2.4. Rôle de LRP1 dans l'oxydation des LDLc	46

Mécanismes moléculaires utilisés par LRP1 pour contrôler la prolifération des CML et la calcification vasculaire dans l'Athérosclérose

Partie 1 : Régulation de la calcification vasculaire et de la différenciation chondrocytaire: Implication de LRP1 et de PPAR γ

1. Introduction	50
1.1. La différenciation adipocytaire	50
1.1.1. Généralités	50
1.1.2. Régulateurs de l'adipogenèse	51
1.1.2.1. Peroxisome proliferator-activated receptor : PPAR	51
1.1.2.2. CAAT enhancer-binding protein : C/EBP	54
1.1.2.3. Wnt/ β -catenin	55
1.1.2.4. Secreted protein, acidic and rich in cyteine : SPARC / Ostéonectine	58
1.1.2.5. Autres facteurs régulant l'adipogenèse	59
1.2. La différenciation chondrocytaire	60
1.2.1. Généralités	60
1.2.2. Régulateurs de la chondrogenèse	62
1.2.2.1. Les facteurs de transcription	62
1.2.2.2. Les facteurs de croissance	64
1.2.2.3. Les facteurs sécrétés	66
1.2.2.4. Les Wnt	66

1.2.2.5. SPARC/ Ostéonectin	69
1.3. Les Protéines régulatrices de la détermination cellulaire et de la différenciation cellulaire	70
1.4. La différenciation cellulaire dans l'athérosclérose : La calcification vasculaire	71
1.5. LRP1 : un régulateur de la différenciation cellulaire	73
1.5.1. LRP1 : Modulateur de l'adipogenèse	73
1.5.2. LRP1 : Modulateur de la chondrogenèse	74
1.5.3. LRP1 : Modulateur de la voie de Wnt5a	74
2. Objectif de l'étude	75
3. Matériels et Méthodes	77
3.1. Différenciation cellulaire	77
3.1.1. la différenciation adipocytaire	77
3.1.2. La différenciation chondrocytaire	77
3.2. Modèle animal	78
3.2.1. Génération des souris LRP1 -/- dans les CML et LDLr -/-	78
3.2.2. Génération des souris PPAR γ -/- dans les CML et LDLr -/-	78
3.2.3. Génération des souris PPAR γ -/-, LRP1-/- dans les CML et LDLr -/-	78
3.2.4. Vérification de l'excision de PPAR γ et de LRP1 dans les aortes des souris	79
3.2.5. Régime pro-athérogène de type « Paigen »	81
3.3. Mesure de la pression artérielle chez la souris KO	81
3.4. Caractérisation des lésions athéroscléreuses	82
3.4.1. Dissection des animaux	82
3.4.2. Coloration histologique	82
3.4.3. Immunomarquage de coupes transversales d'aortes	84
3.4.4. Analyse transcriptionnelle	85
3.4.5. Analyse protéique	87
3.4.6. Hybridation in situ	87
3.5. Synthèse de protéine recombinante rhSPARC	93

3.6. Test d'activation de l'expression de Sox9 et Cart1 à la luciférase	95
3.7. Interaction SPARC-LRP1	96
3.7.1. Immunocytochimie par immunofluorescence indirecte	96
3.7.2. Fractionnement cellulaire	97
3.7.3. Immunoprécipitation	98
3.8. Interaction Wnt5a- SFRP2	98
3.9. Chip : SFRP2 / PPAR γ	99
4. Résultats	101
4.1. LRP1 dans la différenciation cellulaire	101
4.1.1. LRP1 dans le contrôle de la différenciation adipocytaire	101
4.1.2. LRP1 dans le contrôle de la différenciation chondrocytaire	102
4.2. Caractérisation phénotypique des souris déficientes en PPAR γ en présence ou non de LRP1	105
4.2.1. Génération de souris déficientes en PPAR γ et/ou en LRP1 dans les CML chez la souris	105
4.2.2. Caractérisation phénotypique des souris déficientes en PPAR γ et/ou en LRP	107
4.2.3. Caractérisation phénotypique des souris déficientes en PPAR γ et/ou en LRP1 sous régime de type « Paigen »	108
4.3. Mécanismes d'action utilisés par LRP1 pour contrôler la différenciation chondrocytaire 4.3.1. Modification de la de SPARC sous l'influence de LRP1.....	115
4.3.2. Interaction de SPARC et de LRP1.....	120
4.3.3. Rôle de SPARC dans la cellule.....	120
4.3.4. Mécanisme de régulation utilisé <i>in vivo</i>	122
4.4. LRP1 et PPAR γ : des régulateur de la chondrogenèse.....	126
5. Conclusion.....	130
6. Discussion	132
7. Perspectives.....	142
7.1. LRP1 et PPAR γ dans la différenciation chondrocytaire <i>in vitro</i>	142

7.2. Interaction entre SPARC et LRP1	142
7.3. Rôle de SPARC dans le noyau	143
7.4. Caractérisation phénotypique des souris déficientes en PPAR γ et/ou en LRP1 dans les chondrocytes et dans les cellules mésenchymateuses	144

Partie 2 : Régulation de la prolifération cellulaire et protection contre l'athérosclérose : Un Switch moléculaire par LRP1 et ShcA

1. Introduction	147
1.1. La voie de l'IGF-1 dans le développement de l'athérosclérose.....	147
1.1.1. la voie de l'IGF-1	147
1.1.2. L'IGF-1 dans l'athérosclérose.....	148
1.2. Le LRP1 régulateur de la prolifération cellulaire et protection contre l'athérosclérose	
1.2.1. Implication de LRP1 dans l'athérosclérose	149
1.2.2. LRP1 : régulateur de la voie du PDGFBB	150
1.2.3. LRP1 : régulateur de la voie du TGF- β	151
1.2.4. LRP-1 : régulateur de la voie de l'IGFBP-3.....	153
1.3. Implication de ShcA dans la régulation par LRP1	155
1.3.1. <i>Src homology and collagen protein : ShcA</i>	155
1.3.2. ShcA/LRP et la voie de l'IGF-1	157
2. Objectif de l'étude.....	159
3. Matériels et Méthodes	161
3.1. Matériels	161
3.1.1. Types cellulaires.....	161
3.1.2. Anticorps.....	161
3.1.3. Facteurs de croissance	162
3.2. Génération de souris déficientes en ShcA tissus spécifiques	162
3.2.1. Génération de souris ShcA ^{flox/flox}	162

3.2.2. Génération de souris déficiente en ShcA tissus spécifique	162
3.2.3. Régime pro-athérogène de type « Paigen »	162
3.3. Mise en culture de MEF ShcA ^{flox/flox}	162
3.4. Excision de l'expression de ShcA dans les MEF	163
3.4.1. Inactivation de ShcA dans les MEF ShcA ^{flox/flox} par l'adénovirusCRE	163
3.4.2. Inactivation de ShcA dans les MEF par siRNA	163
3.5. Méthodes d'analyses	164
3.5.1. Immunoprécipitation	164
3.5.2. Fractionnement cellulaire par ultracentrifugation	164
3.5.3. Fractionnement cellulaire par gradient de Percoll	165
3.5.4. Activation de Ras : Pull-down assay	165
3.5.5. Analyse du cycle cellulaire	166
4. Résultats	168
4.1. Caractérisation <i>in vitro</i> du rôle de LRP1 dans la signalisation cellulaire induite par l'IGF-1	168
4.1.1. LRP1 co-immunoprécipite avec le récepteur à l'IGF-1	168
4.1.2. Activation du récepteur à l'IGF-1 sous l'influence de LRP1	169
4.1.3. Recrutement de ShcA à la membrane plasmique en réponse à l'IGF-1 est possible qu'en présence de LRP1	170
4.1.4. Phosphorylation de ShcA en présence de LRP1	171
4.1.5. LRP1 est requis pour l'activation de la voie de Ras et Erk ½ après stimulation par l'IGF-1	172
4.1.6. LRP1 est nécessaire pour la progression dans le cycle cellulaire	174
4.1.7. Contrôle de la voie de Akt-mTor par le complexe LRP1-ShcA	175
4.1.8. LRP1 « switch » la voie de l'IGF-1	178
4.2. Caractérisation <i>in vivo</i> de l'importance de ShcA dans le développement de l'athérosclérose	179
4.2.1. Génération des souris ShcA flox/flox	179
4.2.2. Caractérisation phénotypique des souris déficientes en ShcA au niveau des CML	
4.2.2.1. Inactivation de ShcA dans les CML	180

4.2.2.2. Caractérisation phénotypique	181
4.2.3. Caractérisation phénotypique des souris déficientes en ShcA au niveau des CE	
4.2.3.1. Inactivation de ShcA dans les CE	183
4.2.3.2. Caractérisation phénotypique.....	183
5. Conclusion	187
6. Discussion et perspectives	189
6.1. Fonction d'aiguilleur de LRP1 dans la voie de l'IGF-1 : Hypothèse mécanistique supplémentaire.....	189
6.2. Caractérisation phénotypique des cellules et des souris déficientes en ShcA	193
6.3. Protection contre l'athérosclérose par la voie de l'IGF-1	193
Conclusion générale.....	196
Bibliographie	201

Introduction Générale

De l'Athérosclérose au LRP1

Introduction Générale : *De l'Athérosclérose au LRP1*

1. Physiopathologie de l'Athérosclérose :

1.1. L'Athérosclérose

1.1.1. Généralités et origine

L'athérosclérose n'est pas une pathologie des temps modernes, en effet les plaques d'athérome authentiques sur le plan histologique ont été identifiées au sein des corps momifiés égyptiens par Sir Marc Armand RUFFER qui publia ses observations en 1911 [Ruffer, 1911].

Sur le plan anatomopathologique ce n'est qu'en 1740 que le médecin allemand Johann Friedrich KRELL observe des concrétions calciques au niveau de la paroi vasculaire qu'il appelle « plaque osseuse » [Cowdry et al., 1967]. Une dizaine d'années plus tard le terme « athérome » est proposé pour la première fois par Albrecht von HALLER. Il vient du grec *athara* qui signifie « bouillie de farine ou de gruau » qui caractérise un kyste blanchâtre graisseux [Schwartz et al., 1962].

Puis en 1833 c'est à Strasbourg que le Dr Jean Frédéric Martin LOBSTEIN a défini « d'artériosclérose » les altérations artérielles considérant qu'elles ne sont pas d'origine inflammatoire et conduisent à un durcissement et un épaissement de la paroi des artères [Lobstein, 1833]. Aujourd'hui l'artériosclérose est principalement causée par un vieillissement vasculaire.

C'est finalement le Dr Felix MARCHAND, en 1904, qui invente le terme « d'athérosclérose » qui reflète la dualité lésionnelle, athéromateuse et scléreuse, de la maladie [Marchand, 1904]. Aujourd'hui l'athérosclérose est l'une des causes majeures de mortalité et d'invalidité humaines dans les pays industrialisés, représentant de ce fait un enjeu important de santé publique. La prise en charge globale des patients atteints s'est améliorée. Cependant les récives telles que les re-sténoses restent imprévisibles et nombreuses, soulignant l'échec de la prévention médicale et l'insuffisance des connaissances des mécanismes sous-jacents.

1.1.2. Définition

L'athérosclérose se caractérise par une atteinte chronique de la paroi vasculaire des artères de moyen et de grand calibre, due à l'accumulation de lipides amorphes (triglycérides,

cholestérols) et de nombreux éléments sanguins dans l'espace sous endothélial induisant ainsi la formation d'une plaque d'athérome [Stary et al., 1994].

C'est un processus pathologique complexe distinct du vieillissement vasculaire, qui débute dès le plus jeune âge et tend à évoluer. L'évolution de la pathologie est lente et entraîne la diminution progressive de la lumière vasculaire, pouvant aboutir à son obstruction totale. Ainsi cette pathologie ne présente que peu de symptômes qui ne se révèlent que plusieurs années après l'apparition des premières lésions anatomiques.

La fréquence et l'étendue de ces lésions augmentent fortement avec les facteurs de risques tels que l'âge, les dyslipidémies familiales héréditaires, les phénomènes d'insulino-résistance, d'hyperhomocystéinémie [Ambrosi et al., 1996] et les anomalies des facteurs hémostatiques, mais également avec les facteurs de risques environnementaux (la sédentarité, l'obésité, le tabagisme) [Lusis, 2000][Strong et al., 1995]. De plus la localisation des plaques d'athérome est préférentiellement observée au niveau de l'aorte et de ses branches principales : artères coronaires, carotides, fémorales et artères cérébrales. Sur l'aorte, où les lésions sont les plus évidentes, l'athérome est habituellement présent au niveau de la crosse et s'accroît dans l'aorte descendante. Finalement d'une façon générale les lésions d'athérosclérose prédominent toujours au niveau des bifurcations et des embouchures des collatérales [Ku et al., 1983][Zarins et al., 1983].

1.1.3. Manifestations cliniques

Les conséquences de l'athérosclérose dépendent de l'endroit où se forme la plaque d'athérome. Elles sont responsables d'affections aiguës :

- ◇ De coronaropathies de type ischémique dues à l'athérosclérose des artères coronaires.
- ◇ D'accidents vasculaires cérébraux (AVC) dus à l'athérosclérose des artères à visée encéphalique.
- ◇ D'artérites dues, dans 90% des cas, à l'athérosclérose des membres inférieurs.
- ◇ D'ischémie aiguë des membres.

Outre ces conséquences, ces accidents, lorsqu'ils ne sont pas fatals, sont aussi à l'origine de séquelles fonctionnelles sévères : paralysie, troubles sensitifs, troubles du langage dans le cas des AVC, apparition d'une insuffisance cardiaque, troubles du rythme dans le cas d'un infarctus du myocarde (IDM).

1.2. Genèse des plaques d'athérome

La plaque d'athérome se caractérise par un remodelage vasculaire impliquant de multiples processus tels que la dysfonction endothéliale, l'inflammation, la prolifération cellulaire, l'altération de la matrice extracellulaire et la néo-angiogenèse [Dzau et al. 2002] [Lusis et al.,

2000]. Les acteurs responsables de ces modifications vasculaires et contribuant à la croissance de la plaque d'athérome sont les cellules de la paroi vasculaire et les éléments circulants.

1.2.1. Physiologie de la paroi vasculaire saine

Seules les artères de moyen et gros calibre (0.5 à 3 cm de diamètre externe) sont sensibles au développement des lésions athéroscléroseuses. Cependant il existe parmi ces artères des variations de structure, de propriété mécanique et de susceptibilité à développer de l'athérome. Elles répondent à un modèle commun d'organisation, composé de 3 tuniques superposées dénommées de la lumière vers la périphérie de l'artère: l'*intima*, la *média* et l'*adventice* (Figure I.G-1).

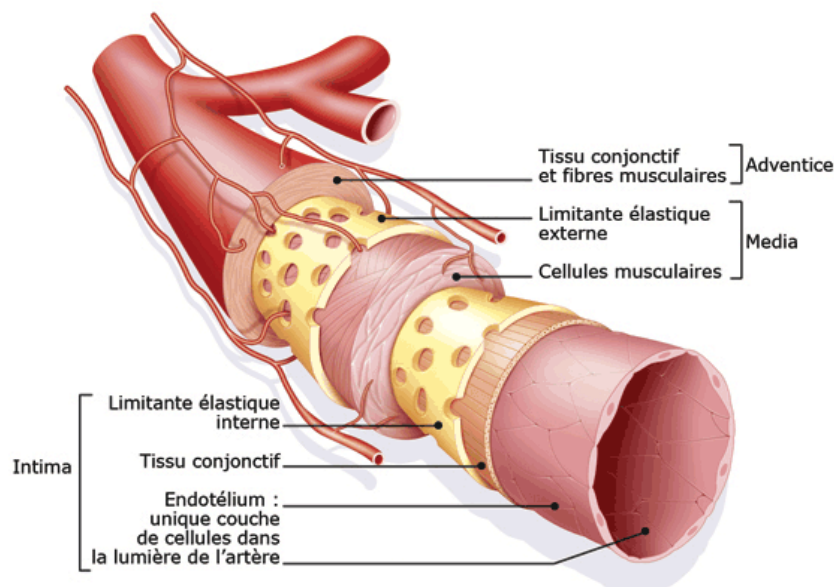


Figure I.G-1 : Artère de moyen calibre et ses trois tuniques: l'intima, la média et l'adventice (Source : Sophie Jacopin, Sanofi adventis)

.....

1.2.1.1. L'Intima

Elle constitue la première couche et le lieu de formation de la plaque d'athérome. Elle est constituée d'une couche unique et continue de cellules endothéliales directement en contact avec le sang circulant. La couche sous-endothéliale ou membrane basale sur laquelle reposent les cellules endothéliales, d'épaisseur variable et de nature conjonctive, est composée de fibres de collagène, de quelques fibres élastiques et des fibroblastes qui produisent des protéoglycanes, du glycogène et de l'élastine. Elle est caractérisée par une importante activité enzymatique et par la présence d'abondantes cellules immunitaires. Enfin la limitante élastique interne permet de séparer l'intima de la média.

1.2.1.2. la Média

Elle est composée principalement de cellules musculaires lisses (CML) entourées de fibres élastiques et de fibres de collagène, qu'elles synthétisent. La média est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe.

1.2.1.3. l'Adventice

Cette tunique ancre le vaisseau dans les tissus voisins. C'est un tissu lâche, composé de fibres de collagène, de fibres élastiques, de CML et de fibroblastes, dans lequel vont cheminer les *vasa vasorum* irrigant la partie externe de la média (présents uniquement sur les grosses artères). Elle est parfois parcourue par des fibres musculaires longitudinales.

1.2.2. Cellules impliquées dans la formation de la plaque d'athérome

Plusieurs acteurs interviennent dans la pathogénie des lésions athéromateuses. Les cellules de la paroi vasculaire et les éléments présents dans le sang constituent les acteurs responsables de l'initiation et de la progression de l'athérosclérose.

1.2.2.1. Les cellules de la paroi vasculaire

1.2.2.1.1. les cellules endothéliales de l'intima

Cette monocouche a longtemps été considérée comme un tissu passif, on sait aujourd'hui que l'endothélium joue un rôle actif majeur dans les vaisseaux avec plusieurs fonctions vitales qui lorsqu'elles sont perturbées conduisent à la formation de lésions d'athérosclérose [Simionescu 2006] [Sima et al., 2009].

◇ Fonctions endothéliales :

- **Régulation de la perméabilité vasculaire** [Mehta et al., 2006]

La cellule endothéliale est le premier site anatomique qui permet de restreindre les échanges entre le sang et la paroi vasculaire. Les cellules endothéliales des artères de gros et moyen calibre forment un endothélium continu reposant sur une membrane basale constituée de collagène associé à des protéoglycanes. Le transport de substances à travers l'endothélium s'effectue dans les deux sens par des mécanismes d'endocytose et de passage entre les espaces intercellulaires selon la taille et la charge électrique des molécules. En cas de lésions endothéliales, l'espace intercellulaire est accru. Les macromolécules et également les monocytes circulant peuvent ainsi atteindre le sous-endothélium.

Par ailleurs, la surface de l'endothélium est tapissée de glycosaminoglycanes qui jouent un rôle important dans l'absorption sélective de certaines cytokines ou facteurs de croissance. De plus les cellules endothéliales possèdent des récepteurs membranaires de la famille des récepteurs aux LDL (LDLr), permettant l'internalisation des lipoprotéines (Chylomicron, LDL)

au sein du cytoplasme cellulaire. La cellule endothéliale peut dans certains cas pathologiques oxyder les LDL qui sont alors transportées à travers l'endothélium puis internalisées par le récepteur scavenger des macrophages. Ce mécanisme, comme on le verra est déterminant dans la survenue de l'athérosclérose.

- **Sécrétion de substances vaso-actives**

L'endothélium module le tonus vasculaire en synthétisant et en sécrétant des substances vaso-actives qui conduisent à la vasodilatation des artères, comme le monoxyde d'azote (NO), l'EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor) et la prostacycline ou à leur vasoconstriction par l'endothéline-1 et l'angiotensine II [Cosentino et al.,1995]. La production de NO et de l'EDHF est augmentée dans la paroi vasculaire en réponse à divers stimuli incluant l'acétylcholine et les contraintes de cisaillement (« shear stress ») [Vanhoutte et al.,1991]. Les vasoconstricteurs, quant à eux, sont produits continuellement de manière à maintenir un équilibre en faveur de la vasodilatation. Cependant en cas de déséquilibre dans la production de ces substances vaso-actives en faveur de la vasoconstriction, la dysfonction endothéliale conduit à une pathologie vasculaire telle que l'hypertension artérielle et l'athérosclérose [Vanhoutte et al.,1997].

- **Sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance**

Lors d'une agression endothéliale, qu'elle soit mécanique ou chimique, l'endothélium va réagir et sécréter ces molécules afin de moduler les réponses inflammatoires et d'initier la prolifération des cellules musculaires lisses (CML).

Les cellules endothéliales (CE) activées en réponse à une atteinte expriment à leur surface des molécules d'adhésion comme l'ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule), la VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) et l'E-selectine entraînant le recrutement de leucocytes tels que les monocytes et les lymphocytes dans l'intima vasculaire [Cybulsky et al.,1991] [Mestas et al.,2008]. De plus les CE facilitent le recrutement des leucocytes dans la paroi vasculaire en sécrétant des chémokines telles que la MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), l'interleukin-8 (IL-8) et la fractalkine [Boivert et al.,2004].

Ce phénomène est accompagné d'une production et d'une sécrétion de facteurs de croissance tels que le PDGFBB (Platelet -Derived Growth Factor BB) [Shankar et al.,1992], le FGFb (Fibroblast Growth Factor basic) et l'IGF-1 (Insulin Growth Factor -1) qui sont tous pro-athérogènes et conduisent à la prolifération des CML dans l'intima vasculaire. De plus la sécrétion du bFGF et du PDGFBB augmente la liaison et la capture des LDL par les CML et contribue davantage à la croissance de la plaque d'athérome [Russo-Marie et al.,1998].

- **Maintien d'un équilibre anti-thrombotique**

L'endothélium sain empêche la mise en contact directe de l'espace sous-endothélium riche en collagène avec les facteurs circulants de la coagulation, évitant ainsi le déclenchement de

l'agrégation plaquettaire. Les cellules endothéliales au repos expriment de manière prédominante les propriétés anti-thrombotiques.

Lors de l'activation de l'endothélium, les CE modulent l'expression des médiateurs thrombotiques. Ils favorisent l'expression des médiateurs pro-thrombotiques comme les molécules pro-agrégantes (PAF (facteur d'activation des plaquettes)), les molécules pro-coagulantes (facteur tissulaire) et les molécules à action fibrinolytique (tPA (activateur tissulaire du plasminogène)) plutôt que les médiateurs anti-thrombotiques tels que les anti-agrégants plaquettaires (NO, HSPG (protéoglycanes de type héparane sulfate), les anticoagulants (thrombomoduline) et les anti-fibrinolytiques (PAI-1 (Inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène)) [Rodgers et al.,1988][Sagripanti et al.,2000].

1.2.2.1.2. Les cellules musculaires lisses (CML)

Les CML peuvent exister dans la paroi vasculaire sous la forme de deux phénotypes différents. Le phénotype contractile et le phénotype sécrétoire [Holifield et al.,1996].

Dans la paroi artérielle saine, les CML de phénotype contractile sont localisées dans la média artérielle et constituent la population majoritaire de l'artère. Ces CML sont enrichies en filaments d'actine et de myosine et leur principale fonction est d'assurer le maintien du tonus vasculaire. Les CML régulent le tonus vasculaire grâce à leurs propriétés contractiles et relaxantes et à la présence, au sein de la paroi vasculaire, de substances vaso-actives (contractantes comme l'endothéline-1 et l'angiotensine II et relaxantes telles que le NO, la PGI2, l'EDHF) [Allen et al.,1994].

Sous l'influence de divers facteurs de croissance (PDGFBB, IGF-1 et bFGF), sécrétés dans la paroi vasculaire par les cellules environnantes telles que les macrophages, les CE et les CML en réponse à des stimuli extérieurs, les CML peuvent changer de phénotype [Owens et al.,1995][Owens et al.,2004]. Elles reprennent alors un phénotype embryonnaire (phénotype sécrétoire ou synthétique). La structure cellulaire est modifiée avec un appauvrissement en filaments d'actine et de myosine et l'apparition du réticulum endoplasmique et de l'appareil de golgi. Ces changements structuraux témoignent de changements de fonction. Les CML de phénotype sécrétoire ont une forte activité proliférative et utilisent diverses voies de signalisation, dont celle de l'oncoprotéine Ras et de la cascade des MAP kinases. Elles produisent également des quantités importantes de matrices extracellulaires et de facteurs de croissance. Dans la plaque d'athérome ces CML sont localisées dans l'intima artérielle et participent à l'élaboration de la chape fibreuse où elles jouent un rôle important dans la croissance et la stabilité de la plaque d'athérome [Owens et al.,1995].

De plus ces cellules au sein de l'intima peuvent accumuler des lipides au niveau cytoplasmique et se différencier en cellules spumeuses, participant alors à la formation du cœur lipidique de la plaque d'athérome [Raines, 1993].

1.2.2.2. Les éléments circulants sanguins

1.2.2.2.1. Les monocytes et les macrophages

Une des phases athérogènes implique les monocytes circulants qui adhèrent à la surface de l'endothélium, le traversent et se transforment en macrophages puis en cellules spumeuses. Les monocytes jouent un rôle fondamental dans les défenses de l'organisme. L'intima saine est dépourvue de macrophage et est composée d'un endothélium ne présentant aucune molécule d'adhésion cellulaire. Le recrutement des monocytes circulants passe donc par une étape de « dysfonction » et/ou « d'activation » endothéliale [Kume et al.,1992]. Cette activation qui conduit à l'expression de molécules d'adhésion à la surface endothéliale dépend largement, au moins au début, de la présence de LDL-oxydées dans l'intima (par la suite, elle sera aussi entretenue par les cytokines inflammatoires exprimées par les cellules de la plaque). Ces molécules d'adhésion VCAM-1 ou ICAM-1 ont la capacité de se lier à des ligands de la famille des intégrines présents sur la membrane plasmique des leucocytes [Cybulsky et al.1991][Blanckenberg et al.,2003]. Un certain nombre de monocytes circulants peut ainsi adhérer à la surface de l'endothélium. Après adhésion, le monocyte pénètre dans l'espace sous-endothélial où il se différencie en macrophage. Ces étapes sont sous l'influence d'agents chimiotactiques produits par les CE et les CML en réponse à l'infiltration des LDL-oxydées dans la paroi vasculaire. Le MCP-1 est nécessaire au recrutement des monocytes dans l'espace sous-endothélial [Gu et al.,1998], le M-CSF (Macrophage - Colony Stimulating Factor) est nécessaire à la différenciation des monocytes en macrophages et à leur prolifération [Rajavashisth et al.,1990][Smith et al.,1995]. Les macrophages alors présents dans l'espace sous-endothélial jouent un rôle clé dans de nombreuses étapes de l'athérosclérose. Dans un premier temps, un certain nombre d'entre eux se transforme en cellules spumeuses en captant les LDL-oxydées, cette endocytose se fait par l'intermédiaire de récepteurs «scavengers» tels que les CD36, SR-A (Scavenger Receptor A), LOX-1 (Lectin-type Oxidized low-density lipoprotein receptor-1)[Rahaman et al.,2006][Shashkin et al.,2005]. Les macrophages vont alors entraîner une réaction inflammatoire chronique qui sera une cause majeure du développement de la plaque d'athérome. De plus ces macrophages produisent de nombreux composés actifs, tels que des substances vaso-actives (endothéline-1, NO et des eicosanoïdes), des espèces réactives de l'oxygène (ROS), des cytokines chémoattractants (MCP-1), des facteurs de croissance (PDGFBB, TGF- β , M-CSF) et des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1, IL-8, IL-10 et IL-6). Ceux-ci augmentent l'activation endothéliale, favorisent l'adhésion de nouveaux monocytes ainsi que leur passage entre les jonctions endothéliales et conduisent à la croissance et à la stabilité de la plaque d'athérome. Les macrophages activés peuvent aussi induire l'expression des métalloprotéinases qui dégradent la matrice extracellulaire et peuvent entraîner la rupture de la plaque d'athérome, une complication majeure de l'athérosclérose [Shah et al.,1995].

1.2.2.2. Les lymphocytes

Les lymphocytes présents dans les plaques d'athérome sont de type T (thymo-dépendants, mécanisme cellulaire de la défense immunitaire), dont environ deux tiers expriment CD4 (lymphocytes T auxiliaires ou *helper*, CD4⁺) et un tiers expriment CD8 (lymphocytes T cytotoxiques, CD8⁺) [Hansson et al.,1989][Jonasson et al.,1986].

Les lymphocytes de la circulation sont recrutés dans la paroi vasculaire, de la même manière que les monocytes, guidés par des molécules d'adhésion et par des chémokines. Dans l'intima de la paroi vasculaire les lymphocytes T reconnaissent une chaîne peptidique de l'antigène (comme celle des LDL-oxydées (Ox-LDL)), associée au complexe majeur d'histocompatibilité exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, lymphocytes B, cellules dendritiques) ce qui provoque leur activation.

Les CD4⁺ peuvent se différencier en différents sous-types de lymphocytes : les lymphocytes T « helper » de type 1 (Th1) et de type 2 (Th2) et les lymphocytes T régulateurs (Treg) [Abbas et al.,2001].

- Les Th1 provoquent l'activation des macrophages et des CE par la synthèse de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF, CD40L) responsables de la croissance de la plaque et de sa vulnérabilité [Frostegard et al.,1999].

- Les Th2 sécrètent de nombreuses cytokines telles que l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 et ainsi stimulent l'expression des IgE (immunoglobuline E) par les lymphocytes B (LB), activent les éosinophiles et les mastocytes, inhibent l'activation des macrophages et suppriment la réponse immunitaire induite par les Th1 [Abbas et al.,2001].

- Les Treg ont un rôle athéro-protecteur induit par la production de TGF-B et d'IL-10 provoquant ainsi l'inhibition de l'activation des lymphocytes T auto-immuns et la stabilisation de la plaque d'athérome [Fehervari et al.,2004].

Les CD8⁺ détruisent les cellules infectées dont l'antigène est présenté par le CMH I et produisent des cytokines pr-inflammatoires [Abbas et al.,2001].

1.2.2.3. Les lipoprotéines

Les lipides constituent une famille hétérogène de molécules hydrophobes, insolubles dans les milieux biologiques aqueux. Ainsi les principaux composés lipidiques (cholestérol non estérifié, esters de cholestérol, triglycérides et phospholipides) ne peuvent circuler sous forme monomérique libre. Ils sont véhiculés à travers les divers compartiments extracellulaires de l'organisme (plasma, lymphe et liquide interstitiel) au sein d'édifices macromoléculaires complexes : les lipoprotéines. Elles permettent ainsi le ciblage des lipides d'origine exogène ou endogène, des sites d'absorption ou de production vers les tissus d'utilisation, de stockage ou de transformation [Spector,1984].

1.2.2.3.1. Structure des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont subdivisées en plusieurs sous-groupes, et constituées d'une structure identique mais distinctes sur la base de caractéristiques physico-chimiques. Elles sont composées d'un cœur lipidique hydrophobe d'esters de cholestérol et de triglycérides, et recouvertes d'une enveloppe amphiphile dont les constituants principaux sont les phospholipides, le cholestérol libre non-estérifié et les apolipoprotéines (Figure IG-2) [Mahley et al.,1984]. Ces dernières confèrent à chaque édifice lipoprotéique ses propriétés fonctionnelles et son devenir métabolique.

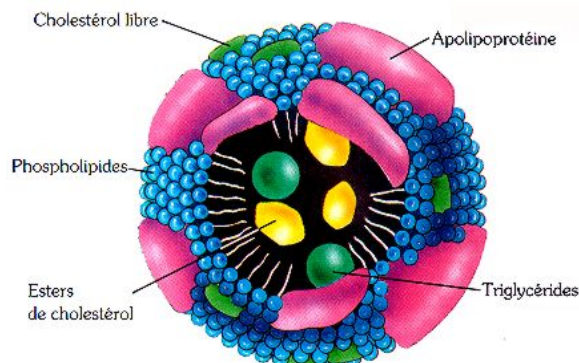


Figure IG-2 : Structure générale d'une lipoprotéine plasmatiche. Les lipoprotéines transportent dans le sang les graisses non hydrosolubles pour les faire parvenir aux divers organes. Le noyau de la lipoprotéine contient des triglycérides et des esters de cholestérol. L'enveloppe extérieure se compose de phospholipides et d'apoprotéines. (Source : Brochure de la Fondation Suisse de Cardiologie).

Il existe six classes majeures de lipoprotéines qui diffèrent par leur densité, leur taille et par leur composition lipidique du cœur hydrophobe (Figure IG-3) [Murray et al.,2003]:

Les chylomicrons (CM) sont les lipoprotéines les plus grosses et les moins denses dues à leur grande teneur en triglycérides (TG). Ils sont responsables du transport des lipides alimentaires des intestins aux tissus. Ils sont composés principalement de triglycérides et contiennent de l'apoprotéine A-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III et E.

Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) sont fabriquées et sécrétées par le foie. Elles participent à la voie endogène des lipoprotéines, allant du foie vers les tissus périphériques. Ces particules sont principalement composées de TG synthétisés au niveau du foie, et de l'apoprotéine B-100, E, C-I, C-II et C-III.

Les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) sont issues de l'hydrolyse des VLDL par les lipases. Elles sont de taille et de densité intermédiaires aux VLDL et aux LDL. Elles contiennent des TG, du cholestérol, et de l'apoprotéine B-100 et E.

Les lipoprotéines de faible densité (LDL) sont issues des IDL sous l'action de lipase hépatique et enrichies en esters de cholestérol. Elles sont composées de l'apoprotéine B-100 nécessaire

au maintien de l'intégrité structurale de la particule. Ces lipoprotéines, sous forme oxydées, sont considérées comme étant la sous-population la plus athérogène.

Les lipoprotéines de haute densité (HDL) sont sécrétées par le foie et l'intestin et sont dérivées des résidus d'hydrolyse des lipoprotéines riches en TG (CM et VLDL). Elles sont principalement constituées de phospholipides et présentent principalement à leur surface les apoprotéines A-I, C-II, C-III et E. Elles ont pour rôle de transporter le cholestérol des tissus périphériques vers le foie où il pourra être éliminé.

La lipoprotéine (a) (Lp(a)) est une particule de LDL modifiée composée de cholestérol et d'une molécule d'apoprotéine (a) fixée par un lien disulfure sur la molécule d'apo B-100.

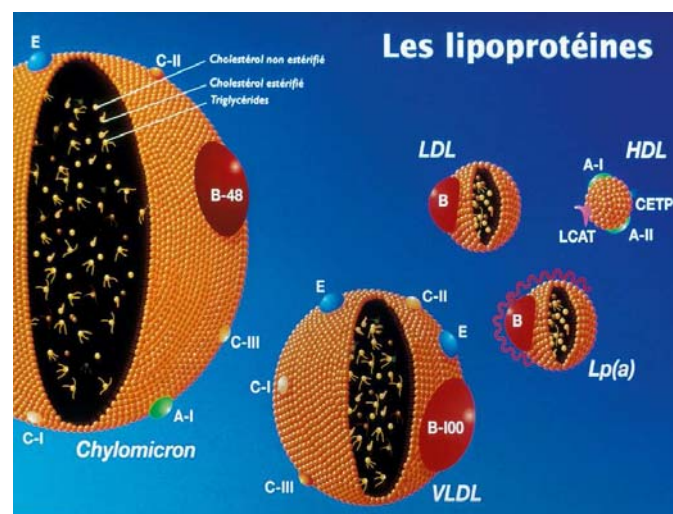


Figure IG-3 : Classification des lipoprotéines. Densité, taille et composition respectives de chaque lipoprotéine.

1.2.2.3.2. Métabolisme des lipoprotéines

Les lipoprotéines constituent un moyen de transport et de distribution des lipides au sein de l'organisme. En effet le cholestérol est essentiel à la formation des membranes cellulaires et à la synthèse de certaines hormones et des sels biliaires. Les triglycérides quant à eux sont une source d'acide gras libre. Ils constituent ainsi une réserve d'énergie au niveau du tissu adipeux et peuvent être utilisés directement par les muscles comme source d'énergie [Corvilain, 1997][Muray et al.,2003].

Au niveau de chaque organe irrigué les lipoprotéines subissent des modifications qui affectent leur composition, leur structure et leur fonction. Trois types de tissus sont impliqués dans le métabolisme lipidique: l'intestin, le foie et les tissus périphériques.

L'intestin (Figure IG-4) permet l'absorption des lipides alimentaires et leur intégration dans des lipoprotéines de grande taille riches en triglycérides : les chylomicrons. Ces chylomicrons vont contribuer au transport entéro-hépatique des lipides, voie métabolique au cours de

laquelle leurs triglycérides seront hydrolysés par la LPL (lipoprotéines lipase) et les acides gras libérés, captés par les tissus périphériques pour y être stockés (tissu adipeux), ou dégradés à des fins énergétiques (muscle strié). Finalement, les particules résiduelles non captées, ayant perdu une large part de leurs triglycérides et de leurs apoprotéines, sont catabolisées dans les hépatocytes par l'intermédiaire d'une endocytose récepteur dépendante (LDLr, LRP1, les récepteur de l'apoE)[Corvilain, 1997][Muray et al.,2003][Beisiegel,1998].

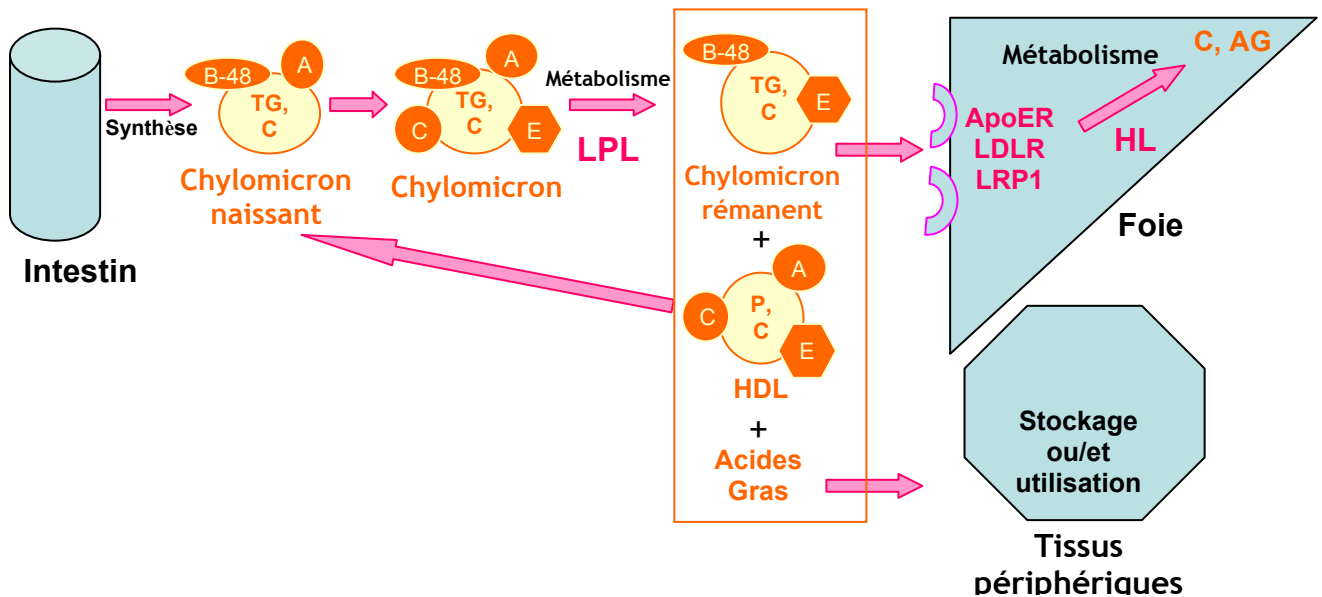


Figure IG-4 : Métabolisme des chylomicrons, lipides provenant de l'alimentation. (C : cholestérol, AG ; acides gras, TG ; triglycérides, Ronds oranges ; apoprotéines de type respectif à chaque annotation, LPL ; lipoprotéine lipase, HL ; lipase hépatique, P: phospholipides)

Le foie (Figure IG-5) constitue l'organe central de gestion du métabolisme et du transport des lipides dans l'organisme. Il prend en charge les lipides résiduels d'origine intestinale et les intègre dans de nouvelles lipoprotéines (VLDL) afin de les redistribuer aux tissus périphériques, c'est la voie endogène d'apport. De plus, le foie possède la capacité de dégrader les lipoprotéines grâce à la lipase hépatique (HL) et aidé par la LPL de générer des particules plus petites et plus denses, les IDL et des LDL [Muray et al.,2003].

Enfin, **les tissus périphériques (Figure IG-5)** captent des lipides (principalement cholestérol et acides gras libres non estérifiés) par le biais de l'endocytose et de l'hydrolyse des lipoprotéines d'origine hépatique ou intestinale. Ces lipides sont alors utilisés par la cellule pour produire de l'énergie, pour le stockage de composés énergétiques, pour la production et le maintien de la membrane cellulaire et la synthèse de différentes substances endogènes telles que les hormones stéroïdiennes et les acides biliaires. Le cholestérol a recours, via les HDL, à une voie de transport centripète vers le foie, seul organe capable de l'éliminer par voie biliaire [Muray et al.,2003].

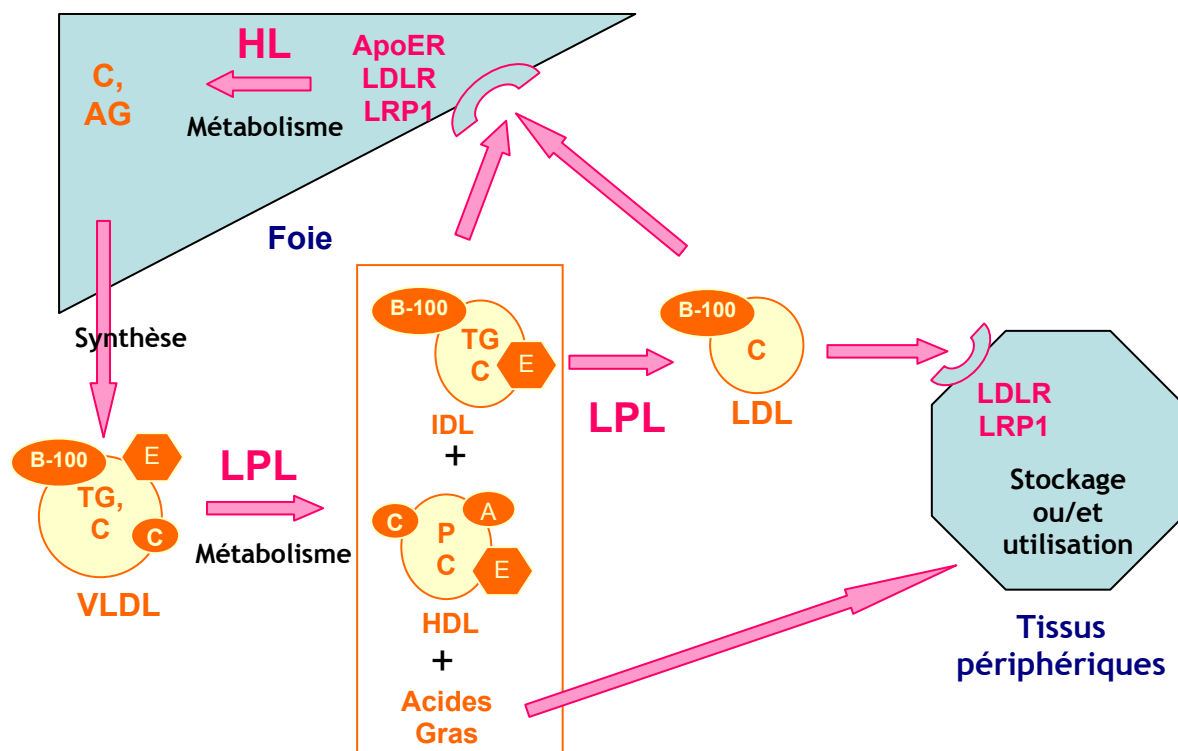


Figure IG-5 : Métabolisme des lipides endogènes. (C : cholestérol, AG ; acides gras, TG ; triglycérides, Ronds oranges ; apoprotéines de type respectif à chaque annotation, LPL ; lipoprotéine lipase, HL ; lipase hépatique, P ; phospholipides).

1.2.2.3.3. Rôles des lipoprotéines dans l'athérosclérose

De nombreuses études ont montré que l'augmentation du taux de cholestérol sérique est corrélée avec le taux de mortalité cardiovasculaire. Le rôle de l'hypercholestérolémie dans l'augmentation du risque de mortalité a été établi de façon irréfutable dans de très nombreuses études épidémiologiques réalisées dans les pays occidentaux comme l'étude des Sept Pays d'Ansel Keys [Keys, 1975], l'étude de Framingham [Kannel et al., 1971], l'étude MRFIT (Multiple Risk Factor Intervention trial research Group) [MRFIT, 1982] et en France l'étude prospective parisienne [Ducimetière et al., 1977]. Quatre autres études ont confirmé ce qui avait été pressenti dans les études antérieures, à savoir que toute baisse du cholestérol total (ou du cholestérol LDL) permet de réduire les événements coronariens (mortels et non mortels) [Etude 4S, 1994][Sacks et al., 1996][Sheperd et al., 1995][LIPID, 1985].

Cependant le cholestérol ne présente pas la même potentialité athérogène selon qu'il est véhiculé par les VLDL/LDL ou par les HDL. En première analyse, les HDL exercent plutôt un effet bénéfique sur l'initiation de la plaque d'athérome. Elles permettent le retour du cholestérol des tissus périphériques vers le foie, et peuvent également prévenir l'oxydation des LDL. Les particules de densité plus légère (VLDL, IDL et LDL) favorisent au contraire cette étape. Des études cliniques ont montré que les individus présentant un taux élevé de LDL petites et denses ont une prévalence accrue de maladies cardiovasculaires [Krauss et al,

1994], ceci même en présence d'un profil lipoprotéique quantitativement normal comme chez certains diabétiques de type II [Guerin et al, 2001]. Cette augmentation du risque s'explique à la fois par l'augmentation de la susceptibilité à l'oxydation des LDL petites et denses, par leur plus forte affinité pour les protéoglycanes de la paroi artérielle, par leur plus faible affinité pour leur récepteur cellulaire [Nigon et al,1991], et par leur plus forte propension à pénétrer la paroi vasculaire sous forme oxydée [Packard et al.,1999][Krauss et al.,1998].

D'autre part il est clairement établi que l'oxydation des lipoprotéines est au centre du processus d'athérosclérose et requiert l'implication de plusieurs mécanismes moléculaires, parmi lesquels l'attraction et le recrutement des monocytes, l'augmentation de captation par les macrophages des LDL oxydées, l'augmentation des voies pro-coagulantes [Witztum et al, 2001]. En faveur de la théorie « oxydative » de l'athérosclérose chez l'homme, des LDL oxydées sont retrouvées au sein des lésions. Ceci a été mis en évidence par la présence dans la circulation et dans les plaques d'athérome d'auto-anticorps dirigés contre des épitopes oxydés des LDL. Il existe donc une corrélation entre la susceptibilité à l'oxydation des LDL circulantes et l'incidence de l'athérosclérose.

Ce sont les récepteurs « éboueurs » de classe A (Scavenger receptor - class A), exprimés par les macrophages qui permettent la captation non régulée des LDL modifiées [Platt et al, 2001]. De la même façon, le récepteur CD36, récepteur éboueur de classe B exprimé par les monocytes, les plaquettes et les cellules endothéliales, est capable de lier les lipoprotéines oxydées. Ainsi, les données *in vivo* suggèrent que le récepteur CD36 rendrait principalement compte de la formation de cellules spumeuses, initiant les lésions d'athérosclérose [Febbraio et al, 2001]. Enfin, deux récepteurs supplémentaires pour les LDL oxydées ont été identifiés au niveau des cellules endothéliales : LOX-1 (lectin-like oxidized LDL receptor) et SREC (Scavenger receptor expressed by endothelial cells I) [Dhaliwal et al, 1999].

1.2.3 Evolution de la plaque d'athérome

1.2.3.1 La dysfonction endothéliale: déclencheur de l'athérosclérose

L'étape initiale se caractérise par un dysfonctionnement (ou activation) endothélial dont les causes sont partiellement comprises. Les bifurcations et les courbes des troncs artériels sont des régions prédisposées à développer des plaques d'athérome. Ce sont des régions où les flux sanguins sont perturbés et où l'endothélium est soumis d'une part à des fluctuations spatiales et d'autre part à des contraintes de cisaillements (« *shear stress* ») d'amplitudes variables. En effet la perte du flux laminaire, responsable d'une diminution locale des forces de cisaillement va entraîner l'induction de l'expression d'un certain nombre de gènes tels que les molécules d'adhésion, les cytokines ou l'inhibition de l'expression de d'éléments protecteurs comme le NO et la PGI₂. Ces modifications transcriptionnelles vont alors permettre la formation d'un état inflammatoire initiant l'athérosclérose.

Il existe plusieurs récepteurs tels que les récepteurs de la famille des LDLr, les récepteurs « éboueurs » des macrophages qui permettent aux particules lipidiques oxydées de pénétrer à l'intérieur des cellules et de former des cellules spumeuses [Willnow et al, 1999] [Chung and Wasan, 2004].

Ces processus concourent d'une part au recrutement et à l'adhérence de monocytes et de lymphocytes au niveau de l'endothélium et d'autre part à leur multiplication. Les monocytes ayant pénétré dans la couche intimale vont se transformer en macrophages qui vont se gorger de LDL oxydées présentes dans l'espace sous-endothélial et devenir des cellules spumeuses. On est à présent au stade précoce de la pathologie avec la formation de « stries lipidiques » (Figure IG-6) [Ross, 1999].

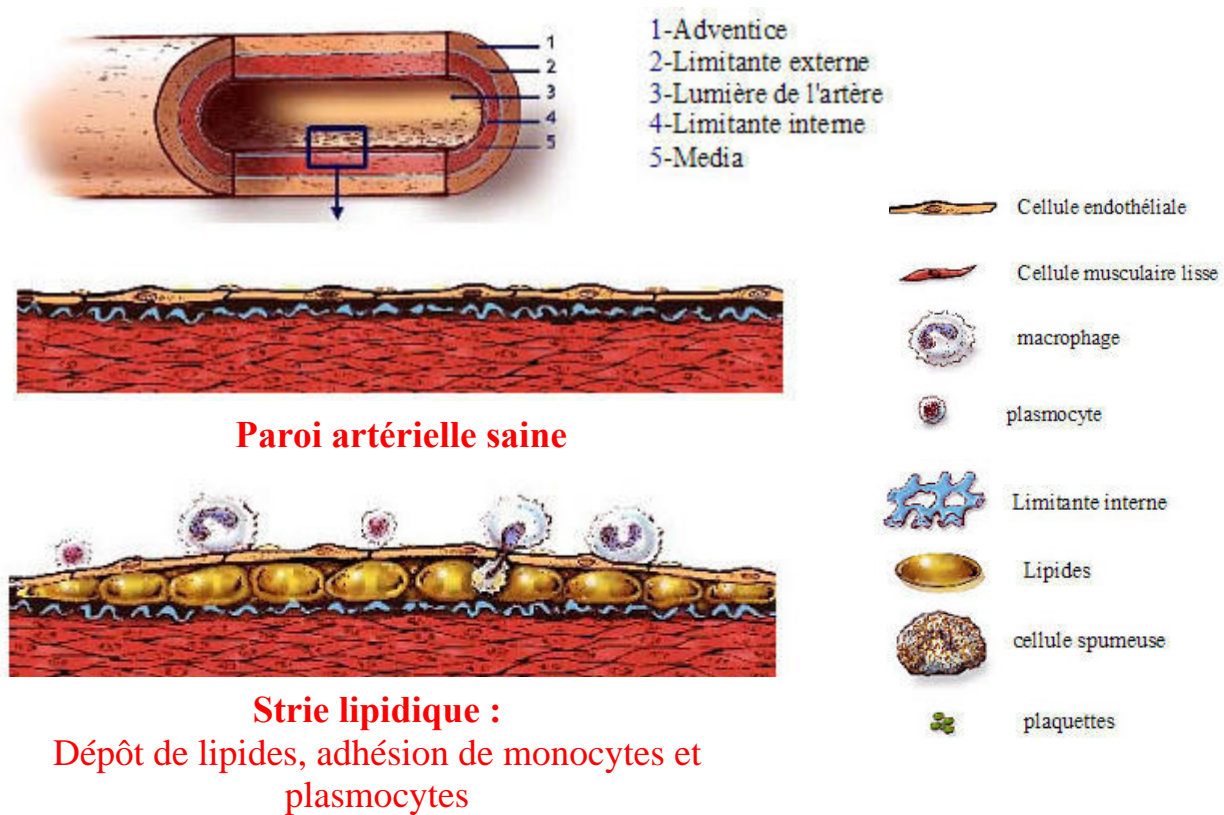


Figure IG-6 : Représentation de la paroi vasculaire saine et de la « strie lipidique » (source : Parés-Herbuté et al. (Paroi vasculaire et diabète))

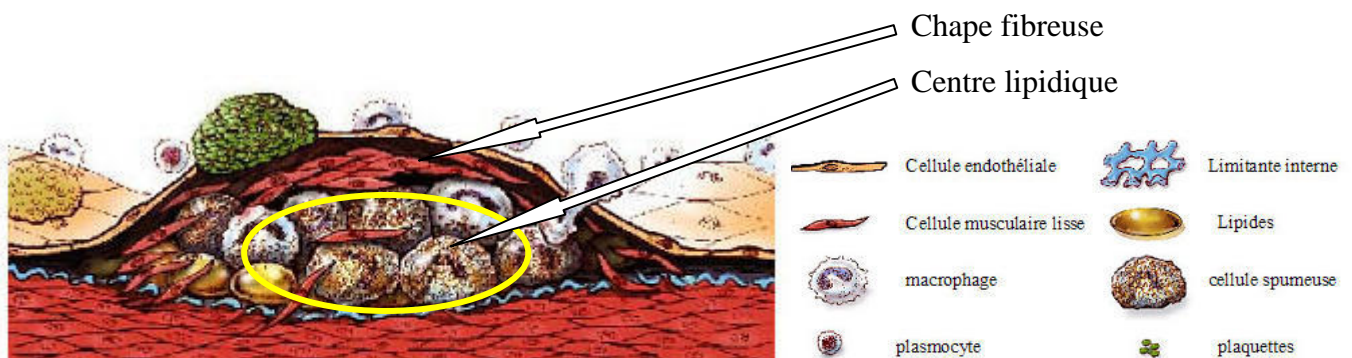
1.2.3.2 Formation de la plaque d'athérome mature : un centre athéromateux et une chape fibreuse.

Le phénomène va s'amplifier car les macrophages et les lymphocytes vont entretenir le phénomène inflammatoire en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IFN-g, TNF-a) ou en stimulant la production de cytokines ou de MCP-1 par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (CML) de la media. Les CML vont progressivement subir un phénomène de dédifférenciation afin de migrer vers l'endothélium et construire une «chape fibreuse» entourant les cellules spumeuses. Le tissu fibreux est constitué de collagène,

d'élastine, de fibrine, de protéoglycanes et de CML et permet de stabiliser la plaque athérome. Ces CML vont continuer à proliférer sous l'influence des facteurs de croissance produits au sein de la plaque et à produire des métalloprotéinases qui ont pour rôle de dégrader la matrice extracellulaire et de fragiliser la plaque.

Cette chape fibreuse entoure le centre lipidique qui est formé essentiellement de lipides libérés après dégénérescence des cellules spumeuses (Figure IG-7) [Lusis, 2000][Ross, 1999].

La formation de cette plaque d'athérome entraîne d'autres modifications de la paroi artérielle notamment par la formation de nouveaux vaisseaux provenant de ramification des vasa vasorum de l'adventice irrigant ainsi la paroi vasculaire.



Plaque d'athérome : Migration et prolifération des CML

Figure IG-7: Représentation de plaque d'athérome mature. Représentée par une chape fibreuse composée principalement de CML et un centre lipidique contenant des cellules spumeuses, des lipides et des macrophages (Source : Parés-Herbuté et al. (Paroi vasculaire et diabète))

1.2.3.3. Plaque d'athérome compliquée

L'évolution de la plaque se déroule de façon lente, sur plusieurs années en général. Progressivement, la plaque d'athérome se développe et la lumière artérielle se réduit, entraînant une sténose artérielle. Au début de la maladie, l'artère est capable de réagir et compenser cette sténose en se dilatant (remodelage vasculaire). Petit à petit, les efforts de compensation sont trop importants à mettre en place et la sténose artérielle se développe et peut obstruer la majeure partie de la lumière artérielle.

Plusieurs complications peuvent survenir (Figure IG-8):

- **La rupture de la chape fibreuse** encore appelée ulcération ou fissure met en contact le contenu de la plaque et le sang circulant entraînant deux complications. D'une part le sang sous forte pression peut s'engouffrer dans la brèche pour former un hématome, parfois volumineux, à l'intérieur de la plaque. D'autre part le contenu de la plaque est exposé à la circulation sanguine, les processus de coagulation s'installent, les plaquettes adhèrent et les risques de thromboses sont élevés [Davies et al, 1993].

Ceci pouvant entraîner dans le pire des cas une occlusion de la lumière artérielle et un syndrome coronarien aigu de type angor ou infarctus du myocarde. Dans d'autres cas le thrombus et l'hématome se stabilisent sans provoquer d'occlusion.

Cependant, certaines plaques dites stables, très fibreuses et dures, n'entraînent pas de complications majeures. Les facteurs de rupture de la plaque sont généralement liés à leur composition en lipides et en tissus fibreux, un centre lipidique important et une chape fibreuse très fine [Lee and Libby, 1997], ainsi qu'à leur contenu en métalloprotéinases [Galis *et al*, 1994]. De plus, cette chape fibreuse fine doit être relativement peu solide, ce qui implique qu'elle contienne peu d'élastine et de collagène. D'autres facteurs sont également impliqués dans l'instabilité de la plaque : l'apoptose des cellules de la plaque, les CML [Clarke *et al*, 2006], les macrophages [Tabas, 2009][Kolodgie *et al*, 2001] et la rupture de néo-vaisseaux intra-plaque.

- **L'Anévrisme** est une conséquence de l'athérosclérose et se traduit par un amincissement accentué de la paroi artérielle dû à une exagération du processus de remodelage artériel utilisé pour compenser l'athérome.

- **La calcification** est un processus tardif dans la progression de l'athérogenèse et est mal connue. Il s'agit d'un mécanisme contrôlé qui nécessite la présence de protéines impliquées dans les régulations osseuses telles que le TGF β , l'ostéocalcine et le collagène. Elle se caractérise par une accumulation dans la paroi vasculaire de cellules semblables aux cellules du cartilage (les chondrocytes) et de l'os [Guzman *et al*, 2007][Shao *et al*, 2006]. En effet dans ce processus les cellules vasculaires perdent leurs caractéristiques de cellules musculaires lisses pour se différencier en chondrocytes et exprimer des marqueurs de la différenciation chondrocytaire comme les gènes Sox9 et Cart1, principaux régulateurs de la chondrogenèse.

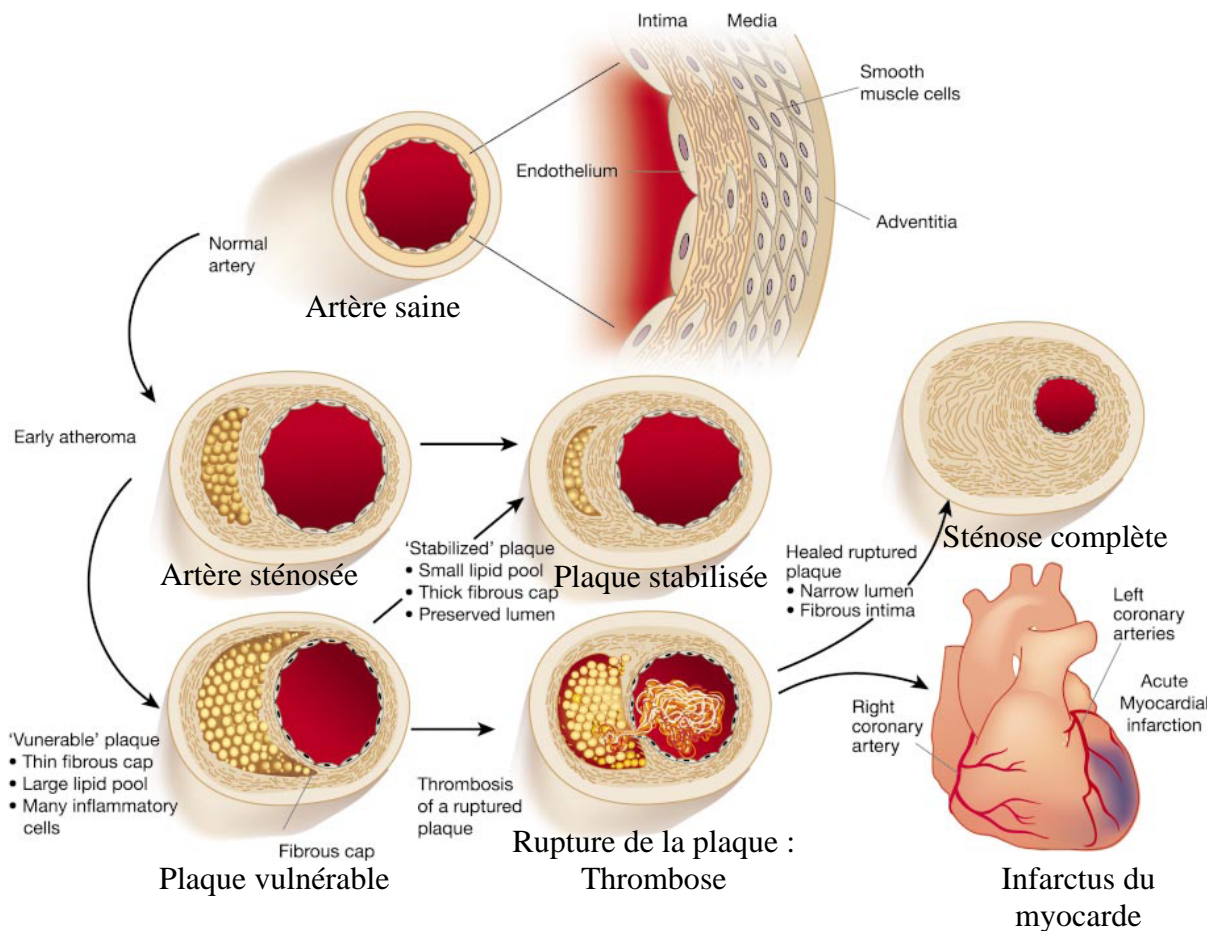


Figure IG-8 : Genèse de la plaque d'athérome et ses complications majeures (source : Libby et al, 2002)

1.2.4. Processus impliqués dans le développement de la plaque d'athérome

1.2.4.1. La différenciation cellulaire au sein de la plaque d'athérome

1.2.4.1.1. Différenciation des monocytes en macrophages puis en cellules spumeuses

La différenciation des monocytes en macrophages est une étape essentielle dans le développement de l'athérosclérose et est précédée par l'infiltration des monocytes dans la paroi vasculaire.

Dans la paroi artérielle, les monocytes subissent la différenciation cellulaire en macrophages [Ross, 1993][Takahashi et al.,2002][Daugherty et al., 2005][Zernecke et al., 2005] ou en cellules dendritiques ou en cellules présentatrices d'antigènes [Bobryshev et al.,2005b]. Dans l'intima artérielle, les monocytes qui se différencient en macrophages sont caractérisés par un volume cytoplasmique plus important contenant des vésicules, des vacuoles et des lysosomes. Le facteur de différenciation, M-CSF (Macrophage- colony stimulating factor) est le régulateur majeur de la différenciation en macrophages *in vitro* et sa présence a été

démontrée dans des lésions athéroscléreuses [Rosenfeld et al., 1992][Clinton et al.,1992]. De plus le rôle important de M-CSF dans le développement de l'athérosclérose a été mis en évidence par une absence quasi-totale de plaques d'athérome chez les souris apoE^{-/-} déficientes en M-CSF [Smith et al.,1995].

Les macrophages de la lésion athéroscléreuse sont hétérogènes. La majorité de ces macrophages accumule des lipides, lorsque la charge d'épuration imposée aux macrophages devient excessive, l'accumulation de cholestérol conduit à leur engorgement et initie leur différenciation en cellules spumeuses [Brown et al.,2000b][Rader et al.,2005]. Ainsi cette différenciation conduit à la formation du centre lipidique de la plaque d'athérome et à l'activation du système inflammatoire.

1.2.4.1.2. Différenciation des CML contractiles de la média en CML sécrétoires de l'intima

Il a été montré que les CML de la média sont capables de changer de phénotype et migrer vers l'intima. Ce changement de phénotype confère à la cellule des propriétés athérogènes [Mosse et al.,1985]. Les CML humaines de la média vasculaire expriment principalement des protéines impliquées dans des fonctions contractiles telles que les chaînes lourdes de myosine des muscles lisses (SM-MHC, smooth muscle myosin heavy chain), ou l'actine (SM-A, smooth muscle- actin).

En revanche les CML de l'intima vasculaire expriment moins de protéines contractiles, ont un taux de prolifération supérieur et ont une capacité importante à synthétiser des protéines de la matrice extracellulaire, des protéases et des cytokines [Owens et al.,2004][Campbell et al.,1994][Worth et al.,2001].

Des études *in vitro* ont montré que des CML de souris et de rat peuvent passer d'un phénotype contractile à un phénotype synthétique en réponse à une variété de stimuli tels que les cytokines [Corjay et al.,1989][Hautmann et al.,1997][Li et al.,1997], les espèces réactives de l'oxygène (ROS) [Su et al.,2001], les lipides [Pidkovka et al.,2007], la matrice extracellulaire [Hedin et al.,1989][Thyberg et al.,1994] et les contraintes de cisaillement (« shear stress »)[Reusch et al.,1996].

De plus ce changement de phénotype est corrélé avec la possibilité des CML à exécuter une variété de fonctions. En effet les CML « synthétiques » migrent et prolifèrent plus aisément que les CML de la média et peuvent contribuer à la formation de la chape fibreuse de la plaque d'athérome. Elles sont capables d'exprimer des récepteurs aux LDL, VLDL et des récepteurs « éboueurs » à la surface de leurs membranes et ainsi participer avec les macrophages à la capture des lipides et à la formation des cellules spumeuses [Pidkovka et al.,2007][Campbell et al.,1994].

1.2.4.1.3. Différenciation des CML en cellules spumeuses

Bien que la majorité des cellules spumeuses dans la lésion athéroscléreuse provient des macrophages, les CML de la média sont capables d'accumuler des lipides dans leur cytoplasme [Stary et al.,1994]. Ce phénomène a été mis en évidence par des études *in vitro* et *in vivo* de co-localisation, qui montrent que le marquage des lipides correspond à celui des CML [Rong et al.,2003][Faggiotto et al.,1984][Klouche et al.2000]. Cependant, pour capturer les lipides, les CML expriment à leur surface membranaire de nombreux récepteurs de capture différents tels que le récepteur des LDL [Ruan et al.,2006], le récepteur des VLDL [Takahashi et al.2005], le récepteur CD36 [Lim et al.,2006][Matsumoto et al.,2000], les récepteurs « éboueurs » de type I et II [Bickel et al.,1945][Matsumoto et al.,2000] et les CXCL16/SR-PSOX [Wagsater et al.,2004]. Dans un modèle d'athérosclérose induit par un régime riche en graisse (western-diet), les CML de la paroi vasculaire sur-expriment les récepteurs éboueurs [Li et al.,1995]. De manière similaire, en présence de cytokines athérogènes incluant l'interleukine-1 β (IL-1), TNF- α (Tumor necrosis factor- α) et M-CSF, les CML de rat et de lapin sur-expriment les récepteurs des LDL et des VLDL [Takahashi et al.2005] [Ruan et al.,2006][Ross, 2003]. En plus de l'augmentation de l'expression des récepteurs des LDL, le TNF- α et le M-CSF augmentent la liaison des LDL aux CML et ainsi contribuent à la formation des cellules spumeuses [Ross, 2003]. Par la suite, il a été montré *in vitro* que les CML sont capables d'internaliser les LDL natives [Ruan et al.,2006], les LDL modifiées [Klouche et al.,2000] et les chylomicrons rémanents [Floren et al.,1981][Yu et al.,1997][Botham et al.,2005] de la même manière que les macrophages de la plaque d'athérome. En plus de l'accumulation de cholestérol, les CML expriment également des récepteurs permettant aux cellules d'épurer le cholestérol du milieu extracellulaire. Le transport inverse du cholestérol est possible dans les CML par l'expression du transporteur ABCA1 (ATP binding cassette A1) [Nagao et al.,2006] et permet de véhiculer le cholestérol en excès des tissus périphériques vers le foie. Dans les macrophages ces transporteurs sont réprimés au cours de l'athérosclérose ce qui conduit à la formation de cellules spumeuses.

1.2.4.1.4. Différenciation des CML en cellules chondro/ostéocytaires

La CML est un type cellulaire abondamment présent dans la paroi vasculaire et est capable de maintenir une plasticité cellulaire lui permettant de changer de phénotype en réponse aux divers stimuli locaux. Dans un microenvironnement vasculaire enrichi en TGF- β 1, induit par un adénovirus qui code pour la cytokine, la CML se trans-différencie en cellule ostéo/chondrocytaire dans la média et l'intima vasculaire et provoque la formation de calcification vasculaire, une complication qui survient tardivement au cours de l'athérosclérose [Schulik et al.,1998]. De plus les CML en culture se calcifient après traitement à des concentrations physiologiques de phosphate. En corrélation avec

l'augmentation de phosphate lors de la calcification vasculaire les CML en culture se différencient en ostéo/chondrocytes. Ce changement de phénotype est mis en évidence par une perte des marqueurs de CML tels que SM22 α et SM- α actin et un gain des marqueurs chondro/ostéogéniques comme Runx2/Cbfa1, l'ostéopontine, l'ostéocalcine et l'alcaline phosphatase (ALP) [Steitz et al.,2001]. Finalement la microscopie électronique et les études d'immunomarquages ont permis d'identifier dans les lésions athéroscléreuses humaines et murines des cellules "myo-chondrocytaires" représentatives d'une cellule hybride entre la CML et la cellule chondrocytaire [Bobryshev,2005]. Les différentes études suggèrent un rôle crucial des CML dans l'induction et le développement de la calcification vasculaire. Cette différenciation des CML est induite par la création d'un microenvironnement pro-chondrogénique dans la paroi vasculaire [Speer et al.,2009]. Cependant les mécanismes responsables de ce changement phénotypique et conduisant à la calcification vasculaire ne sont pas encore complètement élucidés, et font l'objet à de nombreuses investigations.

1.2.4.1.5. Différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules vasculaires

Dans la paroi vasculaire de nombreuses cellules pluripotentes ont été caractérisées telles que les péricytes ou des cellules mésenchymateuses. Leur différenciation aberrante au sein de la paroi vasculaire contribue au développement et à la progression de nombreuses pathologies cardiovasculaires tels que l'athérosclérose ou/et la calcification vasculaire [Abedin et al.,2004][Tintut et al.,2003]. Les cellules mésenchymateuses ont la possibilité de se différencier en une variété de cellules contribuant à la formation de cartilage, de graisse, d'os et de muscle [Hull et al.,1998][Virchow et al.,1863][Jeziorska et al.,1998] [Seemayer et al., 1973][Bunting et al., 1906][Buerger et al., 1908]. L'environnement de ces cellules pluripotentes conditionne leur devenir et l'engagement vers une lignée précise.

Les péricytes sont présents dans tout le lit vasculaire, et peuvent au même titre que les CML [Davies et al., 2005] de la paroi vasculaire adopter un phénotype adipogénique et accumuler des lipides dans leur cytoplasme [Kirton et al.,2007]. Ainsi ils contribuent à la formation de cellules spumeuses et au développement de l'athérosclérose.

Toutefois Demer et al. ont montré que les cellules vasculaires calcifiées expriment les mêmes marqueurs que les péricytes, tels que SM- α actin et 3G5 [Bostrom et al.,1993]. Ceci a été confirmé par d'autres groupes qui montrent que les péricytes *in vitro* et *in vivo* sont capables de former des cellules surexprimant des protéines spécifiques des chondrocytes tels que Sox9, aggrecan et accumulant des protéoglycanes sulfatés [Collett et al.,2005][Shao et al.,2006][Doherty et al.,1998][Farrington et al.,2004]. Ainsi les cellules souches mésenchymateuses peuvent également contribuer à la formation de calcification vasculaire.

Enfin ces cellules souches mésenchymateuses provenant de la moelle osseuse et présentes dans la circulation sanguine pour atteindre la paroi vasculaire, sont également capables de

réparer des lésions en se différenciant soit en cellules endothéliales [Kawamoto et al., 2001][Griese et al.,2003] soit en CML de la paroi vasculaire [Simper et al.,2002].

1.2.4.2. Prolifération cellulaire au sein de la plaque d'athérome

1.2.4.2.1. Prolifération des CML de la paroi vasculaire

La prolifération des CML est une étape clé dans l'évolution de la plaque d'athérome [Delafontaine,1998]. En effet la prolifération des CML va entraîner une accumulation de cellules dans l'intima vasculaire et ainsi former une chape fibreuse qui entraîne la croissance de la plaque d'athérome. La croissance des CML est possible par la création au sein de la lésion d'un environnement fortement mitogène. Le Tableau ci-dessous résume tous les facteurs sécrétés, par les cellules de la paroi vasculaire aussi bien que par des cellules provenant de la circulation venant s'infiltrer dans l'intima, responsables de la prolifération des CML (Tableau IG-1) [Raines et al.,1993]. Cependant l'augmentation des facteurs mitogènes n'est pas suffisante pour induire la prolifération cellulaire, l'expression de leur récepteur au niveau des membranes des CML doit également être induite. A l'état normal les artères expriment très peu de facteurs de croissance cependant leur concentration est largement augmentée après blessure de la paroi ou dans les lésions athéroscléreuses. De nombreuses études ont mis en évidence l'induction de l'expression des cytokines et des facteurs de croissance impliqués dans les changements cellulaires et qui accompagne le développement des lésions athéroscléreuses [Li et al.,2009][Vindis et al.,2007].

Facteurs induisant la prolifération des CML	
Cytokines et facteurs de croissance	Cellules productrices des facteurs mitogènes
EGF (Epidermal GrowthFactor)	Plaquettes (P)
FGFb	CE, Macrophages (M), CML
HB-EGF(Heparin-binding EGF-like growth factor)	CE, M, CML
IGF-1	CE, M, CML, P
IFN γ	M, lymphocytes T (T)
IL-1	CE, M, CML, P, T
IL-6	CE, M, CML, T
PDGF	CE, M, CML, P
Thrombine P1	Plasma
TGF- α	M
TGF- β	CE, M, P, CML, T
TNF- α	CE, M, CML, T
Agents vasoactifs, Prostaglandines et Leukotriènes	
Angiotensine II	CE, plasma, CML
Endothéline-1	CE, M, P, plasma
Adrénaline/Noradrénaline	Hormone adrénergique
Leukotriènes	Neutrophiles
1 2-HETE (acide 1 2-hydroxyeicosatétranoïque)	P

Protéines de la matrice extracellulaire	Cellules productrices des facteurs mitogènes
Thrombospondine	P, CE, CML

Tableau IG-1: Facteurs induisant la prolifération des CML (Source: [Raines et al., 1993] modifié).

2. Implication de LRP1 dans l'athérosclérose

2.1. Le LRP1 : Généralité et origine

2.1.1. Structure

Le LRP1 également connu sous la dénomination de CD91 et « alpha-2-macroglobulin receptor » a été identifié en 1988 par l'équipe du Dr Joachim Herz pour ses capacités à internaliser et permettre la dégradation par le protéasome des lipoprotéines enrichies en apoprotéine E (Apo E) telles que les chylomicrons, les IDL et les HDL. Cette protéine de 600 kDa, principalement présente dans le foie, a des homologues de structure avec le récepteur aux LDL (LDLr). Cette homologie de structure l'insère dans la grande famille des LDLr (Figure IG-9) [Herz et al. 1988] [Kowal et al., 1989][May et al., 2007].

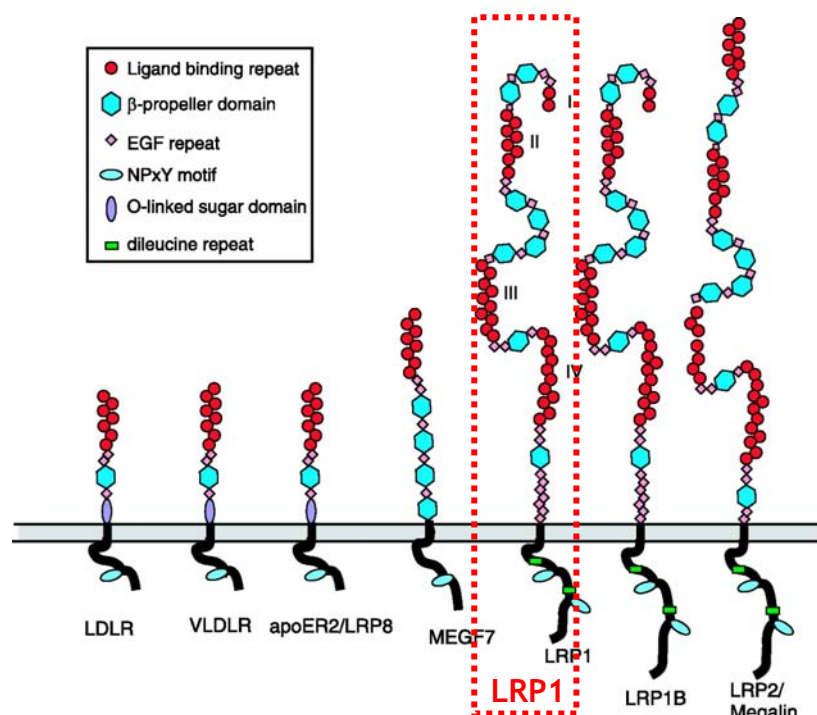


Figure IG-9 : Organisation moléculaire des récepteurs membranaires de la famille des récepteurs aux LDL. (Source : Lillis et al, 2008)

Le LRP1 est une protéine de 4525 résidus, synthétisée dans le réticulum endoplasmique. Lors de son passage dans l'appareil de golgi il subit deux modifications principales, des N-

glycosylations et un clivage protéolytique entre les résidus 3924 et 3925 par la furine [Herz et al., 1990]. Ceci conduit à la formation d'un récepteur membranaire composé d'un domaine extracellulaire de 515 kDa relié de façon non covalente à un domaine de 85 kDa transmembranaire et cytoplasmique. Après clivage, le LRP1 est transporté à la membrane plasmique, il est également localisé dans les endosomes et dans les vésicules de recyclage. Il est exprimé de manière ubiquitaire avec une prédominance au niveau du foie, du cerveau et du placenta [Moestrup et al., 1992].

◇ **Le domaine extracellulaire :**

Le domaine extracellulaire de LRP1 est organisé en différents domaines lui permettant de lier un grand nombre de ligands (Tableau IG-2). Il possède 4 domaines de liaison composés de plusieurs séquences répétitives de 40 acides aminés riches en cystéine ayant une forte analogie avec la fraction 9 du complément. Ces domaines sont séparés les uns des autres par 4 autres domaines composés de séquences répétées homologues à celles du récepteur à l'EGF. Cette organisation lui permet de lier une quarantaine de ligands différents incluant des lipoprotéines, des protéases, des protéines de la matrice extracellulaire, des toxines bactériennes, des facteurs de croissance [Gotthardt et al., 2000] (Tableau IG-2).

Ligands extracellulaires de LRP1	
<p>Protéines impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines</p> <p>Apoprotéine E Chylomicrons LPL, lipase hépatique b-VLDL enrichit en ApoE</p>	<p>Protéines intracellulaires</p> <p>RAP Calreticuline protéine Tat du HIV</p>
<p>Protéases et inhibiteurs de protéases</p> <p>alpha2 Macroglobuline aprotinine PAI 1 Facteur tissulaire, thrombine Facteur de coagulation sanguine (IXa,VIIIa) MMP9, MMP13</p>	<p>Facteurs de croissance</p> <p>PDGFBB, TGF-β CTGF/CCN2</p>
<p>Protéines de la matrice extracellulaire</p> <p>Thrombospondine-1 et2, Fibronectine</p>	<p>Autres</p> <p>Lactoferrin, polymyxinB, Rhinovirus, Ricin, <i>Pseudomonas</i> exotoxin A ...</p>

Tableau IG-2 : Ligands se liant au niveau du domaine extracellulaire de LRP1.

◇ **Le domaine transmembranaire et cytoplasmique :**

Ce domaine cytoplasmique est composé de 100 acides aminés incluant deux motifs leucines et deux motifs NPXY (Asn-Pro-X-Tyr) associés à un domaine transmembranaire de 25 acides aminés. Il peut lier différentes protéines telles que ShcA, disabled et PKC qui l'impliquent dans diverses signalisations intracellulaires [May et al., 2003] (Tableau IG-3).

Ligands intracellulaires de LRP1	
Disabled-1 (Dab1)	JIP-1 JIP-2
Protéine impliquée dans l'activation des kinases Src et dans la migration neuronale	Protéines régulatrices de MAPK et SAPK
ShcA	PKC
Protéine impliquée dans la voie de Ras	protéine kinase régulant la migration, la prolifération, l'apoptose, la différenciation cellulaire
CAPON	FE65, Cbl , ICAP1, OMP25, SEMCAP-1, ...
Protéine régulatrice de la NO synthase	Fonctions divers
AP-1, AP-2	
Endocytose dépendant de la clathrine	

Tableau IG-3 : Ligands se liant au niveau du domaine intracellulaire de LRP1. (Sous chaque protéine se trouve leurs fonctions cellulaires)

2.1.2. Fonctions

2.1.2.1. Protéolyse par endocytose

Le rôle fondamental de LRP1 qui lui a été attribué depuis sa découverte est l'endocytose. Par sa capacité à lier un grand nombre de ligands différents, par son domaine extracellulaire le LRP1 est impliqué dans de nombreux mécanismes de régulation physiologique et pathologique.

◇ **LRP1 dans l'embryogenèse:**

En 1992, des études *in vivo* chez la souris ont montré le rôle important de LRP1 dans les processus d'embryogenèse. En effet l'inactivation de l'expression de LRP1 par recombinaison homologue est létale très tôt au cours de l'embryogenèse. LRP1 internalise le complexe uPA/PAI1 et par le protéasome est dégradé et permet l'implantation et le bon développement embryonnaire de la souris [Herz et al., 1992].

◇ **LRP1 dans l'homéostasie plasmatique:**

La fonction d'épuration de LRP1 au niveau hépatique lui confère un rôle indispensable dans le maintien d'une homéostasie plasmatique normale. En effet l'internalisation et la dégradation des protéines de la coagulation sanguine ou de la fibrinolyse, des lipoprotéines (tels que les

chilomicrons), des enzymes, des inhibiteurs de protéases par le LRP1 contribuent à réguler la concentration plasmatique de ces ligands et ainsi prévenir le développement de pathologies vasculaires.

◇ **LRP1 dans la maladie d'Alzheimer:**

En plus des maladies cardiovasculaires, LRP1 a également montré son importance dans la régulation de maladies neuronales et dans la prévention de la maladie d'Alzheimer. C'est en modulant la dégradation des protéines APP (b-amyloid precursor protein), b-amyloid et FE65 que le LRP1 régule la progression de la maladie d'Alzheimer [Kounnas et al., 1995] [Goto et al., 2002].

◇ **LRP1 dans la cancérogenèse:**

Le LRP1 a montré un rôle nouveau dans la progression tumorale. C'est en internalisant certains facteurs de croissance et des protéines matricielles que LRP1 participe activement au contrôle de la survie et de la prolifération des cellules cancéreuses. Cependant ce rôle anti-tumoral de LRP1 reste controversé car de nouvelles études ont montré la contribution de LRP1 à l'agressivité des cellules cancéreuses et ce en régulant la composition des adhérences focales et l'organisation du cytosquelette [Langlois et al., 2009].

2.1.2.2. Modulateur des voies de signalisation

Bien que le LRP1 a longtemps été considéré comme un simple récepteur d'épuration régulant l'endocytose et le catabolisme de différents ligands, il est désormais établi que cette fonction d'endocytose est intimement associée à divers signaux cellulaires régulant la migration, l'invasion, la prolifération et la survie cellulaire. Par conséquent le LRP1 serait un relais moléculaire potentiel de certaines voies de signalisation cellulaire.

◇ **LRP1 dans la régulation de la réponse inflammatoire**

L'inflammation est un puissant processus de défense immunitaire qui nécessite de nombreux contrôles. L'équipe de J. Herz a identifié un mécanisme de régulation utilisé par LRP1 pour réduire l'expression des gènes induite par le LPS (lipopolysaccharide), un puissant inducteur de l'inflammation. Le LPS induit, par la γ -sécrétase, la protéolyse et la libération du domaine cytoplasmique de LRP1 (ICD-LRP1). Ce clivage permet la migration de l'ICD-LRP1 dans le noyau où il réprime le promoteur de l'interferon- γ . Le mécanisme utilisé par LRP1 nécessite sa liaison à l'IRF3 (Interferon Regulatory Factor-3). Le complexe est alors exporté hors du noyau et dégradé par le protéasome. Ainsi, le rétrocontrôle induit par le domaine intracellulaire de LRP1 et par la γ -sécrétase bloque la réponse inflammatoire induite par le LPS [Zurhove et al., 2008].

◇ **LRP1 dans la régulation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique**

La régulation de la perméabilité cérébro-vasculaire est nécessaire pour une homéostasie cérébrale normale. La dysfonction de la barrière hémato-encéphalique (BHE) est associée à une perméabilité vasculaire anormale et conduit au développement d'œdèmes et d'hypertension intracrânienne dans un certain nombre de troubles neurologiques. Les auteurs ont montré que t-PA (tissue-type plasminogen activator) est un activateur de la perméabilité vasculaire et que son augmentation dans le liquide cérébro-spinal conduit à l'ouverture de la BHE. Cette augmentation est bloquée par des inhibiteurs de LRP1, la protéine RAP (Recepteur-Associated Protein) et les anticorps anti-LRP1. Ainsi les auteurs concluent que la perméabilité vasculaire qui induit l'ouverture de la BHE par t-PA nécessite LRP1. Ils suggèrent que la liaison de t-PA au niveau de LRP1 conduit au clivage d'un substrat non identifié et qui serait responsable de la perméabilité vasculaire [Yepes et al., 2003].

◇ **LRP1 dans la régulation neuronale et la fonction motrice**

Il a été montré, qu'en l'absence de LRP1 dans les neurones différenciés, les souris développent de sévères troubles moteurs incluant une hyperactivité, des tremblements et des dystonies. L'étude de ces souris a révélé un lien entre LRP1 et la neurotransmission. En effet LRP1 co-immunoprécipite avec le récepteur NMDA (N-méthyl-D aspartate) et avec PSD-95 (Postsynaptic Density Protein-95) et participe ainsi à la communication intra-cellulaire et la transmission neuronale dans le système nerveux [May et al., 2004].

◇ **LRP1 dans la régulation de la prolifération cellulaire**

La présence des deux motifs NPXY sur la partie intracellulaire de LRP1 apparaît nécessaire non seulement pour l'initiation de l'endocytose mais semble également pouvoir constituer un support pour la fixation d'adaptateurs moléculaires impliqués dans la modulation de signaux intracellulaires.

En effet LRP1 est capable de moduler la voie de signalisation du PDGFBB et du TGF- β en formant un complexe membranaire avec le PDGFR et le PDGFBB ce qui provoque la phosphorylation du second motif NPXY du domaine cytoplasmique de LRP1 et constitue un point d'ancrage pour les protéines adaptatrices possédant un domaine PTB comme ShcA [Boucher et al., 2003][Boucher et al., 2007].

◇ **LRP1 dans la régulation du métabolisme lipidique**

Une étude récente a mis en évidence un rôle nouveau de LRP1 dans le métabolisme lipidique. Les auteurs ont démontré que le LRP1 en stimulant la voie canonique de Wnt5a prévient l'accumulation du cholestérol dans les adipocytes. Ceci montre que le LRP1 est un régulateur endogène de l'homéostasie du cholestérol au cours de l'adipogenèse [Terrand, Bruban et al., 2009]. D'autre part, nous avons montré que l'absence de LRP1 réduit la synthèse des acides

gras en inhibant l'acetyl-coA carboxylase (ACC) et, durant le programme de différenciation adipocytaire, il réduit la lipolyse des acides gras en réduisant l'expression de « Hormone-sensitive lipase » (HSL) [Terrand et al.,2009].

2.2. Implication de LRP1 dans l'athérosclérose

2.2.1. Rôle du LRP1 dans les CML vasculaires

2.2.1.1. LRP1 contrôle la prolifération des CML : protège contre l'athérosclérose

Les CML jouent un rôle essentiel dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose. Leur prolifération dans l'espace sous-endothélial est rendue possible par la création au sein de la plaque d'un environnement fortement mitogène.

2.2.1.1.1. La voie du PDGF dans l'évolution de la plaque d'athérome

Le PDGFBB est un facteur de croissance hétéro- ou homo-dimérique constitué de deux chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures. On trouve quatre chaînes différentes, PDGF-A, B, C et D codées par quatre gènes différents. Ces isoformes du PDGF exercent leur effet cellulaire par leur liaison à deux récepteurs, le récepteur- α et - β du PDGF, tous deux capables d'activer la migration et la prolifération des CML grâce à l'activité tyrosine kinase de leur domaine cytoplasmique.

Au sein de la lésion athéroscléreuse on retrouve uniquement les chaînes A et B du PDGF pouvant être produit par tous les types cellulaires qui constituent la plaque d'athérome [Raines et al.,2004]. De plus le récepteur du PDGF est surexprimé dans les CML de la plaque d'athérome.

L'implication de PDGFBB dans l'induction et la croissance de la plaque a été mise en évidence dans un modèle de rat ayant subi une lésion de l'endothélium par angioplastie. Cette lésion provoque une augmentation de la quantité de PDGF-BB dans la paroi vasculaire [Abe et al.,1997]. Cette hyperplasie de la paroi vasculaire provoquée par lésions endothéliales est inversée par l'administration d'inhibiteur de la voie du PDGF, le Gleevec [Boucher et al.,2003] ou par des anticorps anti-PDGF [Ferns et al.,1991]. D'autre part l'injection de PDGFBB dans les artères carotides lésées de rats [Jawien et al.,1992] ou la transfection de vecteur d'expression de PDGF-BB dans les artères porcines [Nabel et al.,1993] entraînent la prolifération des CML et un hyperplasie de la paroi vasculaire. PDGF est donc important dans la naissance et/ou la croissance de la plaque d'athérome.

2.2.1.1.2. Contrôle de la voie du PDGF par le LRP1 des CML

De récentes études *in vivo* et *in vitro* ont révélé que le LRP1 est un modulateur de la voie du PDGF.

En effet *in vivo*, chez des souris déficientes en LRP1 au niveau des CML et également déficientes en récepteurs aux LDL (LDLr), soumises à un régime athérogène riche en cholestérol et en acide cholique ont révélé une susceptibilité accrue à développer des lésions athéroscléreuses. Ces lésions se caractérisent par une hyperplasie de la paroi vasculaire due à une activation anormale du récepteur- β du PDGF et de la voie de ERK $\frac{1}{2}$ (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2). De plus cette hyperprolifération des CML est contrecarrée par l'utilisation du Gleevec, un inhibiteur de la voie du PDGF [Boucher et al., 2003].

Cependant le mécanisme moléculaire utilisé par LRP1 pour moduler la voie du PDGF dans les CML n'est que partiellement élucidé.

◇ **LRP1 régule la voie du PDGF en formant un complexe avec le récepteur- β du PDGF**

Des études *in vitro* ont montré que le PDGFBB se lie au niveau du domaine extracellulaire de LRP1 entraînant ainsi, par l'intermédiaire du récepteur- β du PDGF, la phosphorylation de la tyrosine 63 du second motif NPXY présent sur le domaine cytoplasmique du LRP1. Cette phosphorylation permet le recrutement au niveau de LRP1 de protéines adaptatrices possédant un domaine PTB (Phosphotyrosine-binding domain) tel que ShcA qui active la voie de ERK $\frac{1}{2}$. Ce complexe membranaire formé de LRP1/PDGFBB/récepteur- β du PDGF, est alors internalisé par le LRP1 dans des endosomes où il pourra soit poursuivre sa signalisation intracellulaire soit être dégradé par fusion avec des lysosomes [Loukinova et al., 2002][Newton et al., 2005][Boucher et al., 2002].

◇ **LRP1 régule la voie du PDGF en inhibant sa dégradation**

D'autres études ont montré que le LRP1 module la voie du PDGF en contrôlant l'ubiquitination et la dégradation du récepteur au PDGF. En effet, la déficience en LRP1 dans les fibroblastes embryonnaires de souris entraîne, après stimulation par le PDGFBB, une augmentation de la dégradation du complexe récepteur- β du PDGF / PDGFBB et d'une diminution de la phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$. Les auteurs ont ainsi mis en évidence que LRP1, par sa liaison à Cbl (Casitas B-lineage Lymphoma) une ubiquitine E3-ligase, atténue l'accès du récepteur- β du PDGF à la machinerie d'ubiquitination. Par conséquent LRP1 régule la voie du PDGFBB en inhibant la dégradation du récepteur- β du PDGF et en activant son endocytose [Takayama et al., 2005]. Cette explication ne permet pas de comprendre les résultats *in vivo* observés chez les souris déficientes en LRP1 au niveau des CML, ce qui sous entend qu'il existe d'autres voies de signalisation régulées par le LRP1 pour protéger contre l'athérosclérose.

◇ **LRP1 régule la voie du PDGF en modulant la voie du TGF-β**

La voie du TGF-β stimule la croissance des cellules mésangiales en activant l'expression du récepteur-β du PDGF et en induisant l'expression du PDGFBB [Haberstroh et al., 1993]. Le récepteur-β du TGF (TGF-βR-V) a récemment été identifié comme étant identique au LRP1 [Huang et al., 2003]. LRP1/TGF-βR-V peut directement lier TGF-β ou former un hétéro-complexe avec le TGF-βR-I. L'endocytose par LRP1 du TGF-β et du TGF-βR-I va inhiber l'activation de la voie du TGF-β et réduire la prolifération cellulaire [Tseng et al., 2004]. Ces résultats *in vitro* ont été confirmés *in vivo* sur des souris déficientes en LRP1 au niveau des CML et en récepteur aux LDL. Le régime athérogène riche en cholestérol et en acide cholique conduit à la formation de lésions d'athérosclérose accompagnées d'une hyper-activation de la voie du TGF-β et du récepteur-β du PDGF. Le traitement de ces souris par la rosiglitazone, un agoniste de PPARγ et un inhibiteur de la voie du TGF-β réduit considérablement la formation des lésions athéroscléroseuses et l'activation du récepteur-β du PDGF [Boucher et al., 2007] (Figure IG-10).

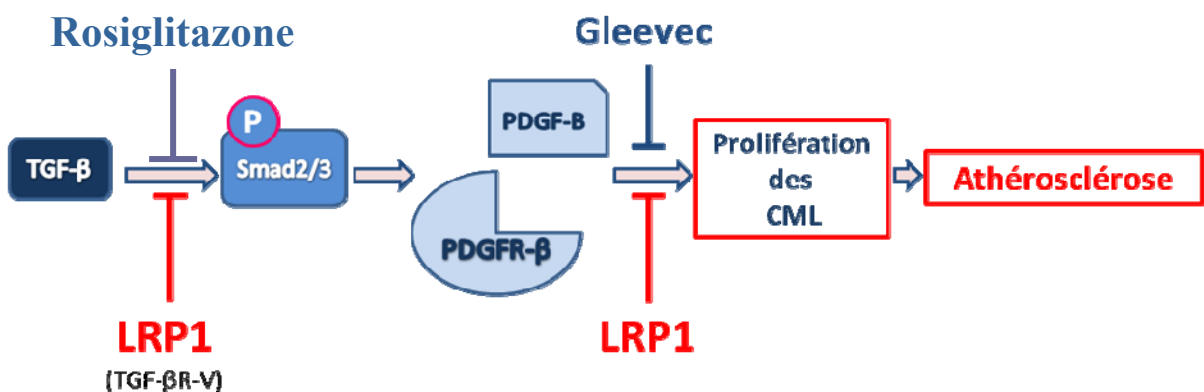


Figure IG-10 : Contrôle de la voie de TGF-β et de PDGF et protection contre l'athérosclérose par le LRP1 des CML. L'absence de LRP1 résulte en l'activation de la voie du TGF-β, à l'expression du PDGFR-β et du PDGF-B, à l'activation de la prolifération des CML et à l'athérosclérose.

2.2.1.2. LRP1 contrôle la différenciation des CML en cellules spumeuses

Une étape clé dans l'athérosclérose est l'accumulation de lipides, principalement des esters de cholestérol provenant des LDL, dans l'espace sous-endothélial [Fuster et al., 1992][Hurt-Camejo et al., 1997]. De plus les LDL natives et les LDL agrégées (ag-LDL) sont des inducteurs de l'accumulation intracellulaire d'esters de cholestérol dans les CML vasculaires [Tertov et al., 1992][Llorente-Corte's et al., 2000, 2002a, 2002b, 2006]. LRP1 est exprimé dans les CML et est capable d'internaliser les ag-LDL ce qui conduit à l'accumulation d'esters de cholestérol et à la formation de gouttelettes lipidiques dans le

cytoplasme des CML. L'inactivation par siRNA de LRP1 dans les CML vasculaires humaines entraîne une diminution de la capture des ag-LDL et une diminution de l'expression de l'ADRP (Adipocyte differentiation related protein) [Llorente-Corte´s et al.,2007b]. L'ADRP est une protéine localisée à la surface des gouttelettes lipidiques [Heid et al.,1998] et qui stimule activement l'accumulation des lipides dans les gouttelettes formées [Imamura et al.,2002]. L'équipe de Badimon a montré que LRP1 induit la capture des ag-LDL et la sur-expression d'ADRP dans les CML vasculaires et contribue ainsi à la formation des cellules spumeuses de la plaque d'athérome [Llorente-Corte´s et al.,2007b].

2.2.2. Rôle de LRP1 hépatique

Le LRP1 présent dans le foie joue un rôle important dans la clairance de nombreux éléments sanguins tels que les lipoprotéines riches en apoprotéine E et les lipases et donc dans le maintien de l'homéostasie plasmatique en lipoprotéines.

Ce processus de dégradation des lipoprotéines rémanentes se fait au niveau hépatique et nécessite la reconnaissance de l'apoprotéine E par les récepteurs de la famille des récepteurs aux LDL. Ceci a été montré *in vivo* par Willnow et al. qui a croisé des souris déficientes en RAP qui expriment très peu de LRP1 au niveau hépatique, avec des souris déficientes en récepteurs aux LDL [Willnow et al., 1995]. Ces souris présentaient une augmentation de lipoprotéines rémanentes tels que les chylomicrons, les IDL les VLDL, dans la circulation sanguine. Ce résultat a été confirmé par deux autres expériences *in vivo*. La première utilisait des souris déficientes en LDLr infectées par un adénovirus codant pour la protéine RAP, un inhibiteur de LRP1 [Willnow et al., 1994]. La seconde expérience utilisait des souris déficientes en LDLr et dont l'expression en LRP1 était inactivée spécifiquement au niveau hépatique par un système Cre-lox inducible par l'injection d'acide Polyinosinique-polycytidylique [Rohlmann et al., 1998]. Le LRP1 hépatique contribue au maintien d'un taux normal de lipoprotéines circulant et ainsi protège contre l'athérosclérose.

D'autre part, le LRP1 hépatique endocyte d'autres éléments circulants pro- ou anti-athérogènes et contribue à la régulation de la pathologie. Les souris déficientes en récepteurs aux LDL et en ApoE et dont le LRP1 a été excisé spécifiquement au niveau hépatique développent deux fois plus de lésions d'athérosclérose que les souris contrôles. Le LRP1 hépatique protège contre l'athérosclérose et ce indépendamment de la concentration de lipoprotéines circulantes. Cette effet protecteur du LRP1 hépatique n'est pas complètement élucidé mais les auteurs pensent que le LRP1 endocyte d'autres ligands pro-athérogéniques tels que le facteur FVIII de la coagulation sanguine ou la lipoprotéine lipase [Espirito Santo et al., 2004].

2.2.3. Rôle de LRP1 dans les macrophages

Les macrophages sont des acteurs importants dans le développement de l'athérosclérose. Le LRP1 est fortement exprimé dans les lésions d'athérosclérose et dans les macrophages lorsqu'ils deviennent des cellules spumeuses [Watanabe et al., 1994]. Pour comprendre l'implication du LRP1 exprimé chez le macrophage dans la pathogénie de l'athérosclérose, deux équipes ont généré des souris déficientes en LRP1.

La première équipe a utilisé des souris déficientes en récepteurs aux LDL et en ApoE et a inactivé l'expression de LRP1 spécifiquement au niveau des macrophages par le système Cre-lox. Ces souris de 18 semaines ont développé 1.8 fois plus d'athérome que les souris sauvages. Le profil lipidique de ces souris n'a pas été modifié et le mécanisme utilisé par le LRP1 n'a pas été élucidé [Hu et al., 2006]. L'équipe de Overton a utilisé des souris femelles irradiées déficientes en récepteurs aux LDLr et ayant subi une transplantation de la moelle osseuse provenant de souris dont le LRP1 avait été excisé des macrophages (M Φ LRP1-LDLr^{-/-}). Ces souris M Φ LRP1-LDLr^{-/-}, qui ont été soumises à un régime de type « western », ont présenté une susceptibilité accrue à développer des lésions athéroscléreuses (environ 40% de plus que les souris transplantées avec de la moelle osseuse sauvage). Ceci était associé à une diminution de la capture des VLDL par les macrophages, à une augmentation de la synthèse et la sécrétion de MMP-9, une enzyme qui déstabilise la plaque d'athérome. De plus l'absence de LRP1 dans les macrophages a initié une réponse inflammatoire en augmentant la synthèse et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que MCP-1 et TNF- α [Overton et al., 2007]. Cependant ces expériences sont controversées. En effet il a été montré que dans les macrophages, le LRP1 est capable d'internaliser les ag-LDL (LDL agrégés) [Llorente-Cortés et al., 2007a][Sakr et al., 2001][Morita et al., 2004]. En accord avec ces études, l'équipe de Badimon montre que l'inactivation par siRNA de LRP1 dans les macrophages prévient complètement la capture des ag-LDL et la surexpression de ADRP (adipocyte differentiation-related protein), une protéine sur-exprimée dans la phase de différenciation adipocytaire [Llorente-Cortés et al., 2007b]. De plus l'analyse histologique d'aortes humaines possédant des plaques d'athérome avancées enrichies en lipides confirme que l'ADRP est co-localisée avec les macrophages de la plaque d'athérome. Ainsi les auteurs ont suggéré que le LRP1 des macrophages est responsable de l'induction de l'expression de l'ADRP et joue un rôle important dans la formation des cellules spumeuses vasculaires [Llorente-Cortés et al., 2007b].

2.2.4. Rôle de LRP1 dans l'oxydation des LDL

Après pénétration dans la paroi vasculaire, les LDL subissent une oxydation. Cette transformation constitue une étape majeure et probablement indispensable au développement de la plaque d'athérome. En effet, les LDL oxydées perdent leur aptitude à se

lier à leur récepteur spécifique qui constitue la principale voie d'épuration des LDL natives. Seuls les macrophages par l'intermédiaire de récepteurs « éboueurs » pourront capter ces LDL oxydées et ainsi former des cellules spumeuses. Les modifications de l'oxydation des LDL peuvent être induites par différents processus incluant l'action d'une lipoxigénase. La 12/15-lipoxigénase est une enzyme qui induit l'oxydation des acides gras insaturés libres et présents dans un complexe comme les esters de cholestérol des LDL. Les souris déficientes en 12/15-lipoxigénase et en récepteur aux LDL [George et al., 2001] ou en ApoE [Cyrus et al., 1999] ne développent que très peu de lésions athéroscléreuses. En effet l'initiation et la progression de la pathologie sont retardées par rapport à celles des souris sauvages. Cependant le mécanisme d'oxygénation des LDL extracellulaires par la 12/15-lipoxigénase intracellulaire n'est pas encore connu mais est rendu possible par l'intermédiaire de LRP1. L'incubation de macrophages avec un anticorps dirigé contre le LRP1 inhibe de 56% l'oxydation des LDL [Xu et al., 2001]. Ceci a été confirmé sur des macrophages surexprimant la 12/15-lipoxigénase et incubés avec soit la protéine RAP, un inhibiteur de LRP1, soit avec un siRNA dirigé contre le LRP1. Un des mécanismes possibles serait le transport de la 12/15-lipoxigénase par le LRP1 du compartiment cytoplasmique vers le compartiment membranaire où la 12/15-lipoxigénase pourra oxyder ses substrats [Zhu et al., 2003].

Le LRP1 contribue à l'oxygénation des LDL dans la paroi vasculaire et a donc un rôle inverse à celui décrit jusqu'à présent qui est antiathérogène.

Grâce à ses fonctions diverses et variées et sa localisation ubiquitaire, le LRP1 semble être indispensable dans de nombreuses régulations physiologiques. Sa présence semble donc être nécessaire pour prévenir des dysfonctions pouvant aboutir à une pathologie. Ceci met donc le LRP1 au centre de nombreuses perspectives thérapeutiques.

Le LRP1 des CML de la paroi vasculaire protège contre l'athérosclérose en régulant la prolifération et la différenciation des CML. Cependant les mécanismes moléculaires mis en jeu par LRP1 ne sont que partiellement élucidés.

Mon projet de thèse consiste à comprendre le mécanisme d'action utilisé par LRP1 pour réguler les processus de différenciation et de prolifération des CML au cours du développement de l'athérosclérose.

Mécanismes moléculaires utilisés par LRP1 pour contrôler la différenciation et la prolifération des CML dans l'Athérosclérose

Partie 1 :

Régulation de la différenciation cellulaire et de la calcification vasculaire : Implication de LRP1 et de PPAR γ

Partie 1 :

Introduction

1. Introduction

Le phénomène de différenciation cellulaire constitue une étape importante dans l'évolution de l'athérosclérose. Ainsi, nous nous sommes principalement intéressés à l'implication de LRP1 et de PPAR γ dans l'adipogenèse et la chondrogenèse.

1.1. La différenciation adipocytaire

1.1.1. Généralités

L'adipogenèse est l'ensemble des processus qui aboutissent à la formation du tissu adipeux. On distingue deux types de tissu adipeux. Le tissu adipeux blanc, il constitue la quasi-totalité du tissu adipeux chez l'adulte et est spécialisé dans la mise en réserve des graisses principalement sous forme de triglycérides. Il joue ainsi un rôle central dans le contrôle de l'équilibre énergétique de l'organisme. Le tissu adipeux blanc apparaît vers la fin de la vie foetale, essentiellement dans le tissu conjonctif sous-cutané et peut se développer tout au long de la vie adulte [Gesta et al.,2007]. Le tissu adipeux brun a un rôle thermogène qui protège le nouveau-né contre les agressions thermiques. Ce tissu se développe au cours de l'embryogenèse avant la graisse blanche et disparaît quasi-totalement chez l'adulte. Il est localisé au niveau du cou, autour des reins et de l'artère subclavière, en intercostale et dans le creux des aisselles [Cannon et al.,2004][Farmer et al., 2008].

La différenciation adipocytaire est un processus séquentiel qui débute par une phase de détermination cellulaire des cellules souches mésenchymateuses. Les pré-adipocytes ainsi formés expriment les gènes précoces de l'adipogenèse, parmi lesquels ceux des facteurs de transcription « *CAAT/Enhancer Binding Protein* » (C/EBP) β et δ (Figure I-1). Les pré-adipocytes prolifèrent et atteignent un stade de confluence marqué par un arrêt de la multiplication cellulaire. Cette interruption de croissance cellulaire est requise pour l'engagement vers la différenciation adipocytaire terminale. Cette dernière étape conduit à la formation des adipocytes, cellules de morphologie plus grosse que les pré-adipocytes et qui accumulent des lipides dans leur cytoplasme sous forme de gouttelettes pour les cellules qui vont former le tissu adipeux brun, ou d'une vacuole pour les cellules qui vont former le tissu adipeux blanc. Elles sont alors capables de synthétiser des triglycérides et de les hydrolyser en réponse à la stimulation hormonale. L'étape de différenciation est induite par l'expression de PPAR γ et de C/EBP α , principaux régulateurs de l'adipogenèse (Figure I-1). Par ailleurs, une régulation positive et réciproque entre ces deux facteurs transcriptionnels permet le maintien de leur expression et participe vraisemblablement au maintien de l'état différencié des adipocytes [Wu et al.,1999].

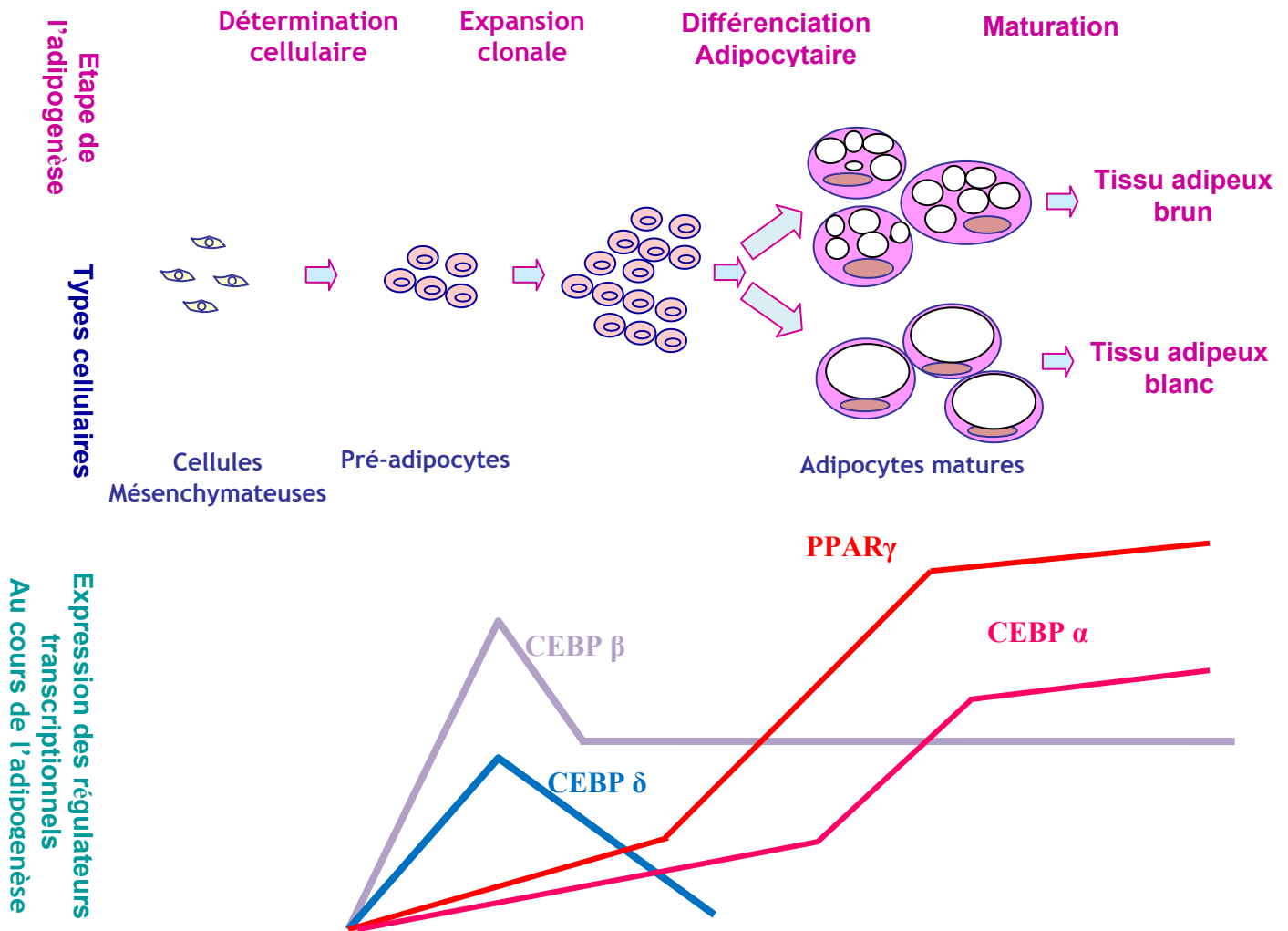


Figure I-1 : Etapes de l'adipogenèse. Evolution morphologique des cellules et profil d'expression des facteurs de transcription au cours de la différenciation adipocytaire

1.1.2. Régulateurs de l'adipogenèse

1.1.2.1. Peroxisome proliferator-activated receptor : PPAR

Les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxisomes (PPAR) appartiennent à la grande famille des récepteurs nucléaires d'hormones. Les PPARs existent sous trois isotypes : PPARalpha (α), PPARbeta (β) et PPARgamma (γ), initialement décrits chez le xénope, ils ont également été identifiés dans différentes espèces dont la souris, le rat, le hamster et l'homme. Chacun des isotypes est codé par un gène différent, mais présente un haut degré de similarité avec les deux autres isotypes [Desvergne et al., 1999].

La répartition tissulaire des différents isotypes de PPAR est différente, ce qui contribue à la spécificité d'action de chacun des PPARs.

◇ PPAR α est principalement exprimé dans le foie, le cœur, le rein, le tissu adipeux brun et, dans une moindre mesure, dans le petit intestin, le muscle squelettique, le thymus et les testicules. Il est principalement impliqué dans le métabolisme des acides gras.

◇ PPAR β ou PPAR δ a une expression ubiquitaire, d'intensité variable. Chez l'homme, PPAR β/δ est présent à de faibles niveaux dans tous les tissus avec une expression plus élevée dans le colon. Chez les rongeurs, son expression est particulièrement élevée tout au long de l'embryogénèse, suggérant un rôle de PPAR β/δ dans le développement. PPAR β/δ a également été mis en évidence dans les cardiomyocytes et contribue à l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique cardiaque [Gilde et al.,2003]. Il est également impliqué dans le métabolisme lipidique au niveau cérébral [Basu-Modak et al.,1999] et au niveau du muscle squelettique [Gaudel et al.,2007], dans la prolifération des pré-adipocytes et dans l'adipogenèse induite par les acides gras [Bastie et al.,2000][Jehl-Pietri et al.,2000][Hansen et al.,2001]. PPAR β/δ a un rôle anti-inflammatoire [Piqueras et al.,2009]. De plus, il semblerait que l'expression de PPAR β/δ soit souvent élevée dans des zones de ralentissement de prolifération associée à un engagement vers la différenciation cellulaire [Kim et al.,2006].

◇ PPAR γ a une expression beaucoup plus restreinte, principalement située dans le tissu adipeux et le colon, dans une moindre proportion dans le foie, l'intestin grêle, les reins, le cerveau, les testicules, le muscle squelettique et le pancréas [Auboeuf et al.,1997]. Néanmoins, d'autres tissus comme les pneumocytes, la rétine, le système immunitaire, et les cellules du muscle lisse de l'aorte expriment PPAR γ . Il joue un rôle central dans l'adaptation de la réponse métabolique en régulant la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides [Schoonjans et al., 1996] et dans l'homéostasie glucidique [Picard et al.,2002]. Il est également impliqué dans de nombreux phénomènes inflammatoires [Delerive et al.,2001]. Par conséquent de nombreuses études ont établi l'importance du récepteur PPAR γ dans la différenciation adipocytaire.

- Mécanisme d'action

Les PPAR agissent au niveau moléculaire en modulant la transcription des gènes. D'un point de vue structural, ils sont constitués de deux domaines majeurs, un domaine de fixation à l'ADN et un domaine d'interaction avec le ligand. Les PPAR se fixent sur une région spécifique de l'ADN située dans la région promotrice des gènes cibles et appelée élément de réponse aux proliférateurs de peroxisomes (PPRE). Cette région est constituée de deux demi-sites de séquence AGGTCA arrangés en répétition directe et espacés d'un nucléotide (DR-1, direct repeat-1) [Ijpenberg et al.,1997] (Figure I-2). L'activation du récepteur par son ligand se traduit par l'association entre PPAR et un récepteur de l'acide rétinoïque (le 9-cis acid X

receptor, RXR). Le dimère ainsi formé se lie au PPRE et provoque l'activation de la transcription du gène cible.

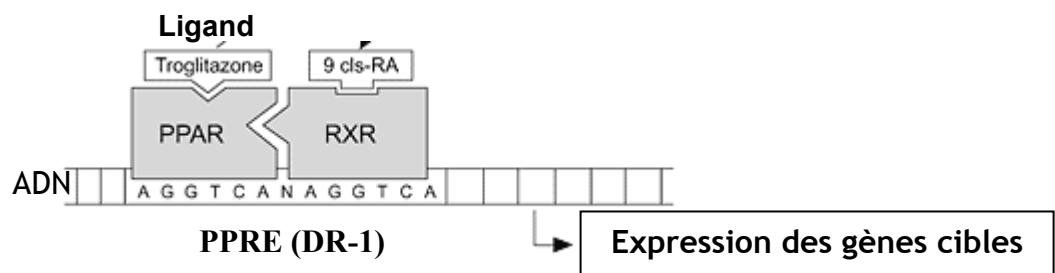


Figure I- 2 : Fixation de l'hétéro-dimère PPAR γ /RXR activé sur la région promotrice PPRE des gènes cibles (inspirée de [Guan et al.,2002]) : régulateur de l'expression de gène

Les trois isotypes se distinguent par leur distribution tissulaire, leur affinité pour différents PPRE ainsi que par la nature de leurs ligands, conférant aux trois PPARs des rôles bien distincts *in vivo*.

- PPAR γ et l'adipogenèse

PPAR γ est exprimé dans le tissu adipeux mais également présent dans la paroi vasculaire et dans la plaque d'athérome principalement dans les macrophages, les CML et les cellules endothéliales qui la composent [Reiss et al.,2006]. On distingue deux isoformes principales de PPAR γ , PPAR γ 1 et PPAR γ 2. Elles sont issues d'un même gène par épissage alternatif et par utilisation de sites distincts d'initiation de la transcription. L'expression de PPAR γ 2 est spécifique du tissu adipeux et son induction précède celle de CEBP α puis se maintient pendant toute la phase de différenciation adipocytaire (Figure I-1). Les isoformes de PPAR γ sont activées par liaison de ligands endogènes que sont les acides gras (acide linoléique et arachidonique) et les dérivés d'acides gras (les eicosanoïdes tels que la 15-desoxy- Δ 12,14 prostaglandine-J2 et des composants des LDL oxydées tel que l'acide 9-,13-hydroxyoctadécadiénoïque) [Kliwer et al., 1997][Kliwer et al.,1995]. Plusieurs ligands synthétiques de forte affinité ont été élaborés pour PPAR γ . Ces ligands appartiennent à la classe des thiazolidinediones ou glitazones et sont utilisés dans le traitement du diabète de type 2 (Rosiglitazone ; Avandia®, Pioglytazone; Actos®).

Il est maintenant clairement établi que PPAR γ est le principal régulateur de l'adipogenèse. De nombreuses études sur des lignées cellulaires nous ont permis de comprendre la régulation transcriptionnelle au cours du développement du tissu adipeux. L'expression de PPAR γ est induite durant la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes et est largement présente dans les tissus adipeux brun et blanc [Tontonoz et al.,1994a][Sears et al.,1996]. L'expression ectopique de PPAR γ dans les fibroblastes induit l'expression de gènes spécifiques des

adipocytes tels que « *l'adipocyte protein 2* » (aP2), « *Fatty acid transporter* » (FAT/CD36), la lipoprotéine lipase (LPL), l'acylCoA synthétase (ACS) et « *Fatty acid binding protein* » (FABP) et conduit à des changements morphologiques caractérisés par une accumulation de gouttelettes principalement formées de triglycérides dans le cytoplasme de la cellule [Tontonoz et al.,1994b]. Le rôle de PPAR γ dans l'adipogenèse a été confirmé plus tard par une approche de perte de fonction. En effet, la différenciation adipocytaire est bloquée dans les pré-adipocytes après traitement par un antagoniste de PPAR γ (GW0072) ou par l'expression d'un dominant négatif du récepteur [Oberfield et al.,1999][Gurnell et al.,2000]. Enfin, l'inactivation du gène PPAR γ chez la souris est létale très tôt au cours de l'embryogenèse, causé principalement par des dysfonctions dans le développement du tissu adipeux, du placenta et du coeur, empêchant ainsi l'étude de la mise en place du tissu adipeux chez la souris [Barak et al.,1999]. Rosen et al. observent que les cellules déficientes en PPAR γ sont incapables de former des adipocytes chez les souris chimères PPAR γ $+/+$ ~ PPAR γ $-/-$ [Rosen et al.,1999]. De plus la suppression de la fonction de transactivation de PPAR γ , par inhibition de sa liaison au niveau de l'élément de réponse de l'ADN, détourne les cellules mésenchymateuses de la différenciation adipocytaire pour les engager vers la différenciation ostéocytaire [Takada et al.,2007]. PPAR γ est indispensable à la formation des adipocytes, cependant le développement de ce processus implique d'autres facteurs de transcription et une succession d'évènements antérieurs à l'implication de PPAR γ .

1.1.2.2. *CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBP)*

Les C/EBP sont des facteurs de transcription de la famille des *basic-leucine zipper* qui modulent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique et qui participent au contrôle de la différenciation adipocytaire. Ils possèdent un domaine de liaison à l'ADN, qui se fixe au niveau des séquences CCAAT présentes dans les régions régulatrices des gènes cibles, et un domaine à glissière de leucines qui leur permet de réaliser une homo- ou une hétéro-dimérisation avec d'autres membres de la famille des C/EBP. Les isotypes C/EBP β et δ sont induits au stade pré-adipocytaire alors que C/EBP α est induit au début de la phase de différenciation terminale. De nombreuses études de gain et de perte de fonction ont conduit à modéliser l'action de C/EBP β et δ dans le contrôle de l'expression de PPAR γ et de C/EBP α [Tanaka et al.,1997][Wang et al.,1995][Mandrup et al.,1997]. Ainsi, l'expression forcée des C/EBP β et δ dans les fibroblastes provoque une différenciation adipocytaire avec l'expression de PPAR γ . De plus, un élément fonctionnel de réponse aux C/EBP a été mis en évidence dans le promoteur du gène PPAR γ de souris [Clarke et al.,1997]. Cet élément fixe les différents C/EBPs, y compris l'isoforme tardive C/EBP α . Cette dernière observation suggère une relation possible entre C/EBP α et PPAR γ dans les cellules pleinement différenciées. On

connaît encore mal les signaux extracellulaires qui activent l'expression ou la fonction de C/EBP β et δ . Toutefois, il a été suggéré que l'activité de ces facteurs est contrôlée par les glucocorticoïdes et par l'élévation de la concentration en AMPc, deux des signaux adipogéniques identifiés depuis plusieurs années [Yeh et al., 1995].

1.1.2.3. Wnt/ β -catenin

Les protéines wingless (Wnt) sont des protéines sécrétées dont la famille est composée de 19 types différents pouvant réguler une variété de processus biologiques lors de l'embryogenèse. Les Wnt se lient à un complexe de récepteurs membranaires composés d'un récepteur frizzled couplé à une protéine G et un co-récepteur de la famille des récepteurs aux LDL, le LRP 5/6. Cette liaison active différentes voies de signalisation intracellulaire, la voie canonique qui implique la β -catenin et la voie non canonique utilisant d'autres messagers intracellulaires comme le calcium, JNK ou Rho.

- La voie canonique de Wnt

En l'absence de Wnt, la β -catenin est recrutée au sein d'un complexe cytoplasmique composé d'Axin et de « *l'Adenomatous Polyposis Coli* » (APC) ce qui permet la phosphorylation de la β -catenin par la « *Glycogen Synthase Kinase-3* » (GSK-3 β) [Miller et al.,1996]. Cette phosphorylation induit l'interaction de la β -catenin avec la « *β -transducin-repeat containing protein* » (β -TrCP) ce qui entraîne l'ubiquitination et la dégradation de la β -catenin par le protéasome [Aberle et al.,1997]. Lorsque les cellules sont stimulées par Wnt, la voie de la dégradation est inhibée et ainsi la β -catenin peut s'accumuler dans le cytoplasme et migrer dans le noyau. Dans le noyau la β -catenin interagit avec le facteur de transcription « *T-cell factor/Lymphoid enhanced factor* » (LEF/TCF) et active la transcription des gènes cibles de Wnt [van de Wetering et al.,1997].

Pour réguler la voie canonique des protéines Wnt il existe différents types d'inhibiteurs utilisant chacun une stratégie différente pour contrôler la signalisation de la β -catenin.

Ils peuvent bloquer l'accès de Wnt à ses récepteurs membranaires en se fixant directement sur le récepteur frizzled ou sur le co-récepteur LRP5/6. Les inhibiteurs de la famille des Dickkopfs (Dkk), SOST et « *Wnt-1- induced secreted protein* » (WIS) se fixent sur LRP5/6 et les protéines « *secreted frizzled-related protein* » (SFRP) sur frizzled. SFRP et « *Wnt inhibitory factor 1* » (WIF-1) peuvent également se lier aux Wnt, les séquestrer à distance de leurs récepteurs. Enfin les inhibiteurs intracellulaires de la famille des protéines Chibby inhibent la voie de Wnt en bloquant l'interaction de la β -catenin avec le facteur de transcription LEF/TCF (Figure I-3).

- La voie non canonique de Wnt

La voie non canonique est plus complexe. Elle fonctionne de manière indépendante de la β -catenin et son activation nécessite la liaison de Wnt à son récepteur frizzled mais pas au co-récepteur LRP 5/6. Les mécanismes potentiels de la voie non canonique sont divers, incluant la signalisation par un flux de calcium [Kühl et al., 2004] [Kohn et al., 2005], par JNK [Boutros et al., 1998], par Rho [Zhu et al., 2006] et par polarisation cellulaire [Barrow et al., 2006].

En effet, certaines protéines de la famille des Wnt telles que Wnt 4, Wnt 11 et Wnt5a sont capables d'activer après leur liaison au récepteur frizzled la voie non canonique des Wnt entraînant la libération de calcium intracellulaire. Ce calcium est capable d'activer des enzymes sensibles au calcium comme la protéine kinase C (PKC), la protéine kinase « *calcium-calmoduline dependant kinase II* » (CamK II) ou la calcineurine (CaCN). L'activation de cette voie Wnt/calcium est impliquée dans la régulation de la migration cellulaire, le développement cardiaque et joue un rôle dans la suppression des tumeurs [Kühl et al., 2004]. De plus certains Frz (Frz-2) peuvent induire l'activation d'une protéine G hétéro-trimérique qui active la phospholipase C- β (PLC β) ou la phosphodiesterase 6 (qui induit une réduction de cGMP) [Ahumada et al.2002] et entraîne également la libération de calcium intracellulaire [Wang et al., 2003].

Une seconde voie non canonique utilise Frz et Dsh (Disheveled) et associée à d'autres messagers intracellulaires régule la polarité cellulaire (PCP, Planar Cell Polarity). Dsh joue un rôle important dans cette voie mais dans ce cas elle n'entraîne pas, comme dans la voie canonique, l'activation de GSK-3 β . Elle induit en revanche l'activation d'une petite GTPase Rho, d'une protéine G hétéro-trimérique et dans certains cas de JNK (c-Jun N-terminal Kinase). Chez la drosophile et chez les vertébrés, l'activation de Rho GTPase induit des changements dans l'organisation du cytosquelette ce qui permet d'induire une organisation précise des ommatidies de l'œil de la drosophiles et une polarité planaire précise des poils épidermiques des ailes chez la drosophile [Fanto et al., 2004][Mlodzik,2002](Figure I-3).

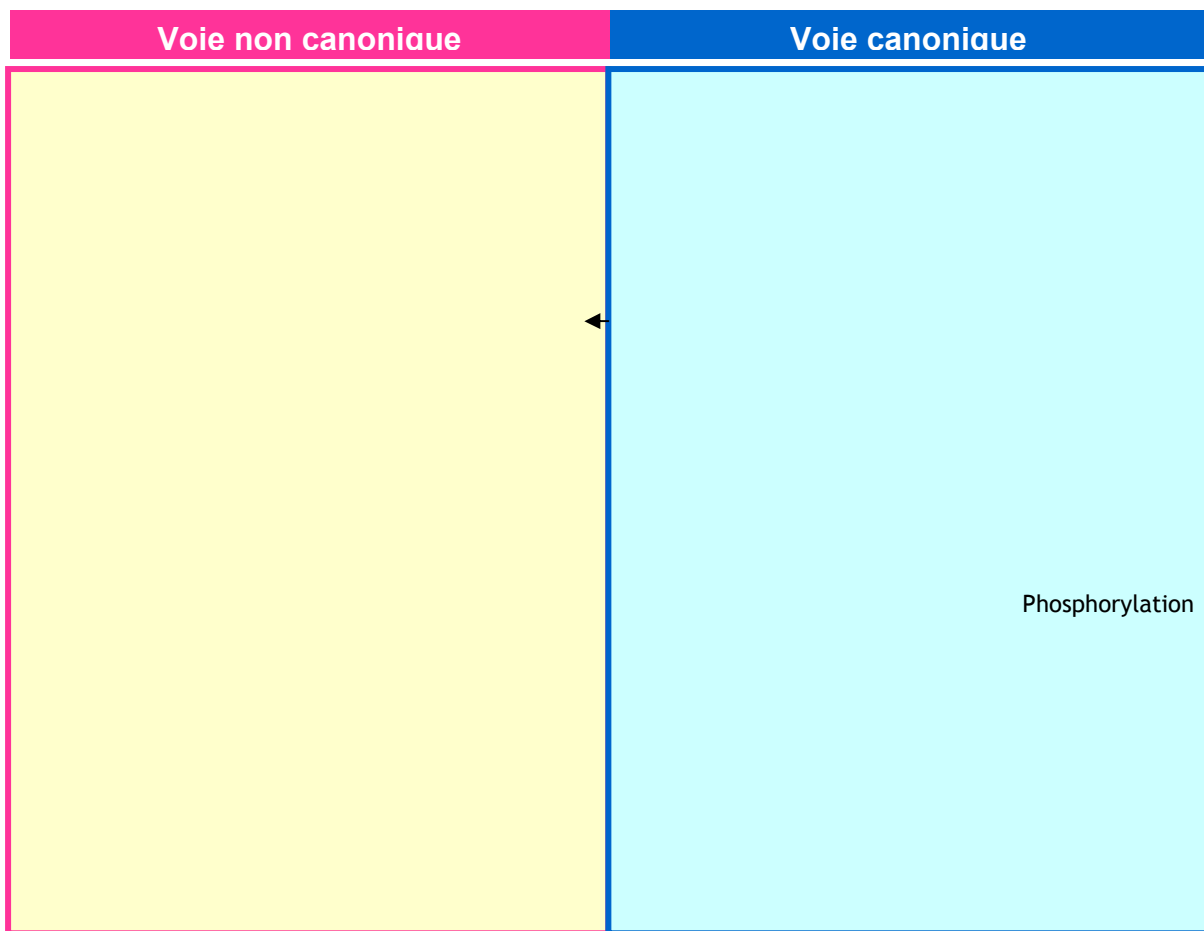


Figure I-3 : Différentes voies de signalisation de Wnt (d'après [Chun et al. 2008] modifié)

- Wnt/ β -catenin et l'adipogenèse

Les facteurs Wnt constituent une famille de protéines sécrétées qui contrôlent la croissance et la détermination cellulaire. Le groupe de MacDougald a démontré pour la première fois que l'activation de la voie des Wnt dans les pré-adipocytes 3T3-L1 bloque leur différenciation en adipocytes [Ross et al.,2000]. De plus l'inhibition de l'activité de la β -catenin induit la différenciation adipocytaire *in vitro* et conduit à la trans-différenciation des myocytes en adipocytes. Ceci indique que la voie des Wnt dans les cellules mésenchymateuses s'oppose au développement adipocytaire. Ces observations peuvent entre autre s'expliquer par la relation existant entre Wnt/ β -catenin et PPAR γ . En effet, l'activation de la voie canonique de Wnt par Wnt1 ou Wnt10b dans les pré-adipocytes bloque l'adipogenèse en inhibant l'expression des gènes cibles de PPAR γ . Inversement, l'activation de PPAR γ conduit à la dégradation de la β -catenin [Moldes et al.,2003]. Le mécanisme qui contrôle l'équilibre entre l'activité de PPAR γ et l'expression de la β -catenin et qui détermine l'engagement des pré-adipocytes est régulé par GSK-3 β [Liu et al.,2004] et par l'interaction directe entre PPAR γ et la β -catenin [Liu et al.,2006]. PPAR γ en interagissant, par son domaine homologue au domaine CBD (Catenin Binding Domaine) du TCF/LEF, avec la β -catenin induit la dégradation de la β -catenin et la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes [Liu et al.,2006].

Un des membres de la famille des Wnt, Wnt10b, a été impliqué directement dans la régulation de l'adipogenèse. Elle est sécrétée par les pré-adipocytes, stabilise la β -catenin et prévient la différenciation des 3T3-L1 en adipocytes [Ross et al. 2000]. *In vivo* la surexpression de Wnt10b dans les adipocytes murins bloque la formation des tissus adipeux blanc et brun [Longo et al.,2004]. De plus les souris surexprimant Wnt10b dans les adipocytes ne développent pas d'obésité lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en graisse [Longo et al.,2004]. Cette résistance à l'obésité a également été mise en évidence chez les souris ob/ob surexprimant Wnt10b [Wright et al.,2007]. Le mécanisme d'action utilisé par Wnt10b pour inhiber l'adipogenèse passe par la suppression de l'expression de PPAR γ et de C/EBP α [Ross et al. 2000][Kang et al.,2007].

D'autre part, Wnt5a, par la voie non canonique, active une protéine kinase NLK (Nemo-like kinase) qui vient phosphoryler une histone méthyl-transférase, la SETDB1 (Set domain bifurcated 1). Cette phosphorylation entraîne la formation d'un complexe de co-répresseurs qui inactive, par méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, la fonction de transactivation de PPAR γ [Takada et al.,2007]. Les auteurs suggèrent que l'activation de la voie non canonique de Wnt5a réprime la fonction de PPAR γ par inactivation de la chromatine et conduit les cellules mésenchymateuses vers une lignée ostéoblastique [Takada et al.,2007].

1.1.2.4. Secreted protein, acidic and rich in cyteine: SPARC

SPARC est une glycoprotéine sécrétée de 42 kDa appartenant aux protéines de la matrice cellulaire. SPARC est également nommée « ostéonectine » pour son implication majeure dans la matrice osseuse [Termine et al.1981] et « BM-40 » pour son rôle dans l'architecture membranaire des tumeurs [Mann et al., 1987].

SPARC a été décrite comme étant une protéine impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires. Elle régule la prolifération et l'adhésion cellulaire, l'expression des protéines de la matrice extracellulaire et la production ou l'activité des facteurs de croissance. SPARC joue également un rôle dans la détermination des cellules mésenchymateuses.

SPARC est produite par les adipocytes et son expression est augmentée chez les souris obèses [Tartare-Deckert et al. 2001]. Cependant le rôle de SPARC dans les adipocytes des animaux obèses n'est à ce jour pas encore élucidé. Les auteurs suggèrent que l'augmentation de SPARC au cours de l'obésité est nécessaire pour la formation de néo-vaisseaux indispensables au développement du tissu adipeux et pour le remodelage de la matrice extracellulaire [Tartare-Deckert et al. 2001].

Cependant l'inactivation de l'expression de SPARC chez la souris a révélé une accumulation anormale de graisse sous-cutanée, associée à une augmentation du nombre et de la taille des adipocytes [Bradshaw et al.,2003]. En accord avec ces observations, *in vitro*, l'inactivation de SPARC dans les cellules de la moelle osseuse active l'expression de CEBP δ et de l'adipsine et

entraîne une différenciation des cellules en adipocytes plutôt qu'en une autre lignée cellulaire [Delany et al.,2003]. Cependant le mécanisme moléculaire utilisé par SPARC pour inhiber l'adipogenèse n'est pas totalement compris. *In vitro* l'équipe de H. Sage a montré que SPARC inhibe l'adipogenèse en réprimant l'expression des facteurs de transcription (C/EBP β , C/EBP α et PPAR γ) et des protéines de la MEC (matrice extracellulaire) indispensables à l'adipogenèse [Nie et al.,2009]. De plus SPARC est capable d'inhiber la dégradation de la β -catenin, d'activer sa translocation nucléaire et ainsi d'activer la voie des Wnt, inhibitrice de l'adipogenèse [Nie et al.,2009]. Cependant le mécanisme utilisé par SPARC pour moduler l'activation de la voie canonique des Wnt n'est pas connu. D'autres protagonistes moléculaires pourraient agir avec SPARC dans la régulation de l'adipogenèse. Par conséquent SPARC inhibe l'adipogenèse *in vitro* et *in vivo*. De plus nous pouvons spéculer que l'augmentation de l'expression de SPARC au cours de l'obésité pourrait être un moyen utilisé par l'organisme pour bloquer la formation des adipocytes chez les animaux obèses.

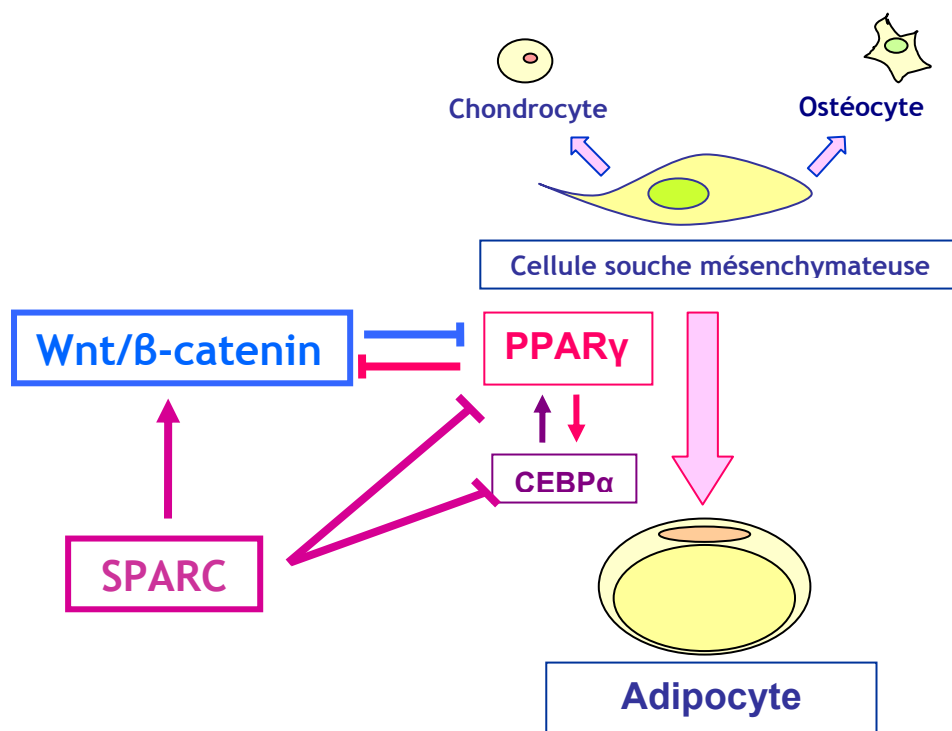


Figure I-4 : Régulation de l'adipogenèse.

1.1.2.5. Autres facteurs de régulation de l'adipogenèse

Il existe un grand nombre d'autres facteurs, en plus de ceux discutés précédemment, impliqués dans l'évolution ou la répression de l'adipogenèse.

- Les protéines du cycle cellulaire ont un rôle important lors de l'expansion clonale des pré-adipocytes. Parmi ces protéines la cycline D [Sarruf et al.,2005][Fu et al.,2005], les kinases CdK 4/6 (cyclin-dependent kinase 4 /6) [Sarruf et al.,2005][Abella et al., 2005] et le

facteur E2F [Fajas et al.,2002][Porse et al.,2001] permettent la transition de la phase G1 vers la phase de synthèse d'ADN (S).

- Les protéines KLF (Krüppel-like Factor) regroupent un grand nombre de facteurs de transcription, également impliqués dans l'adipogenèse. KLF4 est un facteur précoce et active, dans les 24 premières heures de la différenciation, l'expression de C/EBPβ [Birsoy et al.,2008]. KLF 5 et KLF 15 activent l'expression de PPARγ2 [Mori et al.,2005][Oishi et al.,2005].
- Les protéines de l'horloge biologique qui régulent le rythme circadien ont également été impliquées dans les phénomènes de différenciation adipocytaire. Parmi elles, Rev-erba est impliquée à la fois dans l'expansion clonale des pré-adipocytes mais également dans la phase de différenciation en induisant l'expression des gènes cibles de PPARγ tels que Ap2 et C/EBPα [Fontaine et al.,2003][Duez et al.,2008].
- Les facteurs extracellulaires : parmi eux les facteurs de croissance (Figure I-5).

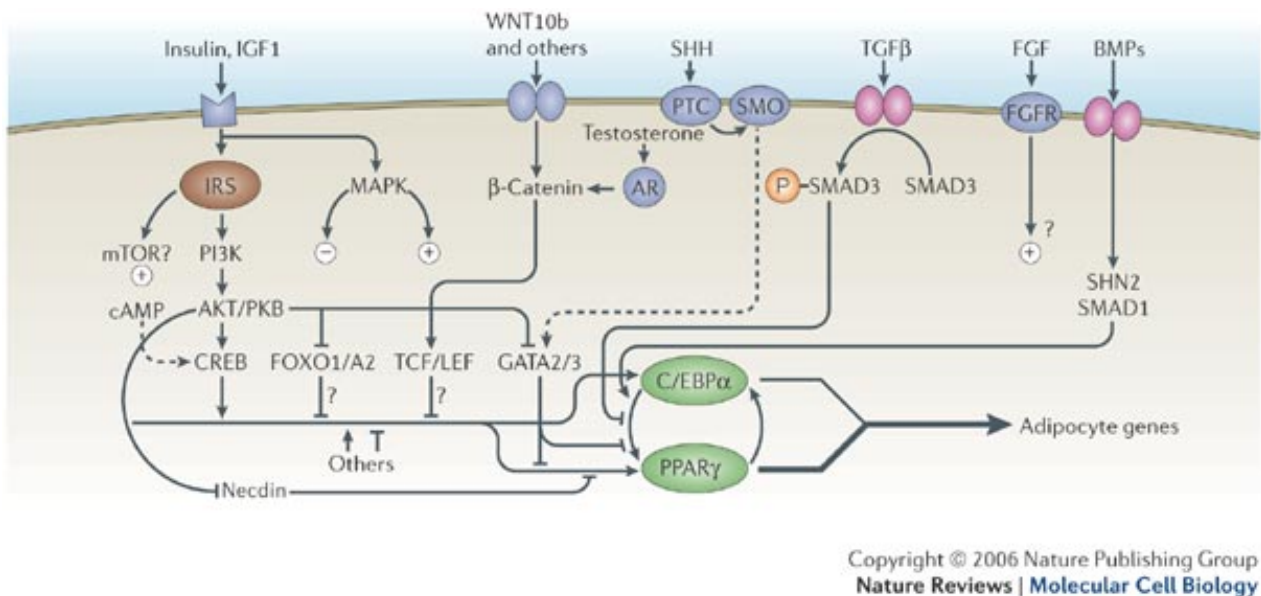


Figure I-5 : Régulation de l'adipogenèse par les facteurs extracellulaires (Source : [Rosen et al., 2006])

1.2. La différenciation chondrocytaire

1.2.1. Généralités

La chondrogenèse est l'ensemble des processus qui aboutissent à la formation du tissu cartilagineux et à l'ossification endochondrale au cours du développement du squelette. Ce processus finement contrôlé débute très tôt chez l'embryon, lors de la formation des éléments du squelette et se poursuit tout au long de la vie adulte lors de la réparation du

cartilage et de l'os. Cependant la chondrogenèse peut être associée à certaines pathologies comme la calcification vasculaire.

Le chondrocyte est le type cellulaire principal du cartilage et dérive, pour la grande majorité, du mésenchyme primaire. Par ailleurs, de manière plus tardive, l'ostéocyte peut dériver du chondrocyte et ainsi participer à la formation osseuse. C'est par l'intermédiaire de différents processus contrôlés par des cytokines et des facteurs de transcription que les chondrocytes sont produits.

La première étape de différenciation des cellules mésenchymateuses pluripotentes vers la lignée chondrocytaire commence par un processus de condensation cellulaire au cours duquel les cellules se regroupent en formant des interactions cellules-cellules et/ou cellules-matrice [Hall et al., 1992]. Ce processus implique plusieurs classes de molécules dont des molécules d'adhésions cellulaires comme la N-cadherin et la N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule) [Tavella et al., 1994]. A ce stade de la différenciation, elles expriment également des protéines de la matrice extracellulaire spécifiques telles que le collagène de type I (Col 1), le collagène de type IIa (Col 2a) différent de celui trouvé dans les chondrocytes [Sandell et al., 1991] (Figure I-6).

Dans une deuxième étape, sous l'effet de facteurs de croissance (TGF β , IGF-1, FGF), les cellules chondroprogénitrices agrégées se différencient en chondrocytes. De morphologie plus arrondie que les cellules chondroprogénitrices, elles se caractérisent par l'expression d'un certain nombre de protéines matricielles spécifiques, parmi lesquelles : le collagène de type IIb (Col 2b), les collagènes de type IX et XI (Col 9 et 11), la matrix Gla protein (MGP) [Luo et al., 1995], l'aggrecan (Agc) ainsi que des protéines non collagéniques (COMP ou *cartilage oligomeric matrix protein*, matrilin, chondroadherin, fibromodulin...). De plus la synthèse de glycosaminoglycane (GAG), longue chaîne de polysaccharides liée de manière covalente à l'aggrecan [Kruger et al., 1990], au cours de la chondrogenèse est importante et confère au cartilage des propriétés structurales et mécaniques (Figure I-6).

Le chondrocyte différencié est alors l'objet d'un programme de maturation cellulaire, qu'il conservera, à des degrés divers, suivant l'âge et la localisation anatomique. Durant cette maturation le chondrocyte prolifère, s'hypertrophie, synthétise du collagène de type X (Col 10), de la phosphatase alcaline (ALP) et entre en apoptose, ainsi les résidus de calcium et de phosphate de calcium libérés serviront de structure de base pour les dépôts minéraux tels que les cristaux d'hydroxyapatite et conduisent à la formation osseuse [Hall et al., 2000] (Figure I-6).

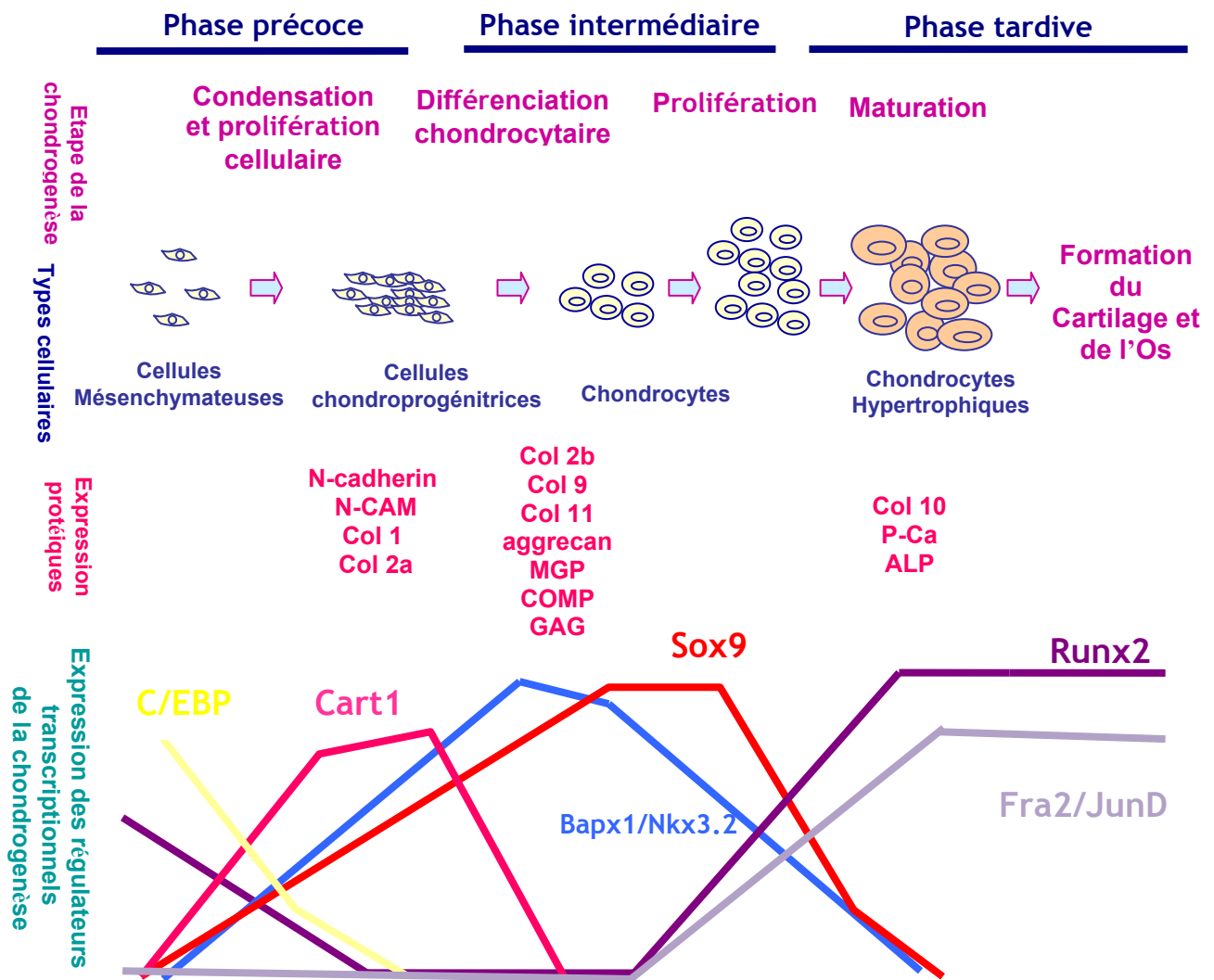


Figure I-6 : Etapes de la chondrogenèse. Evolution morphologique des cellules et profil d'expression des facteurs de transcription au cours de la différenciation chondrocytaire.

1.2.2 Régulateurs de la chondrogenèse

1.2.2.1 Les facteurs de transcription

- Famille des protéines Sox (SRY-related HMG box)

Les protéines de la famille de Sox, notamment Sox9 sont les principaux régulateurs de la différenciation chondrocytaire [Bi et al., 1999]. Sox9 est un facteur de transcription qui possède un domaine de liaison à l'ADN de type HMG (High-Mobility Group).

Sox9 a été identifié en 1994 comme un gène indispensable au bon développement cartilagineux et osseux chez l'humain. En effet les mutations entraînant un déficit ou un dysfonctionnement de Sox9 se traduisent chez l'humain par une dysplasie campomélique, qui se manifeste par un nanisme et des déformations squelettiques importantes [Wagner et al., 1994]. Un phénotype similaire a été mis en évidence chez des souris mutantes hétérozygotes pour le gène *sox9* [Bi et al., 2001] et chez des souris déficientes en Sox9 dans

les cellules mésenchymateuses [Akiyama et al.,2002]. Ces souris présentent de nombreuses malformations du squelette, principalement causées par une déficience dans la condensation des cellules mésenchymateuses et une minéralisation précoce [Bi et al.,2001]. Ainsi l'expression de Sox9 est indispensable lors de la phase précoce de la différenciation chondrocytaire au moment de la condensation des cellules progénitrices et lors de la phase tardive où elle prévient la maturation précoce des chondrocytes (Figure I-6).

D'autre part Sox9 a également été impliqué dans les phases intermédiaires de la chondrogenèse. En effet l'injection de cellules ES sox9 -/- dans le blastocyste des souris conduit également à des anomalies embryonnaires dans le développement du squelette mais cette fois-ci associées à une diminution de la quantité de chondrocytes et une diminution de l'expression des protéines de la matrice extracellulaire spécifiques des chondrocytes [Bi et al., 1999]. Cette implication de Sox9 dans la phase de la différenciation chondrocytaire (phase intermédiaire) a été confirmée par Akiyama qui montre que l'inactivation de Sox9 dans les cellules mésenchymateuses chez la souris après condensation des cellules progénitrices se traduit par une chondrodysplasie causée par un arrêt de la condensation et de la différenciation chondrocytaire [Akiyama et al.,2002].

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action utilisé par Sox9 pour réguler la chondrogenèse l'équipe de Crombrugge a induit sa surexpression dans les chondrocytes de souris. Cependant les auteurs n'ont pas montré comme attendu une augmentation de la formation de cartilage. Cette surexpression de Sox9 révèle une chondrodysplasie due à une diminution de la prolifération chondrocytaire et à un défaut dans la différenciation des chondrocytes hypertrophiques [Akiyama et al., 2004]. L'analyse du phénomène a montré que Sox9 interagit directement par son domaine de transactivation COOH terminal avec le segment Armadillo qui chevauche le domaine de liaison au TCF/LEF de la β -catenin, ceci induit la dégradation de la β -catenin et de Sox9 dans les chondrocytes [Akiyama et al., 2004]. Un phénotype similaire a été montré chez les souris déficientes en β -catenin dans les chondrocytes [Hartmann et al.,2000]. Ainsi l'interaction entre Sox9 et β -catenin qui conduit à la dégradation de la β -catenin et de Sox9 par la voie du protéasome semble être un mécanisme possible utilisé par Sox9 pour contrôler la chondrogenèse [Akayama et al.,2002]. Enfin la présence de Sox9 s'est révélée être nécessaire tout au long de la phase de différenciation chondrocytaire, en modulant entre autre l'expression du collagène de types II, IX, XI et d'aggrecan [Ng et al., 1997][Zhao et al.,1997]. L'expression de Sox9 diminue ensuite lors de la phase de maturation et laisse place à d'autres facteurs de transcription tels que Runx2, Fra2/JunD (Figure I-6).

Parmi les protéines de la famille Sox, deux autres protéines sont importantes pour le développement cartilagineux. Ce sont les protéines Sox5 et Sox6. Elles sont, au même titre que Sox9, exprimées dans les cellules mésenchymateuses, dans les chondrocytes et absentes des chondrocytes hypertrophiques [Lefebvre et al.,1998]. L'inactivation de Sox5 et Sox6 chez

la souris montre une chondrodysplasie équivalente à celle observée chez les animaux déficients en Sox9 [Smits et al., 2001]. Sox5 et Sox6 agissent en coopération avec Sox9 pour activer la différenciation et la prolifération des chondrocytes et ainsi contrôlent la formation du cartilage.

- Cart1 (cartilage homeoprotein1)

Cart1 est un facteur de transcription qui a été identifié dans les cellules chondroprogénitrices et dans les pré-chondrocytes au cours de l'embryogenèse chez le rat [Zhao et al.,1994]. L'inactivation de son expression chez la souris se traduit par des anomalies squelettiques représentées par une acranie et une mero-anencéphalie [Zhao et al.,1996]. De plus des études chez l'oursin démontrent que Alx1/Cart1 est essentiel au début de spécification du mésenchyme primaire et induit l'expression des gènes nécessaires pour la transition épithélium-mésenchyme ainsi que pour la bio-minéralisation des tests d'oursins [Ettensohn et al.,2003]. Les auteurs ont montré que l'expression de Alx1/Cart1 est, entre autre, induite chez l'oursin par l'activation de la β -catenin [Ettensohn et al.,2003] (Figure I-6).

- Runx 2 (Runt-related transcription factor 2)

Runx2 est un facteur de transcription également connu sous le nom de Cbfa1 (core binding factor α 1). Il joue un rôle important dans la phase tardive de la chondrogenèse lors de la maturation chondrocytaire [Enomoto et al.,2000][Inada et al.,1999]. Il a été montré qu'au cours de la chondrogenèse son expression varie en fonction des phases de différenciation. En effet il est exprimé dans les cellules mésenchymateuses au début de l'engagement cellulaire vers la voie chondrocytaire et dans les chondrocytes pré-hypertrophiques. Cette expression est inversement corrélée à celle de Sox9. Sox9 réprime l'expression de Runx2 lors de la différenciation chondrocytaire et permet ainsi de coordonner les évènements lors de la chondrogenèse [Yamashita et al.2009]. Le mécanisme utilisé par Sox9 pour inhiber l'expression de Runx2 passe par Bapx1 (bagpipe homeobox homolog 1) (ou également appelé Nkx3.2, NK homeobox gene family), un répresseur de la transcription [Yamashita et al.2009]. Toutefois l'expression de Runx2 dans la phase tardive de la chondrogenèse coïncide avec la différenciation des chondrocytes en chondrocytes hypertrophiés et avec l'induction de l'expression de Col10a et de Ihh dans les chondrocytes hypertrophiques [Yoshida et al.,2004] (Figure I-6).

1.2.2.2 Les facteurs de croissance

TGF β , FGF et IGF-1 sont des facteurs de croissance qui sont impliqués dans la différenciation chondrocytaire.

◇ La famille du Transforming Growth Factor - β (TGF- β) est composée d'une trentaine de membres que l'on retrouve dans tout le règne animal, dont les TGF- β s, les Activines et les

BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*). Le TGF- β est apparu comme un facteur de croissance impliqué dans des processus physiologiques essentiels comme le développement embryonnaire, la réparation tissulaire, la différenciation et le contrôle de la croissance cellulaire. Ces facteurs de croissance jouent un rôle primordial dans la détermination du devenir cellulaire au cours de l'embryogenèse et contrôlent un large spectre de réponses biologiques chez l'adulte [Roberts, 1998]. Le TGF β est synthétisé dans les chondrocytes sous forme libre ou associé à la matrice extracellulaire par une protéine, la LTBP (latent TGF β binding protein). TGF β -1 et -2 induisent l'expression de collagène de type 2 (Col 2) et l'accumulation de protéoglycanes. D'autre part *in vivo* l'incorporation de TGF β via l'infection par adénovirus [Pagnotto et al.,2007] ou par des microsphères d'hydrogels [Defail et al.,2006] provoque la différenciation des cellules mésenchymateuses humaines en chondrocytes. TGF β contrôle la phase précoce de la chondrogenèse.

◇ BMP (Bone morphogénique protein), un membre de la grande famille des TGF- β est un régulateur central de la reconstruction du cartilage. Elle regroupe une vingtaine de BMP différentes ayant des fonctions et des localisations distinctes. Les BMP activent la voie des SMADs et ont un rôle important dans le développement du système nerveux central, du cartilage, de l'os et du coeur. La mutation ou l'altération de BMP entraîne des anomalies importantes du squelette qui se traduisent par une polydactylie des membres inférieurs [Zhao , 2003]. BMP-2, -4 et -7 *in vitro* et *in vivo* ont montré leur implication dans deux processus de la chondrogenèse notamment la condensation mésenchymateuse et la différenciation en chondrocytes [Yoon et al.,2004]

◇ Les FGF sont des facteurs mitogènes des cellules qui dérivent du mésoderme. Les FGF se composent d'au moins 22 membres codés par autant de gènes différents, ce sont des facteurs de croissance multifonctionnels impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques [Onitz et al.,2001]. Ils sont impliqués dans les processus de croissance, de différenciation, de survie, d'adhésion et de motilité cellulaire [Szebenvi et al.,1999]. Parmi les FGF, FGF-2 a été impliqué dans la chondrogenèse comme étant un activateur de la prolifération des cellules mésenchymateuses et des chondrocytes [Martin et al.,1997][Martin et al.1999].

◇ l'IGF est un polypeptide qui regroupe 2 isoformes, l'IGF-1 et l'IGF-2 et qui possède une grande homologie avec l'insuline. Ils agissent au niveau de deux types de récepteurs (le récepteur de l'IGF de type I et de type II) et leur fonction est régulée par les protéines IGFBP (IGF binding protein). Ces facteurs de croissance jouent un rôle dans l'induction de la prolifération cellulaire, dans la survie et dans les processus de différenciation cellulaire.

l'IGF-1 est un médiateur chimique qui entraîne la croissance de nombreux tissus comprenant le cartilage, l'os, le foie, le poumon, le muscle. Tandis que l'IGF-2 a une action plus spécifique et est sécrété par le cerveau, les reins et le pancréas [Le Roith, 2003]. Par ailleurs l'IGF-1 a un rôle dans la chondrogenèse. En effet les chondrocytes sont capables d'induire l'expression de l'IGF-1. L'action autocrine de l'IGF-1 sur ces chondrocytes permet de

maintenir la stabilité en protéoglycanes de la matrice extracellulaire par le contrôle du métabolisme des protéoglycanes [Luyten et al.,1988]. De plus l'IGF-1 est capable d'induire l'expression de Col 2 et de l'aggrecan et ainsi de participer à la formation des chondrocytes [Messai et al.,2000].

1.2.2.3 Les facteurs sécrétés

La *parathormone-related peptide* (PTH-rP) et *Indian Hedgehog* (Ihh) sont des molécules importantes dans le contrôle de la chondrogenèse et particulièrement dans la maturation des chondrocytes.

La PTH-rP est une molécule proche de la parathormone (PTH), utilisant le même récepteur cellulaire (PTH/PTH-rP récepteur (PPR)), et est exprimée par les cellules du cartilage. PTH-rP une fois sécrétée par les cellules du cartilage va agir directement sur le tissu cartilagineux, activer la différenciation chondrocytaire et bloquer l'hypertrophie des chondrocytes. En effet l'inactivation de PTHrP ou de son récepteur PPR se traduit chez la souris par un nanisme dû à la réduction de la prolifération chondrocytaire et une différenciation hypertrophique précoce [Amizura et al.,1994][Karaplis et al.,1994][Lanske et al.,1996].

Indian Hedgehog (Ihh) est une protéine soluble de la famille de hedgehog (Hh) et est sécrétée par les chondrocytes pré-hypertrophiques. L'inactivation de Ihh chez l'embryon induit une diminution de l'expression de PTHrP, une diminution de la prolifération des chondrocytes et une activation de l'hypertrophie des chondrocytes [Karp et al., 2000] [St-Jacques et al., 1999]. Par conséquent, au cours du développement embryonnaire Ihh active l'expression de PTHrP et prévient ainsi la formation de chondrocytes hypertrophiés [Vortkamps et al.,1996].

Cependant, Ihh a également un effet sur la chondrogenèse qui est indépendant de l'expression de PTHrP et qui en contrepartie favorise l'hypertrophie des chondrocytes [Karp et al.,2000][Kobayashi et al.2005]. Ce phénomène est principalement observé au cours de la formation du cartilage post-natal. De plus les auteurs ont constaté que les signalisations de BMP et de Wnt/ β -catenin dans le cartilage induisent toutes les deux l'activation de Ihh sur la maturation des chondrocytes [Mak et al.,2008].

1.2.2.4 Signalisation des Wnt

- Régulation de la chondrogenèse par Wnt

La voie de Wnt à un effet activateur ou inhibiteur de la chondrogenèse, son effet dépend de la protéine Wnt et de l'état de différenciation des cellules.

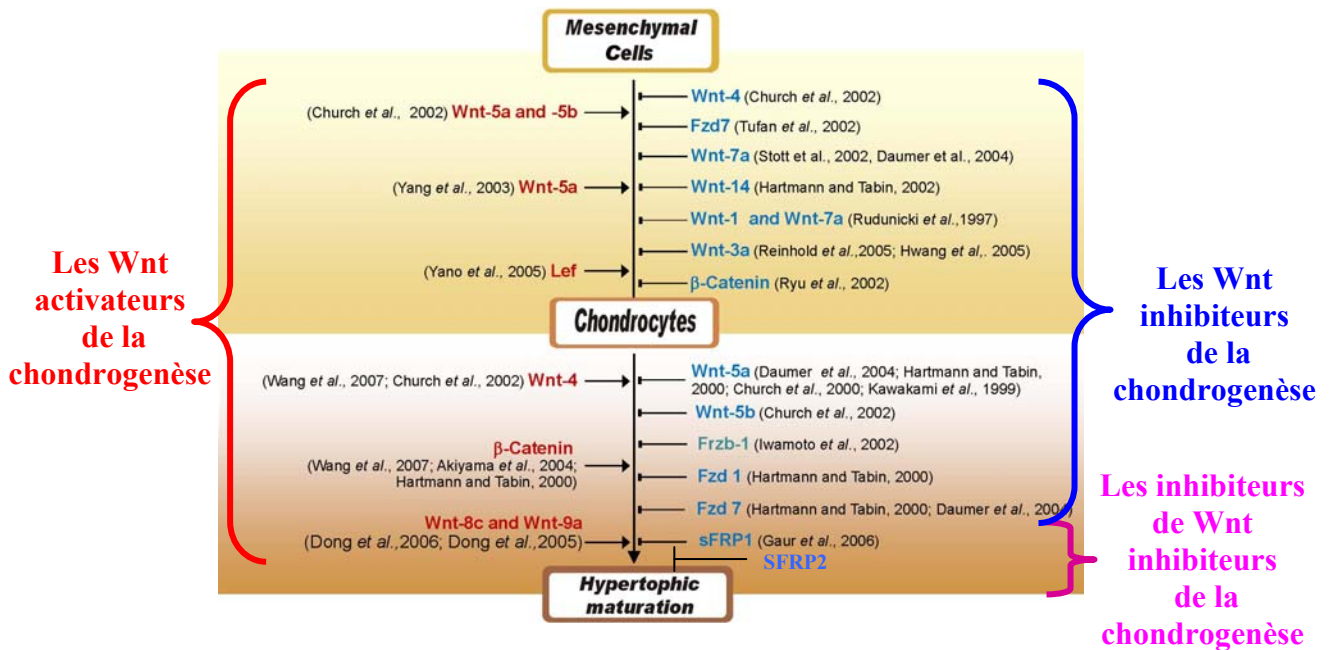


Figure I-7: Contrôle de la chondrogenèse par la voie des Wnt (source : Chun et al., 2008)

- Les Wnt activateurs de la chondrogenèse

Wnt5a et Wnt5b sont capables d'activer la phase précoce de la chondrogenèse. Ce phénomène est observé *in vitro* par leur capacité à former des nodules de cartilage [Church et al., 2002][Yang et al., 2003] et *in vivo* par leur capacité à coordonner la prolifération et la différenciation chondrocytaire [Yang et al., 2003]. L'expression de la cycline D1 et de p130 ainsi que l'expression de Col2a un marqueur spécifique des chondrocytes permettent cette coordination entre la prolifération et la différenciation des chondrocytes [Yang et al., 2003]. D'autre part l'activation de la voie canonique de Wnt conduit à l'induction du facteur de transcription LEF. *In vitro* l'activation de LEF conduit à la différenciation chondrocytaire. De plus afin de déterminer si cette activation dépend de l'expression de Sox9, un régulateur majeur de la chondrogenèse, les auteurs ont montré que l'activation de LEF n'induit plus la formation de chondrocytes dans les cellules ES déficientes en Sox9. Ceci montre que l'activation de la voie canonique de Wnt induit la chondrogenèse uniquement en présence de Sox9 [Yano et al., 2005].

L'expression de Wnt4, induite par l'hormone thyroïdienne *in vitro*, conduit à l'activation de la voie canonique des Wnt et à l'induction de l'expression de Runx2/Cbfa1, un facteur de transcription indispensable à la maturation des chondrocytes [Wang et al., 2007].

De nombreuses études ont montré que la stabilisation de la β-catenin conduit à l'activation de l'hypertrophie cellulaire en activant le facteur de transcription Runx2/Cbfa1 [Wang et al., 2007][Akiyama et al. 2004][Hartmann et al., 2000]. De plus Akiyama et al. ont montré que Sox9 inhibe l'activation de la β-catenin et permet ainsi lors de la maturation des chondrocytes et lorsque l'expression de Sox9 diminue, la stabilisation de la β-catenin et l'induction de l'hypertrophie chondrocytaire [Akiyama et al., 2004].

Ce phénomène d'hypertrophie est également observé dans les chondrocytes de poussins surexprimant Wnt8c et Wnt9a. Le mécanisme utilisé par Wnt8c et Wnt9a pour activer la maturation chondrocytaire passe par l'augmentation de l'expression de Col10 et de Runx2 [Dong et al.,2005][Dong et al.,2006]. (Figure I-7).

- Les Wnt inhibiteurs de la chondrogenèse

Wnt4, frizzled 7 (Frz 7)[, Wnt7a et Wnt14 inhibent la phase précoce de la chondrogenèse. Wnt4 [Church et al., 2002] et Frz 7 [Tufan et al. 2002] inhibent la condensation des cellules mésenchymateuses alors que l'expression de Wnt7a [Stott et al. 1999] et de Wnt14 [Hartmann et al.,2001] bloque la formation des chondrocytes.

L'expression de Wnt1 et Wnt7a chez l'embryon de poussin entraîne un arrêt de la chondrogenèse après condensation cellulaire, sans perturber l'expression des molécules d'adhésion au début de la chondrogenèse, l'agrégation des cellules chondroprogénitrices et la formation de pré-chondrocytes [Rudnicki et al. 1997]. Ainsi Wnt1 et Wnt7a bloquent la chondrogenèse en stabilisant l'interaction cellules-cellules.

Wnt3a inhibe également la chondrogenèse en stabilisant les interactions cellulaires. De plus il active la dédifférenciation des chondrocytes. La stabilisation de la condensation cellulaire par Wnt3a se fait indépendamment de l'activité transcriptionnelle de la β -catenin. En revanche la dédifférenciation chondrocytaire passe par l'activation du complexe LEF/TCF, puis par l'activation de la voie JNK/AP-1, ce qui entraîne la répression de Sox9 et ainsi l'incapacité des pré-chondrocytes à se différencier [Hwang et al., 2005].

Wnt5a et Wnt5b sont capables d'inhiber l'hypertrophie des chondrocytes [Church et 2002]. Ce processus est également bloqué ou retardé par la surexpression de Frz-1 [Hartmann et al.,2000], Frz-7 [Hartmann et al., 2000][Daumer et al.,2004] ou FrzB-1 [Iwamoto et al.,2002]. (Figure I-7).

- Les activateurs de la chondrogenèse par inhibition de la voie des Wnt

Chez la souris, l'inactivation de l'expression de SFRP1, un inhibiteur de la voie canonique des Wnt, se traduit par une induction accrue de la maturation chondrocytaire. Ceci est mis en évidence par une accélération de l'ossification endochondrale due à une différenciation accélérée des chondrocytes hypertrophiés [Gaur et al.,2006].

Une autre protéine inhibitrice de la voie de Wnt, SFRP2, est impliquée dans la chondrogenèse. L'inactivation de l'expression de SFRP2 chez la souris se traduit par une syndactylie et une polydactylie pré axiale des membres inférieurs. Ceci révèle le rôle inhibiteur de SFRP2 sur la chondrogenèse et tout particulièrement sur le stade de maturation des chondrocytes [Ikegawa et al.,2008].

Ainsi les inhibiteurs de la voie canonique des Wnt bloquent la formation des chondrocytes hypertrophiques. Ceci confirme que la voie canonique des Wnt active la maturation

chondrocytaire. Nous pouvons spéculer que la voie des Wnt décrite précédemment comme étant inhibitrice de la chondrogenèse utiliserait la voie non canonique de Wnt. (Figure I-7).

1.2.2.5 SPARC/ Ostéonectine

SPARC, en plus de son action comme inhibiteur de l'adipogenèse, régule la chondrogenèse. En effet, des souris déficientes en SPARC présentent de graves anomalies du squelette, une diminution de la formation osseuse et une soudure des disques intervertébraux essentiellement constitués de cartilage fibreux [Delany et al.,2003]. Chez le Zebrafish, l'absence de SPARC est responsable d'une diminution dans la formation du cartilage mais également d'une diminution voire une absence totale de l'expression des facteurs de transcription essentiels à la chondrogenèse tel que Sox9 et Col2a1 [Rotlland et al.,2008]. Les mécanismes utilisés par SPARC pour réguler la différenciation ostéochondrogénique sont encore mal connus. L'équipe de H. Sage a mis en évidence que SPARC inhibe la différenciation adipocytaire et active l'ostéo/chondrogenèse en activant la stabilité de la β -catenin et en réprimant l'expression de deux principaux régulateurs de l'adipogenèse, PPAR γ et CEBP α [Nie et al.,2009]. Le mécanisme d'action utilisé par SPARC pour stabiliser la β -catenin et induire le remodelage de la matrice extracellulaire exige la présence et l'induction de l'ILK (Integrin-linked kinase), une sérine/thréonine kinase qui se lie au domaine intracellulaire de l'intégrine B1 et est capable d'activer des voies de signalisation intracellulaire. Ainsi la β -catenin et l'ILK activées par SPARC vont induire le remodelage de la matrice extracellulaire et ainsi induire la formation de chondro/ostéocytes à la place des adipocytes [Barker et al.,2005][Nie et al.,2009].

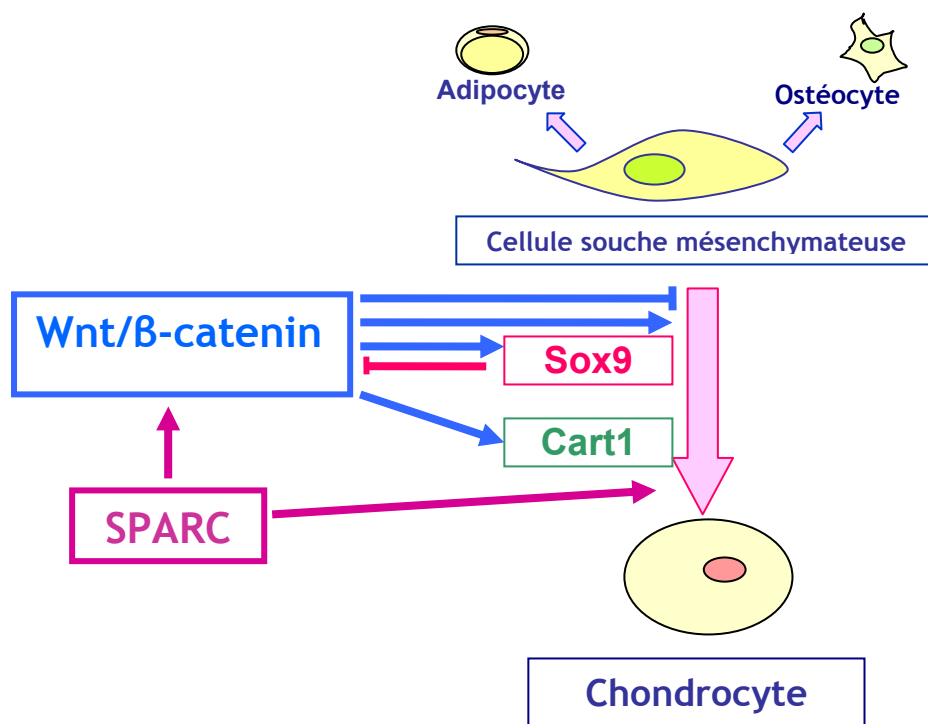


Figure I-8 : Régulation de la chondrogenèse.

1.3 Les Protéines régulatrices de la détermination cellulaire et de la différenciation cellulaire

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules souches tissulaires pluripotentes provenant du mésoderme embryonnaire et donnant naissance aux tissus conjonctifs du squelette : os, cartilage, et adipocytes [Caplan, 1991][Caplan,2007]. Les CSM ont la capacité à se multiplier sans changer de phénotype ou à s'engager vers un lignage cellulaire particulier, on parle alors de détermination cellulaire. Les mécanismes qui contrôlent la détermination cellulaire sont peu connus. Cependant il existe un processus très général qui implique l'expression séquentielle de facteurs de transcription spécifiques d'une lignée cellulaire. Cette induction va alors réprimer ou activer l'expression des gènes spécifiques codant pour des protéines caractéristiques d'un type de cellule donné à un stade de différenciation donné.

Dans l'adipogenèse PPAR γ est une des protéines majeures permettant l'engagement des CSM vers l'adipogenèse.

Dans la chondrogenèse, Sox9 est un des acteurs principaux qui permettra la détermination cellulaire vers le chondrocyte.

Des facteurs extrinsèques interviennent également dans le contrôle de la différenciation cellulaire. Wnt/ β -catenin est une des protéines clé nécessaire à l'engagement vers la chondrogenèse. En effet c'est par son rôle activateur de la chondrogenèse et inhibiteur de l'adipogenèse que la voie canonique des Wnt est capable d'induire la différenciation des CSM vers les chondrocytes et la formation de cartilage. D'autre part et au même titre que Wnt/ β -catenin, SPARC privilégie la chondrogenèse au dépend de l'adipogenèse (Figure I-9).

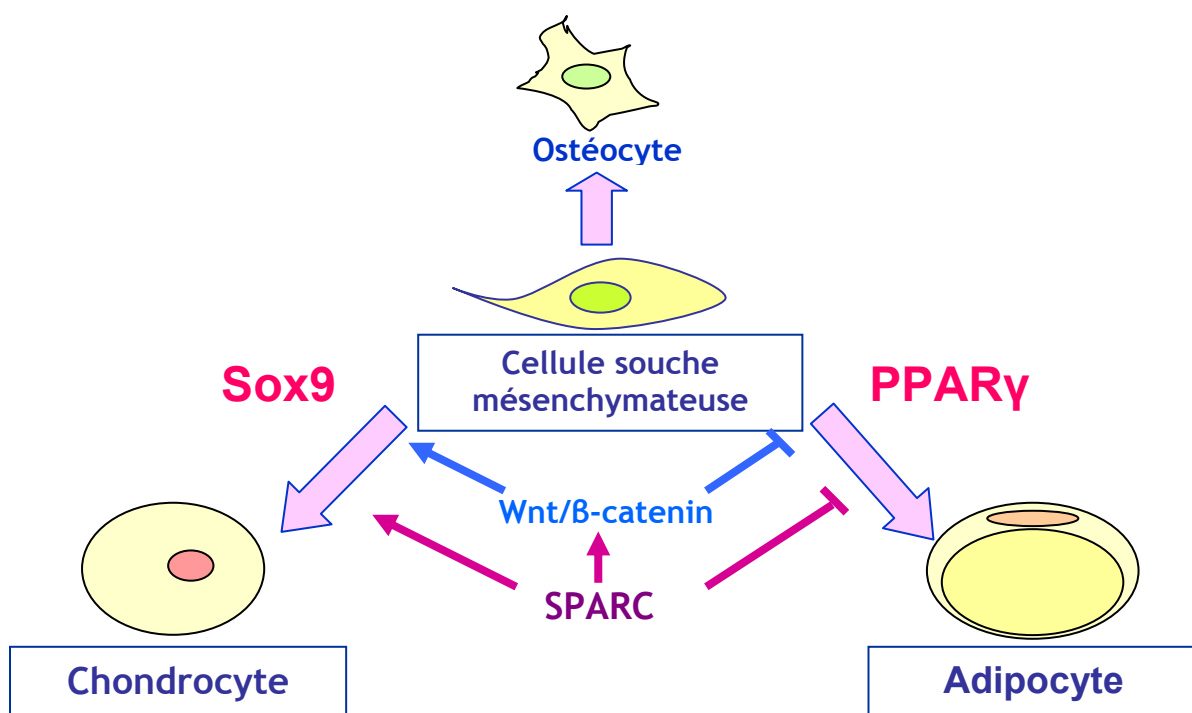


Figure I-9 : les facteurs de la détermination des cellules souches mésenchymateuses

1.4 La différenciation cellulaire dans l'athérosclérose : La calcification vasculaire

La calcification vasculaire est un phénomène physiopathologique fréquemment associé au vieillissement, au diabète, à l'insuffisance rénale, à l'hypervitaminose D et à l'athérosclérose. Elle entraîne une modification de l'élasticité artérielle qui perturbe l'hémodynamique vasculaire, provoquant ainsi de nombreuses dysfonctions cellulaires. Ainsi depuis plus d'un demi-siècle ce phénomène est corrélé à un pronostic sombre attribué à une morbidité et une mortalité cardiovasculaire précoces [Wilson et al.2001].

Deux sites différents de la paroi vasculaire sont touchés par le phénomène de calcification vasculaire.

Dans la tunique de la média cette calcification est appelée sclérose de Mönckeberg, c'est un phénomène diffus et indépendant de l'athérosclérose. La prévalence de la médiocalcose augmente avec l'âge et est particulièrement fréquente chez les diabétiques et les insuffisants rénaux. Elle résulte d'une augmentation de la rigidité vasculaire et d'une diminution de la compliance des vaisseaux.

Dans l'intima, la calcification est associée à l'athérosclérose. Elle se développe tardivement au niveau de la plaque d'athérome et est induite par une combinaison de plusieurs processus tels que la nécrose cellulaire, l'inflammation et l'accumulation de cholestérol. Cette calcification intimale peut aussi bien stabiliser la lésion athéroscléreuse qu'augmenter le risque d'érosion et de rupture de la plaque entraînant ainsi un risque accru de thrombose et d'infarctus du myocarde [Farb et al.,1996][Doherty et al.,1994][Huang et al.,2001][Bura-Rivière,2006].

Longtemps considéré comme un phénomène passif dû à la précipitation non régulée de calcium et de phosphore, les calcifications vasculaires sont désormais décrites comme un phénomène actif similaire à celui de la formation osseuse et cartilagineuse [Mody et al., 2003].

Déjà, en 1863, Virchow décrivait la calcification des artères comme un tissu ressemblant à de l'os composé de cellules de type ostéoblaste, d'éléments hématopoïétiques et de structures lamellaires [Virchow, 1863]. Et c'est plus de 100 ans après, que les travaux de Bostrom et al. ont montré la présence de protéines de la matrice extracellulaire osseuse dans la paroi artérielle. Ce qui a permis de rapprocher les phénomènes de calcification vasculaire aux processus de calcification physiologique se déroulant lors de la formation des os, du cartilage et du développement dentaire [Bostrom et al.,1993].

La présence de cellules de morphologie proche de celle des cellules chondro/ostéocytaires dans les plaques d'athérome calcifiées a souligné l'implication des cellules de la paroi vasculaire dans le mécanisme de formation des lésions calcifiées.

Les CML sont des cellules prédominantes dans la paroi vasculaire et essentielles à la structure et au fonctionnement du vaisseau. À la différence de la plupart des types cellulaires qui subissent une différenciation terminale, les CML conservent une certaine plasticité phénotypique pour répondre aux stimuli locaux.

Ceci a été montré dans la plaque d'athérome où les CML de la média passent d'un phénotype contractile à un phénotype prolifératif dans l'intima [Mosse et al.,1985] [Owens et al.,2004] [Worth et al.,2001]. Ce phénomène a également été mis en évidence dans les vaisseaux calcifiés humains où les CML de la média perdent leurs caractéristiques de CML et expriment des marqueurs protéiques du cartilage et de l'os tels que la phosphatase alcaline (ALP), la « bone sialoprotein » (BSP) et le collagène de type 2 (Col2) [Shanahan et al., 1999]. *In vivo* de nombreuses études sur des aortes humaines ou murines calcifiées ont également montré la présence dans les calcifications vasculaires de protéines marqueurs de la différenciation chondrocytaire tels que Runx2 (Runt-related transcription factor 2) /Cbfa1 (Core binding factor 1), Bone morphogenic protein 2 (BMP2), Msx2, osterix et Sox9 (sex determining region Y (SRY)-box 9) [Tyson et al, 2003][Bobryshev, 2005].

D'autre part *in vitro* les CML bovines d'aorte cultivées en présence de concentrations physiologiques de phosphate perdent leurs marqueurs de CML (SM22 α , SM α -actin) et acquièrent des marqueurs ostéochondrogéniques (Runx2/Cbfa1, ostéopontin, ostéocalcin, ALP) [Steitz et al.,2001]. Un changement de phénotype similaire a été mis en évidence *in vivo* après transfection de l'endothélium des aortes de rats avec un vecteur exprimant TGF- β 1. L'augmentation de l'expression de TGF- β 1 dans la paroi artérielle cause une métaplasie cartilagineuse dans la média vasculaire [Schulick et al.,1998]. Finalement, l'étude par microscopie électronique et par immunohistochimie sur des aortes calcifiées humaines et murines met en évidence des cellules appelées myochondrocytes, qui sont des hybrides entre les CML et les chondrocytes et qui ont été identifiées dans les lésions athéroscléreuses humaines et murines [Bobryshev, 2005].

La modification phénotypique des CML vasculaires induit ainsi la formation de cellules similaires à celles du cartilage dans la paroi vasculaire. De plus la calcification vasculaire est régulée par de nombreuses protéines impliquées dans la minéralisation du cartilage et de l'os. Une des protéines importante dans la calcification vasculaire est la protéine « Matrix γ carboxyglutamic acid Protein » (MGP). La MGP est une protéine de 10 kDa contenant cinq résidus acide gammacarboxyglutamique (Gla). Elle est exprimée dans le cartilage et le muscle lisse [Shanahan et al., 1994][Spronk et al.,2001]. Les souris dont l'expression de MGP est inactivée meurent dans les deux premiers mois de vie après rupture artérielle et infarctus du myocarde en raison du développement de calcifications vasculaires considérables. De plus, ces souris présentent des calcifications au niveau du cartilage et une ostéopénie [Luo et al., 1997]. La MGP apparaît comme un régulateur local des calcifications vasculaires. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer le potentiel inhibiteur de la MGP : inhibition de la

précipitation de l'hydroxyapatite par chélation du calcium au niveau des résidus Gla, augmentation de la clairance du calcium et du phosphore par formation de complexes circulants, masquage des sites de nucléation par liaison à l'élastine. De plus, la MGP serait capable d'inhiber l'activité de BMP-2 et empêcher ainsi la différenciation ostéochondrogénique [Zebboudj et al.,2003].

Cependant d'autres protéines ont été mises en évidence dans les processus de calcification vasculaire notamment l'anhydrase carbonique II [Spicer et al.,1989], l'ostéoprotégérine (OPG)[Bucay et al.,1998] et l'ostéonectin/SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine). Une délétion du gène de l'anhydrase carbonique II, une enzyme de la famille des lyases qui catalysant l'hydratation du CO₂ pour former l'acide carbonique, entraîne une acidose tubulaire rénale, une ostéopérose et une calcification vasculaire cérébrale [Spicer et al.,1989]. L'OPG est un récepteur soluble qui se lie à RANK-ligand (RANKL) et bloque la différenciation et l'activation des ostéoclastes. L'inactivation de l'expression de l'OPG chez la souris se traduit par une diminution de la densité osseuse et un développement de calcification dans l'aorte et les artères rénales [Bucay et al.,1998]. Quant à l'ostéonectin c'est une glycoprotéine importante des os et des dents, qui participe à la formation des cristaux d'hydroxyapatite retrouvés dans les plaques calcifiées [Termine et al., 1981].

Ainsi toutes ces protéines activatrices ou inhibitrices de la calcification vasculaire régulent la différenciation cellulaire des CML. Ceci suggère que la différenciation chondrocytaire et/ou ostéocytaire entraîne la formation dans la paroi vasculaire de cellules similaires à celles du cartilage et/ou de l'os. Ces modifications vasculaires sont principalement causées par la présence, au sein de ces plaques, de CML qui ont gardé une plasticité phénotypique.

La différenciation chondrocytaire est un des processus responsables de la calcification intinale de la plaque d'athérome.

1.5 LRP1 : un régulateur de la différenciation cellulaire

1.5.1 LRP1 : Modulateur de l'adipogenèse

LRP1 est largement exprimé dans les adipocytes [Descamps et al.,1993]. L'inactivation de l'expression de LRP1 dans les adipocytes chez la souris se traduit par un retard dans la clairance lipidique postprandiale, une diminution du stockage des graisses et une réduction du tissu adipeux brun qui résulte en une perte de poids [Hofmann et al.,2007]. Cette étude met en évidence l'importance du LRP1 des adipocytes dans le métabolisme des triglycérides postprandial. LRP1, en collaboration avec la lipoprotein lipase (LPL) active la lipolyse ainsi que l'endocytose nécessaire au catabolisme des triglycérides [Chappell et al., 1993][Chappell

et al.,1994][Nkjaer et al.,1993][Merkel et al.,1998]. De plus les souris déficientes en LRP1 ont une réduction de la masse graisseuse et sont résistantes au développement de l'obésité induite par un régime riche en graisses. Les mécanismes induits par l'absence de LRP1, et qui entraînent une résistance à l'obésité, ne sont à ce jour pas expliqués.

Par ailleurs au laboratoire nous avons montré que les fibroblastes embryonnaires déficients en LRP1, dans un cocktail adipogénique, accumulent de grandes quantités de cholestérol et d'esters de cholestérol. Ainsi nous avons démontré que LRP1 prévient l'accumulation de cholestérol et d'esters de cholestérol par l'activation de la voie canonique de Wnt5a. De plus nous avons mis en évidence que LRP1 est nécessaire à la lipolyse et stimule la synthèse d'acides gras de manière indépendante de la voie noradrénergique mais dépendante de l'inhibition de GSK3B (glycogen synthase kinase) et de l'ACC (acetyl-CoA carboxylase), une enzyme nécessaire au métabolisme des acides gras [Terrand et al.,2009].

1.5.2 *LRP1 : Modulateur de la chondrogenèse*

Le LRP1 est exprimé dans les chondrocytes cependant sa fonction dans la formation du cartilage reste à élucider.

Une équipe japonaise a montré que le LRP1 est capable d'internaliser CCN2, une protéine impliquée dans l'ossification endochondrale, la squelettogenèse et dans la réparation des fractures osseuses. Ainsi LRP1 limite l'action de CCN2 et contrôle la chondrogenèse [Kawata et al., 2006]. Dans les chondrocytes, le LRP1 est également capable d'internaliser une métalloprotéinase, la MMP-13, qui est responsable de la dégradation des fibres de collagène de type 1, 2 et 3 et de l'aggrecan [Raggatt et al., 2006]. Il limite ainsi le remodelage de la matrice extracellulaire. Par sa fonction d'endocytose, le LRP1 est capable de moduler la formation chondrocytaire et la dégradation cartilagineuse.

1.5.3 *LRP1 : Modulateur de la voie de Wnt5a*

D'autre part des études ont montré le rôle de LRP1 comme modulateur de la voie canonique des Wnt. *In vitro* le LRP1 est capable de se lier au récepteur frizzled-1, d'empêcher la formation du complexe récepteur /co-récepteur (LRP5/6) et de bloquer la signalisation de Wnt3a [Zilberberg et al. 2004]. Wnt3a [Hwang et al., 2005] et frizzled-1 [Hartmann et al.,2000] ont été identifiés comme étant, entre autre, des inhibiteurs de la chondrogenèse. Ainsi LRP1 en régulant cette voie semble lever l'inhibition sur la différenciation et la maturation chondrocytaire. Par ailleurs au laboratoire nous avons montré que le LRP1 active, lors de l'adipogenèse, la transcription de Wnt5a, un inhibiteur de l'accumulation de cholestérol intracellulaire [Terrand et al., 2009].

2. Objectif de l'étude

La différenciation cellulaire est une étape importante au cours du développement de l'athérosclérose et contribue à la croissance de la plaque d'athérome. L'implication de la différenciation adipocytaire et chondrocytaire dans la paroi vasculaire contribue respectivement à la croissance du centre lipidique et à la formation de calcification vasculaire. Les cellules en partie responsables de ces phénomènes sont les CML vasculaires, car elles conservent une certaine plasticité cellulaire qui les rend sensibles aux divers signaux environnementaux.

LRP1 est un récepteur membranaire impliqué dans de nombreuses régulations physiologiques et pathologiques. Il protège contre l'athérosclérose et régule le métabolisme lipidique au cours de l'adipogenèse en activant entre autre la voie canonique des Wnt.

Wnt/ β -catenin et SPARC régulent à la fois l'adipogenèse et la chondrogenèse. Cependant le mécanisme d'action utilisé par ces deux partenaires n'est pas encore élucidé.

Nous pensons que LRP1, par l'intermédiaire de la voie des Wnt et de SPARC, contrôle la formation de cellules spumeuses et la chondrogenèse et par conséquent protège contre l'athérosclérose.

Afin de tester cette hypothèse nous disposons de fibroblastes embryonnaires murins déficients en LRP1 ou sauvages. Puis pour bien comprendre l'implication de LRP1 *in vivo* dans la chondrogenèse et dans la calcification vasculaire, nous avons généré des animaux déficients en PPAR γ et/ou en LRP1 au niveau des CML. L'inactivation de PPAR γ dans les CML bloque l'engagement des CML vers la formation de cellules spumeuses. Ainsi la modulation de l'expression de LRP1 va permettre en l'absence de PPAR γ de comprendre l'implication de LRP1 dans la formation de la calcification vasculaire.

Objectifs :

1. Mettre en évidence l'implication de LRP1 dans les processus de différenciation adipocytaire et chondrocytaire.
2. *In vivo*, caractériser le phénotype des souris déficientes en PPAR γ , PPAR γ /LRP1 et en LRP1 au niveau des CML.
3. *In vitro*, caractériser le mécanisme moléculaire mis en jeu pour réguler la différenciation chondrocytaire.

Partie 1 :

*Matériels
&
Méthodes*

3. Matériels et Méthodes

3.1. La différenciation cellulaire

Les cellules ont étéensemencées dans une boîte de pétrie de 100mm (100000 cellules/boîte) et cultivées jusqu'à 80 % de confluence dans 8ml de milieu DMEM (Invitrogen) complétés avec 10 % (v/v) de sérum de veau nouveau né (NCS), des antibiotiques (la pénicilline 10U/ml et streptomycin 10mg/ml, Cambrex) et de la glutamine (2mM, Cambrex)

3.1.1. La différenciation *adipocytaire*

La différenciation adipocytaire a été induite dans un milieu (DMEM, Gibco) contenant 10 % de sérum de veau fœtal avec de l'insuline (10 µg/ml), de la dexaméthasone (1 µM), de l'isobutyl méthylxanthine (IBMX, 500 µM) et de la rosiglitazone (10 µM) pendant 2 jours. Le milieu a été changé et remplacé tous les 2 jours pendant 8 jours par un milieu DMEM contenant 10 % de sérum de veau fœtal avec de l'insuline (10 µg/ml) et de la rosiglitazone (10 µM). Ce protocole a été décrit par Picard et al. 2002; Proc Natl Acad Sci U S A. 26; 99 (24)).

◇ Coloration des lipides

Les cellules ont été fixées avec 10 % formaldéhyde pendant 30min. Les cellules ont été lavées 2 fois 5min avec du PBS froid 1mM à pH 7.4 et colorées pendant 30min par une solution à 0.5 % l'Oil Red O dans de l'isopropanol diluée dans l'eau milliQ (4 vol 6 vol). Les cellules ont été lavées 3 fois, 5min avec le froid PBS 1mM, le pH 7.4 et conservées à 4°C dans le PBS.

3.1.2. La différenciation chondrocytaire

La différenciation chondrocytaire a été induite par un milieu DMEM contenant 10% sérum de veau fœtal, du TGF-β (10ng/ml) pendant 17 jours [Aslan et al.,2006].

◇ Coloration des glycosaminoglycanes (GAG)

Les cellules ont été fixées avec 99.5% de méthanol pendant 2 minutes. Les cellules ont été lavées 2 fois 5min avec du PBS froid 1mM à pH 7.4 et colorées pendant 2 heures par une solution à 0.1% de bleue alcian 8GX diluée dans l'eau milliQ. Les cellules ont été lavées 3 fois, 5min avec de l'eau du robinet et conservées à 4°C dans le PBS.

◇ Coloration des phosphates de calcium

Les cellules ont été fixées avec une solution à 70% d'éthanol pendant 15min. Les cellules ont été lavées 2 fois 5min avec du PBS froid 1mM à pH 7.4 et colorées pendant 5min par une

solution à 1% rouge d'alizarine dans de l'isopropanol diluée dans l'eau milliQ. Les cellules ont été lavées 3 fois, 5min avec le l'eau de robinet et conservées à 4°C dans le PBS.

3.2. Modèles animaux:

3.2.1. Génération des souris LRP1 $-/-$ au niveau des CML et LDLr $-/-$

Nous disposons de souris LRP1^{flox/flox} données gracieusement par le Pr Herz J. (UT Southwestern Medical center, Dallas, Texas). Ces souris possèdent deux sites loxP qui correspondent à une séquence d'ADN de 34 pb situées de part et autre du gène *lrp1* (Rohlmann et al., 1996). L'inactivation de LRP1 sera réalisée en croisant les souris LRP1^{flox/flox} avec des souris transgéniques qui expriment le CRE recombinase sous la dépendance d'un promoteur spécifique d'un tissu donné.

Dans notre étude, nous inactivons l'expression de LRP1 spécifiquement dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) en utilisant des souris SM22 CRE.

Dans le but d'augmenter la susceptibilité de ces souris à développer des lésions athéroscléreuses, nous les croisons avec des souris déficientes en récepteur aux lipoprotéines LDL (LDLr $-/-$), récepteur nécessaire pour le métabolisme du cholestérol.

Les souris contrôles ont un génotype LRP1^{flox/flox} LDLr $-/-$.

3.2.2. Génération des souris PPAR γ $-/-$ au niveau des CML et LDLr $-/-$.

Les souris PPAR γ ^{flox/flox} nous ont été fournies par Dr Metzger D. (IGBMC, Strasbourg). Les sites loxP sont introduits du côté 5' en amont de l'exon 1 et du côté 3' en aval de l'exon 2. L'excision après action de la CRE recombinase supprimera un fragment contenant le codon ATG, initiateur de la traduction, et la région qui code pour le domaine de liaison à l'ADN. Cette excision permet d'inactiver l'expression des deux isoformes de PPAR γ [Rieusset et al.,2004](Imai T. et al., 2004).

Afin d'étudier la formation des plaques d'athéromes nous croisons ces souris avec des souris LDLr $-/-$.

3.2.3. Génération des souris PPAR γ $-/-$, LRP1 $-/-$ au niveau des CML et LDLr $-/-$.

Ces souris ont été obtenues après croisements successifs entre les souris LRP1^{flox/flox}, LDLr $-/-$ et PPAR γ ^{flox/flox}, LDLr $-/-$ pour obtenir des souris LRP1^{flox/flox}, PPAR γ ^{flox/flox}, LDLr $-/-$. Elles sont alors croisées avec des souris SM22Cre pour inactiver l'expression de LRP1 et de PPAR γ dans CMLVs.

3.2.4. Vérification de l'excision de PPAR γ et LRP1

◇ Vérification de l'excision de LRP1 dans les aortes des souris PPAR γ /LRP1 -/- et LRP1 -/- au niveau des CML

○ Extraction protéique

Les souris anesthésiées ont été perfusées par du PBS1x afin d'éliminer le sang dans l'aorte. L'aorte est prélevée en entier de la crosse aortique jusqu'à la bifurcation iliaque et nettoyée dans du PBS1x sur de la glace. Elle est alors coupée en petits fragments de 1 à 5mm et transvasée dans un Potter de 1ml en verre frité contenant 150 μ l de tampon de lyse (Hepes 10mM, Triton-X100 1%, SDS 0.1%, NaCl 150mM, EDTA 2mM, NaF 50mM, Na₃Vo₄ 2mM, sodium déoxycholate 0.1%, Na₂HPO₄ 1.53mM) supplémenté par des inhibiteurs de protéases (leupeptin 20mg/ml, Aprotinin, PMSF 2mM, PAO, pepstatin 0.5m). L'aorte est broyée dans la glace puis le lysat est récupéré, 150 μ l de tampon de lyse /inhibiteur est rajouté au lysat. Le lysat est centrifugé 40 min à 13000 rpm et à 4°C. Le surnageant est récupéré et la concentration protéique est déterminée par la technique colorimétrique de Bradford (Bio-Rad). La lecture au spectrophotomètre à 595 nm est effectuée contre une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA : 0 à 2 mg/ml).

○ Analyse par western-blot

Les protéines (20 à 80 μ g) sont mélangées à un 5 μ l / échantillon de tampon Laemmli 4X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8 ; SDS 2 % ; Glycerol 10 % ; dithiothréitol 100 mM ; Bleu de Bromophénol 0,1 %) 1/20 β -mercaptoethanol, puis dénaturées 10 min à 95°C. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel d'électrophorèse dénaturant (SDS-PAGE) 10 %. La migration s'effectue pendant 2h30 (110 V) dans le tampon de migration (Tris-HCl 25 mM pH 8,5 ; Glycine 250 mM ; SDS 0,1%). Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est préalablement trempée quelques secondes dans du tampon de transfert (Tris-HCl 25 mM pH 8,5 ; Glycine 250 mM ; Méthanol 20%). Le transfert s'effectue pendant 1h45 (75V). Après 3 lavages dans un tampon PBS 1X-Tween 0,1 %, la membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante sous agitation avec du tampon de blocage (PBS 1X-Lait 5 %) afin de saturer les sites aspécifiques. Après avoir éliminé le tampon de blocage, les membranes sont lavées brièvement avant d'être incubées une nuit à 4°C sous agitation avec l'anticorps anti-LRP1 dilué au 1/1000 dans le tampon de blocage. Après incubation, les membranes sont lavées plusieurs fois dans du tampon PBS 1X-Tween 0,1% avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire polyclonal anti-IgG de lapin conjugué à une peroxydase. La révélation des complexes antigène-anticorps spécifiques se fait sous agitation douce 1h à température ambiante en présence de l'Ac secondaire dilué au 1/5000 dans le tampon de blocage. Les membranes sont ensuite lavées dans le tampon de lavage afin d'éliminer l'excès d'Ac secondaire. La révélation est réalisée par une réaction de chemoluminescence en utilisant le système ECL et les membranes sont exposées à un film autoradiographique

(Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech) selon la technique donnée par le fabricant. Le poids moléculaire des bandes spécifiques ainsi révélées est déterminé grâce à la migration de marqueurs de poids moléculaires connus. L'intensité relative des bandes est déterminée grâce au logiciel Scion.

◇ Vérification de l'excision de PPAR γ dans les aortes des souris PPAR γ /LRP1 -/- et PPAR γ -/- au niveau des CML

○ Extraction ADN génomique

Les souris sont anesthésiées en intra-péritonéale par un mélange de Kétamine - Xylazine (200 μ l/ 30Kg) et perfusées dans l'apex du cœur avec une solution de PBSx1. L'aorte est rapidement prélevée et déposée dans du PBS x1 sur un lit de glace afin d'éviter la dégradation de l'ADN par les DNases. Après avoir enlevé toute la graisse autour de l'aorte elle est ouverte de manière à retirer la couche de cellules endothéliales à l'aide d'une pince. L'aorte est alors digérée toute la nuit au bain marie à 55°C dans 500 μ l/échantillon de solution contenant 1.6 mg/ml de protéinase K dilué dans un tampon de digestion (Tris 50mM, EDTA pH8 5mM, SDS 1%, NaCl 0.2M).

Le lendemain 500 μ l de phénol/chloroforme sont ajoutés à chaque échantillon et mélangé par vortex pendant 30 sec Les phases sont séparées par centrifugation 5 min à 14000 rpm. La phase aqueuse (supérieure) est récupérée délicatement de manière à ne pas prélever de phase intermédiaire. L'ADN est précipité avec 40 μ l d'acétate de sodium 3M et 2 volumes d'éthanol 100% froid pendant 20 min à -80°C. Le culot d'ADN obtenu après centrifugation est lavé avec de l'éthanol 70% puis après une nouvelle centrifugation, il est séché jusqu'à devenir transparent. L'ADN est alors repris dans 100 μ l d'eau stérile et conservé à 4°C.

○ PCR

1 μ l d'ADN sont incubés avec 1.25 U de DNA polymérase de *Thermus aquaticus* (Invitrogen) en présence de tampon 1X, de dNTP 0,3 mM et d'amorces 0.3 μ M dans un volume réactionnel de 50 μ l. Les amorces et le programme PCR utilisés pour l'amplification de l'ADN d'aorte de souris sont répertoriés dans les tableaux (MI-1 et -2).

Couple d'amorces d'excision	
ACS 103	AAT AGC TAG TCC ATG AAG AG
ACN 59	GTG ACC CCA TGC CTT TGA TGC ACA
Couple d'amorces contrôle	
ACS 103	AAT AGC TAG TCC ATG AAG AG
ACQ 287	AGA TTC TCA TGT TGA TTT CAT

Tableau MI-1: Séquences des amorces PCR pour la vérification de l'excision de l'exon 1 et 2 du gène PPAR γ

<i>Programme PCR PPARγ</i>		
1	94°C	5'
2	94°C	30s
3	55°C	30s
4	72°C	30s
	Reprise 35x à l'étape2	
5	72°C	2'
6	4°C	oo




Tableau MI-2 : Programme PCR d'excision de ppar γ

3.2.5. Régime proathérogène:

Les souris de 3 mois sont nourries par un régime riche en cholestérol et en acide cholique (Farine A03 (SAFE), 1.25 % Cholestérol, 0.5% Acide cholique, 21% Beurre) pendant 3 à 6 mois. Elles sont alors sacrifiées afin d'analyser les lésions athéroscléreuses.

3.3. Mesure de la pression artérielle chez les souris KO

Le principe de fonctionnement du dispositif est basé sur la méthode non-invasive (la pléthysmographie), ce qui a pour avantage de préserver les animaux lors d'expériences s'échelonnant sur plusieurs jours.

La mesure de pression se fait selon le même principe que pour la mesure de la pression artérielle chez un patient humain.

Une pression contrôlée est appliquée sur l'artère de la queue du rongeur par le gonflement d'un ballonnet, et, simultanément le rythme cardiaque est perçu par un détecteur. La pression augmentant le signal du rythme cardiaque diminue jusqu'à sa disparition. La pression est alors relâchée. Lorsque le signal du rythme cardiaque est de nouveau perçu, la valeur de pression correspond à la pression systolique. La pression artérielle est mesurée tous les jours sur une période de 15 jours.

La méthode de mesure indirecte nécessite l'utilisation d'un chauffage afin de permettre la vasodilatation de l'artère, pour augmenter la qualité des mesures (Figure MI-1).



Figure I-1 : Dispositif de mesure de la pression artérielle chez la souris

3.4. Caractérisation des lésions athéroscléreuses

3.4.1. Dissection

Pour l'analyse histologique, les souris ayant ou non subi un régime athérogène, sont anesthésiées par un mélange Xylazine/Kétamine (200µl/ 30Kg). Après perforation de l'oreillette droite, le cœur est perfusé au niveau du ventricule gauche par une solution de PBS x1 puis par du paraformaldéhyde (PFA) 4% diluée dans du PBS x1 pH7.4. Après fixation des tissus, chaque organe (cœur, foie, rein, poumon, vésicule biliaire) est prélevé et conservé dans du PFA 4% à 4°C. L'aorte entière est récupérée, de la crosse aortique jusqu'à la bifurcation iliaque, et nettoyée pour éliminer toute la graisse l'entourant.

Pour déterminer la présence de lésions athéroscléreuses, l'aorte est ouverte, rincée avec de l'éthanol 70% et colorée au rouge sudan IV (g de Sudan IV (Sigma-aldrich), Ethanol, acetone) qui met en évidence les lipides en rouge. Après décoloration à l'éthanol 80% et rinçage à l'eau, l'aorte colorée est prise en photo. La surface des lésions est alors déterminée par le logiciel Scion.

Pour déterminer la composition des lésions athéroscléreuses par histologie, l'aorte est fragmentée transversalement, en morceaux de 0.5 à 2 cm et incluse dans de la paraffine.

3.4.2. Coloration histologique

- *Inclusion en paraffine*

L'inclusion a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation progressive, par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant puis dans des bains d'histosol, avant d'être coulé dans un moule contenant de la paraffine fondue par chauffage et devenue liquide, qui infiltre alors tout l'échantillon.

Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

- *Coupe au microtome*

Les coupes du bloc de paraffine sont faites avec un microtome permettant de réaliser des tranches de section (coupes) de 5 µm d'épaisseur. Les coupes sont recueillies sur des lames de verre Superfrost (VWR, France) et maintenues en position avec une solution de gélatine sur lame.

- *Préparation des lames pour la coloration*

L'inclusion de l'échantillon dans la paraffine (nécessaire pour réaliser les coupes) implique son élimination préalablement à la coloration. En effet, la paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes comporte une étape de déparaffinage et de réhydratation. Cette étape est assurée par une succession de bains, d'abord dans un solvant permettant l'élimination de la paraffine (Histosol, Shandon) puis dans des alcools de titre décroissant, de 100 % (compatible avec le solvant précédent) jusqu'à 70 % (compatible avec l'eau), avant un bain dans l'eau pure assurant la réhydratation finale.

- *Coloration : Hématoxyline/ Eosine (H&E)*

La coloration H&E met en évidence, les noyaux en bleu, violet foncé à noir et le cytoplasme, le collagène, la kératine et les érythrocytes en rouge.

Les lames sont plongées dans une solution de d'hématoxyline de Harris pendant 3 min puis rincé à l'eau du robinet pendant 3 min et décoloré dans une solution d'alcool acide (1ml HCL 37% dans éthanol 70%) 2 sec. Après lavage à l'eau du robinet pendant 3 min les lames sont plongées dans un bain d'éosine 0.1% pH 4-5 pendant 30 sec et rincées à l'eau. Les échantillons sont alors déshydratés (éthanol 95% puis 100%) et montés entre lame et lamelle avec de l'Eukitt (Labonord).

- *Coloration : Trichrome de Masson*

Cette coloration met en évidence les noyaux en bleus, les cytoplasmes en roses/rouges, les hématies en rouges vifs et le collagène en vert.

Les lames préparées sont colorées par l'hématoxyline de Harris pendant 3 min, puis rincées à l'eau courante et colorées à la fuchsine ponceau (1 vol de fuchsine acide (1g F dilué dans 100ml eau) mélangé à 2 volumes de ponceau de xylydine (1g dilué dans 100ml d'eau acétifiée (d'acide acétique dilué au 1/100)) pendant 3 min. Après lavage à l'eau courante, les échantillons sont plongés pendant 3 min dans une solution d'acide phosphomolybdique à 5 mg/ml diluée dans l'eau distillée. A nouveau après une décoloration rapide à l'eau acétifiée les lames sont colorées par une solution de verte lumière pendant 3 min (10 mg/ml dans l'eau

acétifiée)). La décoloration se fait dans l'eau acétifiée. Les échantillons sont déshydratés et montés.

- *Coloration : Orcéine*

L'orcéine colore les fibres et lames élastiques en brun noir et les fibres de collagène en bleu. Après déparaffinage et hydratation des échantillons les lames sont incubées pendant 30 min dans une solution 1% orcéine (1g orcéine dilué dans 100ml éthanol 70% et 0.6ml HCl 37%) puis rincées 3 fois 3 min avec de l'eau déionisée et placées 1 min dans un bain d'éthanol 95% afin d'ôter l'excès de colorant. Les échantillons sont plongés dans une solution d'éthanol absolue pendant 15 min et décolorés pendant 10 min dans une solution d'alcool acide. Après rinçage à l'eau du robinet les lames sont colorées par l'aniline/orange G pendant 3 min (2.5g aniline bleu, 10g orange G, 5g acide phosphotungstique le tout dissout dans 500ml d'eau). Les lames sont alors rincées, déshydratées et montées.

- *Coloration : Von Kossa*

Cette coloration va permettre de mettre en évidence des sels de calcium en un précipité noir intense. En effet c'est sous l'action du nitrate d'argent que le cation métallique lourd se substitue au calcium, la réduction du sel d'argent permet ensuite de visualiser de l'argent métallique.

Les lames après hydratation et déparaffinage sont plongées dans un bain de nitrate d'argent (2.5%) et placées pendant 20 min sous une lampe de 60W. Après 3 lavages successifs à l'eau déionisée les lames sont incubées 1 min dans une solution de thiosulfate de sodium à 2.5%. Puis incubées, après 2 rinçages à l'eau, pendant 3 min dans une solution de safranine-O 0.05%. Le lavage à l'eau est suivi de la déshydratation des échantillons et de leur montage entre lames et lamelles avec l'eukitt.

3.4.3. Immunomarquage

- *Anticorps*

Anti-SPARC H-90 (IH :1/200) (Santa Cruz biotechnology (Tebu bio) ; sc-25574)

- *Immuohistochimie sur coupes transversales d'aortes de souris incluses dans la paraffine*

Les coupes transversales d'aortes incluses dans la paraffine sont déparaffinées par de l'Histosol (Shandon) et hydratées avec des bains successifs d'éthanol 100% puis 95% et enfin dans de l'eau. Les lames sont alors bouillies dans une solution de citrate de sodium 0.01M pH6 pendant 6 min à 750W. Une fois la solution refroidie, l'activité peroxydase endogène est inactivée par incubation des lames pendant 10 min dans une solution contenant 3% H₂O₂ diluée dans le méthanol. Après lavage de 3 min au PBS1x 0.05% tween 20, les sites non spécifiques sont bloqués pendant 1h avec du sérum normal 5%. L'anticorps primaire anti-SPARC dilué au 1/100 dans la solution de sérum normal est alors ajouté sur les coupes

pendant 1h. Les coupes sont ensuite lavées au PBS et incubées pendant 1 h avec un anticorps secondaire de chèvre anti-lapin biotinylé dilué au 1/200 dans le sérum normal. Après avoir ôté l'excédant d'anticorps secondaire au PBSx1 (3 lavages de 3 min), les coupes sont incubées avec le complexe ABC durant 30 minutes. Après 2 nouveaux lavages au PBS tween20 0.05% et un rinçage au PBS, les coupes sont incubées en présence du substrat peroxydase pendant 2 à 10 min. Finalement, les coupes sont rincées à l'eau, déshydratées et montées entre lame et lamelle avec de l'Eukitt.

Les coupes contrôles ont été traitées sans l'anticorps primaire en remplaçant l'anticorps primaire par du sérum de lapin.

3.4.4. Analyse transcriptionnelle

- *Prélèvement des échantillons pour une extraction d'ARN*

Les souris ayant subi un régime athérogène de 11 semaines à 6 mois sont anesthésiées par un mélange Kétamine - Xylazine (200µl/ 30Kg). L'abdomen de la souris est ouvert, l'aorte est rincée par perfusion de PBSx1 dans le cœur, puis prélevée rapidement et déposée sur une boîte de pétrie contenant du PBSx1 froid posée sur un lit de glace. L'aorte est alors nettoyée afin d'ôter la graisse qui l'entoure. Elle est ensuite plongée dans l'azote liquide et réduite en poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon. La poudre d'aorte est récupérée et mise dans un tube de 1.5 ml contenant 1 ml de TRIzol® Reagent (sigma). Le mélange est homogénéisé et incubé 5 min à température ambiante pour permettre la lyse cellulaire et une complète dissociation des complexes nucléoprotéiques. La suspension est conservée à -20°C jusqu'à extraction.

- *Extraction d'ARNm*

Après décongélation des échantillons sur la glace, on ajoute 200 µl de chloroforme et on homogénéise avant de centrifuger 15 minutes à 12000 rpm à 4°C. On obtient alors deux phases : l'une aqueuse comprenant les ARN totaux et l'autre organique (chloroforme et phénol) comprenant les protéines cellulaires et l'ADN. On récupère la phase aqueuse.

Les ARNm sont ensuite précipités en mélangeant la phase aqueuse à 500 µl d'isopropanol (10 minutes à température ambiante). Le culot d'ARN totaux est récupéré par centrifugation (10 minutes à 12000 rpm à 4°C), lavé avec de l'éthanol à 75% pour enlever toute trace d'isopropanol. Le culot est séché à température ambiante et repris dans 10 à 20µl (selon la taille du culot) d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (DEPC ou Nuclease Free Water : eau bi-distillée stérile permettant l'inhibition des RNases et protégeant ainsi les ARN totaux).

- *Dosage des ARN totaux et RT PCR*

Pour déterminer le volume d'extraction contenant 2 µg d'ARN totaux nécessaire à la RT, les ARN totaux sont dosés par spectrophotométrie UV à 260 et à 280 nm d'absorbance (Abs). Le rapport Abs 260 / Abs 280 donne un ratio exprimant la pureté des ARN.

Les ARN totaux extraits des aortes sont rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit «High Capacity cDNA Archive» (Applied Biosystems) selon les instructions du fabricant

- *PCR quantitative en temps réel*

La PCR quantitative consiste à comparer le nombre de transcrits d'au moins deux échantillons. Un échantillon sert de référence et la quantification des autres sera faite relativement à cette référence. La quantification repose sur la phase exponentielle d'amplification, au moment où le signal sort du bruit de fond et est significatif. Ce moment qui correspond à un certain nombre de cycles est appelé Ct (Threshold Cycle).

Un gène calibreur (*GAPDH*) est utilisé à chaque fois. Ce gène, dont l'expression n'est pas modifiée dans les différentes situations biologiques, permet d'éviter que des modifications de quantités d'ADNc dans l'essai soient analysées comme des différences d'expression.

Les analyses sont réalisées en utilisant le fluorochrome SYBR Green I (1X SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)), un intercalant fluorescent de l'ADN double brin.

Pour chaque gène d'intérêt, un couple d'oligonucléotides est choisi grâce au logiciel Primer Express (Perkin Elmer) (Tableau MI-3).

Le mélange réactionnel est composé de 5 µl d'ADNc à 5ng/µl, de 10 µl de Mix SYBR Green et de 1 µl d'amorces sens et antisens à 7,5 µM pour une concentration finale de 300 nM.

Les réactions de PCR en temps réel sont réalisées dans un appareil 7900 HT (Applied Biosystems). Chaque échantillon est analysé en duplicate. Le programme d'amplification est de 10 min à 95°C (dénaturation) suivi de 40 cycles de 15 s à 95°C puis 1 min à 65°C (hybridation et élongation respectivement)

<i>Gènes</i>	<i>Séquences</i>
Sox9	As: TCGTTCAGCAGCCTCCAGA S: AGCAAGAACAAGCCACACGTC
Cart1	As: CTGGATACATTGCTGTACATTTG S: CAATGGATAACTGCAACAATCTCAG
SPARC	As: GGGTCCTGGCACACACACA S: GAGGAGGTGGTGGCTGACAA
SFRP2	As: ACGCCGTTTCAGCTTGAAAT S: ACGACAACGACATCATGGAA
Wnt5a	As: CCTTCACCTGGATACCACCCA S: GCAGACCGAACGCTGTCAT
GAPDH	As: CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT S: TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
ALP	As: TCTGGTGGCATCTCGTTATC S: CCTGAAACTCCAAAAGCTC

Tableau MI-3 : Séquences des amorces de PCR quantitative

3.4.5. Analyse protéique

- Préparation des lysats cellulaires d'aorte entière
- Analyse par Western-Blot

(Cf partie 3.2.4)

3.4.6. Hybridation in situ (Figure MI-3)

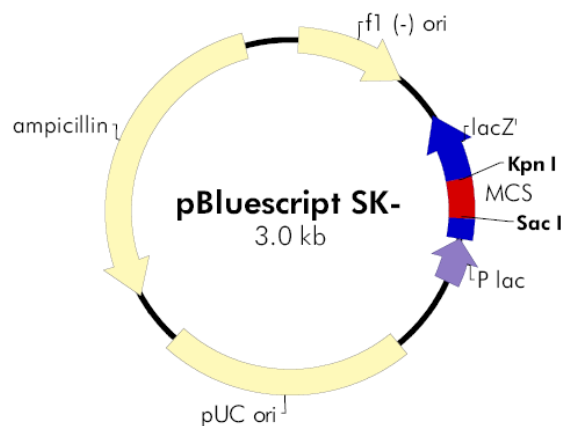
- Préparation des sondes
 - Clonage du plasmide contenant la séquence de la sonde à utiliser

Amplification des inserts par PCR

Les séquences des sondes ont été synthétisées par PCR à partir d'une matrice nucléotidique d'ADNc contenant la séquence à amplifier. Cette méthode permet des polymérisations successives initiées par deux oligonucléotides complémentaires à la matrice (Tableau MI-4) et par la Taq polymérase de haute fidélité qui minimise les mutations (Kit High expand fidelity dNTPack, Roche). Afin de faciliter l'insertion des produits PCR dans le vecteur pBluescript II SK (Figure MI-2), les amorces ont été conçues de façon à ajouter les sites de restriction SacI et KpnI, respectivement aux extrémités 5' et 3' des séquences amplifiées. Les amorces utilisées sont celles décrites dans le tableau MI-4.

Gènes	Séquences
Sox9	F: ATATAAGAGCTCAAGATGACCGACGAGCAGGAGAA R: CTAAAGGTACCCCTGAGATTGCCAGAGTGCT
CART1	F: ATACATGAGCTCAGGAGTTTCTCAGTGAAGGAGTC R: GAATTCGGTACCAGTTCGACAGAGGCACGGATGAAAA

Tableau MI-4 : Séquences des amorces PCR



FigureMI-2 : Représentation du plasmide pBSK-

Programme PCR Sox9/Cart1		
1	94°C	2'
2	94°C	15s
3	60°C	30s
4	72°C	2'
	Reprise 9 à l'étape 2	
6	94°C	15s
7	60°C	30s
8	72°C	2'
9	Reprise 19 l'étape 6 (+ 5 sec / cycle)	
10	72°C	7'
1	4°C	oo

Tableau MI-4 : Programmes de PCR d'amplification de l'insert

Purification des produits PCR

L'isolement des fragments amplifiés se fait par électrophorèse des produits PCR dans un gel d'agarose. Les échantillons sont mélangés avec un tampon de charge (0.25% bleu de bromophenol, 0.25% xylène cyanol et 30% glycérol) afin d'être ensuite déposés dans un gel d'agarose (1% d'agarose polymérisé dans une solution de tampon TAE (Tris-HCl 10mM ; EDTA 1 mM ; acide acétique froid; pH 8) contenant du bromure d'éthidium (BET)). Après migration, les fragments d'ADN d'intérêts sont identifiés en fonction de leur taille sous lampe UV et découpés du gel à l'aide d'un scalpel. L'ADN est extrait de l'agarose à l'aide d'un kit de purification « Nucleospin Extract II ». Le fragment du gel d'agarose est dissous dans une solution de NT à 50°C pendant 5 à 10 min puis la solution est filtrée sur une matrice de silice retenant les brins d'ADN. Les fragments purifiés sont élués de la colonne avec le 20µl de tampon NE après lavage de la résine avec 600 µl de tampon NT3. L'ADN est alors dosé puis digéré.

Digestion

Afin de permettre la ligation entre le plasmide et l'insert contenant des extrémités compatibles, il est nécessaire de digérer le fragment PCR, sur les deux sites de restrictions volontairement ajoutés dans le design des amorces PCR. Le plasmide est également digéré par les deux mêmes enzymes de restriction. Après la digestion enzymatique par Sac1 et Kpn1, les fragments digérés doivent être purifiés afin d'éliminer les enzymes de restriction et les petits

brins d'ADN clivés. Cette séparation est réalisée par extraction du gel d'agarose comme précédemment cité.

Ligation (Kit Takara)

La ligation du vecteur et de l'insert a été faite en utilisant 3 ratios insert/vecteur différents (1 :1, 2 :1, 5 :1). La quantité de vecteur est fixée à 50ng et la quantité d'insert à ajouter est calculée selon la formule Promega :

$$(\text{ng}) \text{ insert} = \frac{(\text{ng}) \text{ vecteur} \times (\text{kb}) \text{ taille de insert}}{(\text{kb}) \text{ taille du vecteur}} \times \text{ratio}$$

Le mélange insert et vecteur est complété à 5µl avec un tampon TE. La première solution est mélangée à 5µl de la solution I et incubée toute la nuit à 4°C.

Transformation des bactéries DH5α

Les 10µl de mélange de ligation sont mis en contact avec 100 µl de bactéries DH5α compétentes pendant 20 minutes dans la glace. Après une incubation d'une demi-heure sur glace, les bactéries fragilisées sont placées pendant 45 secondes à 42°C. Ce choc thermique favorise l'entrée des vecteurs dans les bactéries. 890 µL de milieu LB sont ajoutés et le mélange est incubé 1 heure à 37°C, permettant ainsi la reprise de la culture bactérienne et l'expression du gène de la résistance à l'ampicilline. Les bactéries ainsi transformées sont alors étalées sur un milieu gélosé (15 g d'agar pour 1 litre de milieu LB : NaCl 1%, Bactotryptone 1%, Extrait autolytique de levure 0,5%, pH ajusté à 7,4 avec NaOH 10 N, Sigma Aldrich) contenant de l'ampicilline (50 mg/mL, Promega). L'ampicilline contenue dans la gélose permet de sélectionner les bactéries résistantes à cet antibiotique, c'est-à-dire les bactéries contenant un plasmide. Ces boîtes de gélose sont alors placées dans une étuve à 37°C.

Amplification des bactéries transfectées par le plasmide : Mini-Préparation

Cette étape permet, après sélection des bactéries ayant été transformées par le plasmide et donc résistantes à l'ampicilline, d'augmenter la quantité du plasmide d'intérêt. Ces colonies sont déposées dans 3 mL de milieu Luria-Bertani (LB) contenant de l'ampicilline (1 clone bactérien / 3mL). L'amplification des clones est réalisée sous agitation toute la nuit et à 37°C.

Extraction de l'ADN bactérien (QIAprep spin Miniprep kit, Quiagen)

Après centrifugation de 1.5ml de la culture bactérienne et élimination du surnageant, les bactéries sont remises en suspension dans 100µl de tampon P1 puis lysées en utilisant du

tampon de lyse P2. Après 5 min à température ambiante, 100µl de tampon P3 sont ajoutés à la suspension, mélangé et incubé 10 min à -80°C. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation pendant 6 min. à 13000rpm et le surnageant est récupéré. 500 µl de phénol/chloroforme sont ajoutés au surnageant, la suspension est mélangée par vortex pendant 20 sec et centrifugée 2 min à 13000 rpm. La phase supérieure contenant l'ADN est récupérée, précipité avec 1ml EtOH 100 % puis centrifugée 10 min à 13000 rpm. Le culot d'ADN est alors dissous dans 30µl d'eau stérile et dosé.

Carte de restriction

La présence de l'insert dans le plasmide est vérifiée par digestion enzymatique. 1,5 µL d'ADN sont ajoutés à 2 µL de tampon de digestion (10X) ainsi que 5 unités de chaque enzyme de restriction coupant dans le plasmide et/ou dans l'insert. Le volume réactionnel est ramené à 20 µL avec de l'eau stérile et le milieu de réaction est incubé 3 heures à 37°C. Le produit de digestion est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant du BET et les tailles des fragments déterminées à l'aide d'un marqueur de taille. Si le plasmide contient l'insert en entier et dans le sens 5'-3', l'absence de mutation est vérifiée par séquençage (GATC biotechnologie, Allemagne).

- *Transcription in vitro des sondes ARN marquées à la digoxigénine*

Les sondes utilisées lors de l'hybridation *in situ* sont synthétisées par transcription *in vitro*. Le marquage de l'ARN synthétisé est réalisé par incorporation, lors de la transcription, d'UTP marqué à la digoxigénine (DIG). Durant ces étapes, il est nécessaire de travailler dans un environnement exempt de RNase, et à des températures ne dépassant pas 4°C afin d'éviter une dégradation rapide des ARNs. Le système DIG de marquage non radioactif utilise la digoxigénine, un haptène stéroïde qui permet de marquer l'ARN néosynthétisé. Pour produire des ARNs marqués par la DIG, l'ADNc cloné est transcrit *in vitro* par les ARN polymérase T7 et T3, en présence d'UTP marqué à la DIG. Leur détection est réalisée grâce à un anticorps antidigoxigénine dont le fragment Fab est couplé à une enzyme ; la phosphatase alcaline. Son activité enzymatique est visualisée par son action sur un substrat spécifique : le NBT-BCIP (nitroblue-tetrazolium, 5-bromo 4-chloro 3-indolylphosphate) (Roche Molecular) provoquant une réaction colorée (Figure3).

Linéarisation du plasmide

La linéarisation du plasmide est nécessaire pour une bonne transcription de la sonde. L'enzyme de restriction est choisie de telle manière à ce qu'elle coupe qu'une seule fois dans le vecteur à distance des sites d'initiation de la transcription (T7 et T3). Pour cela 5 µg de plasmide sont ajoutés à 5µL de tampon de digestion (10X), et 25 unités d'enzyme de restriction (5u/µg d'ADN). Le mélange, pour un volume final de 50 µL, est complété avec de l'eau stérile. Après une digestion enzymatique de 3 heures à 37°C, l'enzyme est inactivée 15

min à 65°C. L'ADN est purifié par phénol/chloroforme et précipité par 1/10 de volume d'acétate de sodium et 2.5 volumes d'EtOH 100% froid. Après 15 min à -80°C le mélange est centrifugé 30 min à 12000rpm et à 4°C. Le culot est alors lavé dans 0.5 ml EtOH 70 % et centrifugé 15 min. Le culot est hydraté dans 12.5 µl d'eau stérile. La linéarisation du plasmide est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.

Transcription *in vitro*

Le plasmide linéarisé (1µg) est mélangé aux trois nucléotides triphosphate dont les dUTP sont marqués (1X final) (Roche) ainsi qu'au tampon de transcription de l'ARN polymérase (1X final) (Promega). Les ARN polymérases T7 ou T3 (Roche Molecular) sont ensuite rajoutées à hauteur de 2 UI / µL. Afin de limiter la dégradation des ARN (RNAsin), un inhibiteur de RNase est ajouté (1 UI / µL final) (Roche Molecular) puis le volume est ajusté à 20 µL avec de l'eau stérile. La réaction de synthèse des ARN marqués est alors réalisée à 37°C pendant 2 h. On obtiendra 2 sondes RNA, une des sondes correspond à l'antisens de l'ARN messenger synthétisé *in vivo*, alors que l'autre est la copie conforme de l'ARN messenger et ne pourra donc pas s'hybrider avec ce dernier. Ce type de sonde sert de contrôle négatif, permettant de vérifier la spécificité de la ribosonde.

Purification des produits de transcription

Aux produits de transcription sont ajoutés 1µl tRNA 1 mg/ml, 2.5 µl de chlorure de lithium 4M et 75µl d'éthanol absolu froid. Le mélange est précipité 15 min à - 80°C. La solution de ribosondes est ensuite centrifugée à 12 000rpm pendant 30 minutes à une température de 4°C. Le culot ainsi obtenu est à nouveau dissout dans 22µl eau stérile et précipité au chlorure de lithium 4M comme précédemment. Le culot obtenu est lavé à l'éthanol à 70% puis centrifugé à 15 min à 12000 rpm et à 4°C. Après séchage, la ribosonde est reprise dans 20 µL d'eau stérile et sa qualité est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.

▪ *Préparation des coupes histologiques*

Les souris sont préparées et fixées au paraformaldéhyde 4% (PFA) comme décrit ci-dessus. Les aortes sont prélevées rapidement, déposées dans une boîte contenant du PBS x1 stérile et nettoyées de manière à ôter toute la graisse extérieur. Les aortes entière sont coupées en 5 morceaux de la crosse aortique jusqu'à la bifurcation iliaque et incluses dans l'OCT. Le bloc solide est alors conservé à -81°C.

Les coupes transversales d'aorte, faite sur un cryostat, sont de 10 µm d'épaisseur et déposées sur des lames Superfrost Plus (VWR, France) puis conservées jusqu'à utilisation à -80°C.

▪ *Hybridation *in situ**

Prétraitement

Les coupes tissulaires sont décongelées 30 min à température ambiante et fixées 10 min dans du paraformaldéhyde 4% (PFA). L'excédent de PFA est éliminé par 2 lavages de 10 min dans du PBS x1. Les lames sont alors incubées 10 min dans une solution d'acétylation et lavées 2 fois 10 min par du

Préhybridation

La préhybridation prépare les coupes à l'hybridation en bloquant les sites non spécifiques où pourraient s'hybrider la ribosonde. Les coupes sont placées 10 minutes dans le tampon d'acétylation (Triéthanolamine-HCL 0.1M pH8, Anhydride acétique) afin d'empêcher l'action des RNAses endogènes. L'excès de tampon d'acétylation est éliminé par 2 lavages de 10 min dans un tampon SSC 2x (Salines Sodium Citrate) (NaCl 0.3M, Citrate de sodium 30 mM). Les lames sont alors déshydratées par des bains successifs d'1 min dans l'éthanol 60%, 75%, 95%, 100%, puis dans le chloroforme et enfin dans un bain d'éthanol 100% et 95 %. Les lames sont alors séchées sous la hotte pendant 1 heure.

Hybridation

Les ribosondes sont préalablement dénaturées à 70°C pendant 10 min et rapidement transférées dans la glace. Cette étape permet d'éliminer toutes les structures secondaires de l'ARN qui pourraient empêcher l'hybridation de la sonde. A 200 µL de tampon d'hybridation (formamide déionisé 50%, solution de sel 1x, solution de Denhardt's 1X, tRNA (1 mg/ml), sulfate de Dextran 10%) préalablement chauffés à 72°C est rajouté 1µl à 1 µg/ml de ribosonde. 100µl de ce mélange sont déposés sur chaque lame ensuite recouverte d'une lamelle. L'hybridation est réalisée à 65°C (température d'hybridation spécifique des sondes utilisées), pendant 14 heures dans une atmosphère humide empêchant ainsi l'assèchement des coupes tissulaires.

Lavages stringents

Durant cette étape, permettant d'éliminer l'excès de sonde, les lames sont plongées pendant 15 min dans un tampon de lavage (Formamide 50%, SSC 1x, tween-20 0.1%) préchauffé à 65°C, jusqu'à ce que les lamelles se décollent. 2 bains de 30 min dans le tampon de lavage à 65°C garantit la spécificité de liaison de la ribosonde. Enfin, 2 derniers bains dans une solution MABT (acide maléique 0.1M pH 7.5, NaCl 0.15M, Tween-20 0.1%) sont ensuite effectués afin de ramener les lames à température ambiante.

Révélation

Les lames sont recouvertes par 100µl pendant 1 heure d'une solution de blocage (MABT, solution de blocage à 2%, sérum de chèvre normal 20% dé-complémenté). Cette étape permet de saturer les sites non spécifiques pouvant être reconnus par l'anticorps. L'anticorps anti-DIG

est dilué au 1 / 2000ème dans la solution de blocage et déposé sur chacune des lames. L'incubation se fait à 4°C toute la nuit. Le lendemain les lames sont lavées 5 fois 20 min dans le tampon MABT afin d'éliminer les anticorps qui ne se sont pas fixés, puis 2 fois 10 min dans le tampon NTMT (NaCl 100mM, Tris 100mM pH 9.5, MgCl₂/6H₂O 50mM, Tween-20 0.1%). La solution de révélation est préparée à partir de tampon NTMT auxquels sont ajoutés 3.5µl/ml de nitrobleu tetrazolium (NBT) et 3.5 µl/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) et 100 µL de ce mélange sont déposés sur chaque lame. Après incubation à température ambiante jusqu'à apparition d'une coloration violacée (environ 1 à 2 jours après), la réaction enzymatique est arrêtée par rinçage des lames au PBS 1x. Les coupes marquées sont montées avec l'E-kitt puis stockées. L'observation est effectuée sur microscope Leica en fond clair.

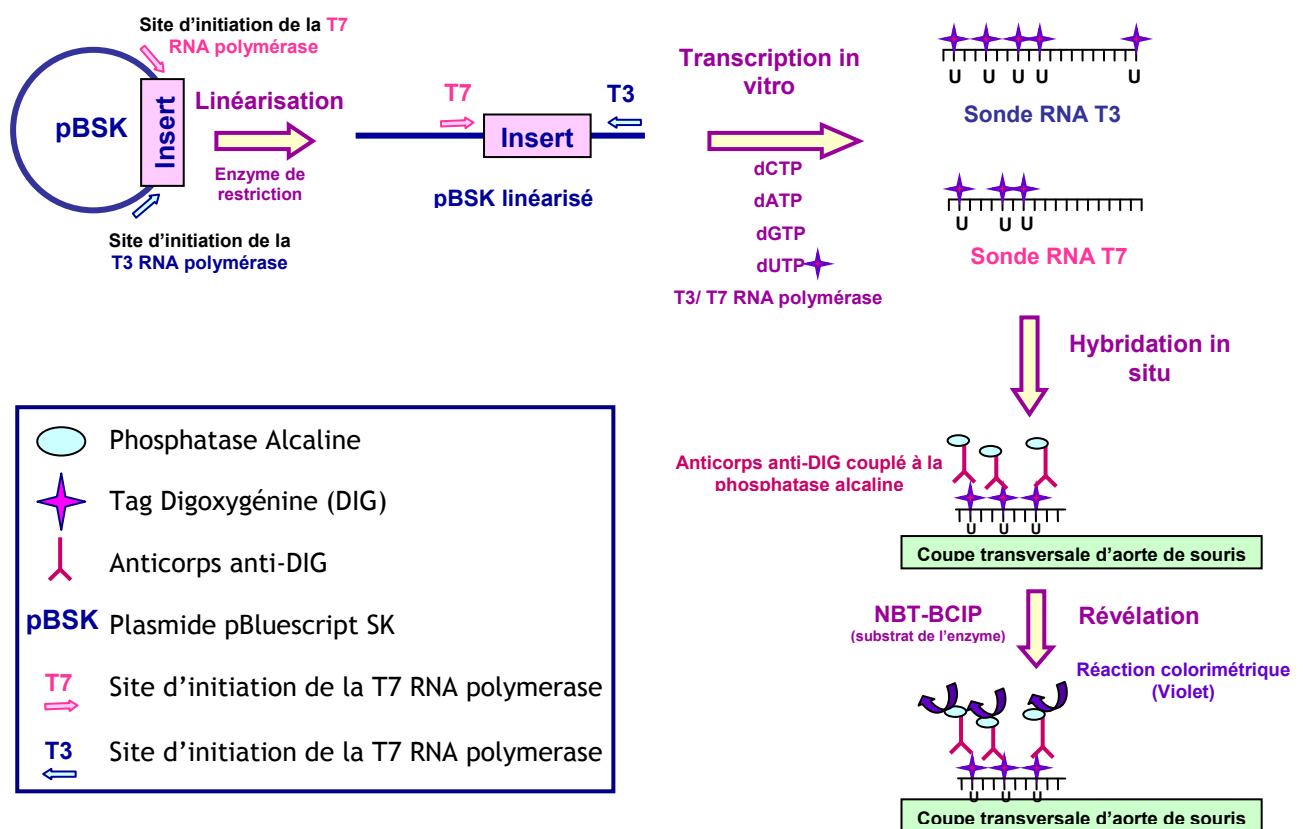


Figure MI-3 : Principe de l'hybridation in situ (DIG : Digoxigénine, NBT-BCIP : nitrobleu-tetrazolium, 5-bromo 4-chloro 3-indolylphosphate)

3.5. Synthèse de protéine recombinante humaine SPARC

Pour produire la protéine recombinante humaine SPARC nous utilisons le système baculovirus décrit par l'équipe du Dr Sage (Bradshaw et al., 2000).

3.5.1. Construction par clonage du plasmide PacGP67-SPARC

La construction du plasmide pAcGP67-B/SPARC est obtenue par clonage (cf méthode ci-dessous Figure 4)

L'amplification de l'insert codant pour SPARC est effectuée par PCR en utilisant les amorces répertoriées dans le tableau (MI-5) selon le programme PCR suivant (Tableau MI-6). Les amorces ainsi que le plasmide (Figure MI-4) vont être digérés par deux enzymes de restriction *BamH1* et *Bgl2* afin d'obtenir le plasmide d'intérêt après ligation. La séquence du plasmide est alors vérifiée par une carte de restriction et par séquençage dans les deux sens.

Gènes	Séquences
SPARC	S: TAATTAGGATCCGCCCTCAGCAAGAAGCCCTGCC As: GCGTTCAGATCTTTAGATCACAAAGATCCTTGTCGATA

Tableau MI-5 : Séquences des amorces PCR

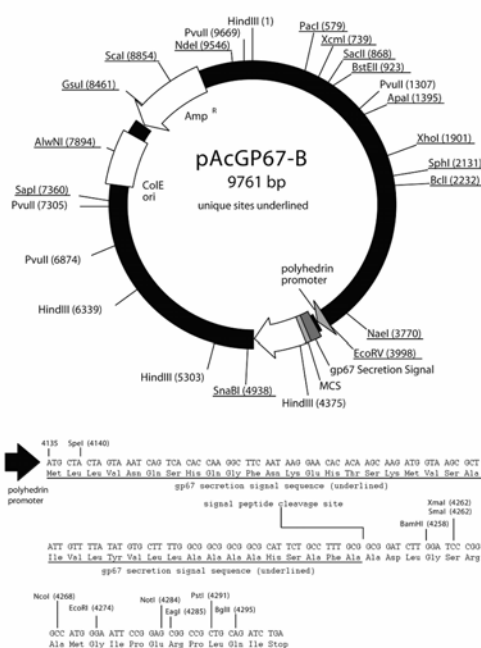


Figure MI-4 : Représentation du plasmide pAcGP67-B

Programme PCR		
SPARC		
1	94°C	5'
2	94°C	30s
3	55°C	30s
4	72°C	30s
Reprise 35x à l'étape2		
5	72°C	2'
6	4°C	oo

Tableau MI-6 : Programmes de PCR d'amplification de l'insert codant pour la protéine SPARC

3.5.2. Production de SPARC dans le milieu de culture des cellules par le baculovirus

Le baculovirus recombinant est produit par la plate forme Baculovirus de l'IGBMC (Illkirch). Le baculovirus SPARC est généré par transfection. L'infection des cellules d'insecte SF9 va produire la protéine SPARC et la sécrétée dans le milieu de culture. Ce milieu conditionné enrichi en SPARC est analysé toutes les 24h par Western-blot afin de déterminer le temps d'infection nécessaire pour produire une grande quantité de SPARC recombinant.

3.6. Test d'activation de Sox9 et Cart1 à la luciférase

3.6.1. Clonage des promoteur de Sox9 et Cart1

Le clonage des promoteurs s'est fait à partir d'ADN génomique de souris. Les régions des promoteurs de Sox9 et Cart-1 ont été amplifiées par PCR avec une sorte de Taq polymérase qui minimise les mutations (Kit High expand fidelity dNTPack, Roche). Les amorces utilisées

Amorces	Localisation*	Séquences	Taille de l'amplicon
Cart1 Anti sens	-6pb	5'- TAACTCGAGGGAAAGGCTGTCCGCGAGCTCTCC -3'	/
Cart1 sens	-1462 pb	5'- TAAACGCGTGATCGGTGGCAGAGACCTCCCTTG -3'	1462pb
Sox9 Anti sens	-54 pb	5'- TAACTCGAGCTGGGGCTCCTCTTCCCTCAGCTG -3'	/
Cart1 sens	-2090 pb	5'- TAAACGCGTTTTGTAAATCTCTTAAACTCGTAAACAG -3'	2036pb

Tableau MI-4 : Séquence des amorce pour l'amplification par PCR des promoteurs Sox9 et Cart1

Les séquences des promoteurs ont été insérées entre les sites *MluI* et *XhoI* du plasmide pGI3-Basic (Promega), en amont du gène de la luciférase (Figure MI-5) La ligation (Kit Takara) du vecteur et de l'insert a été faite avec le kit Takara selon les recommandations du fournisseur

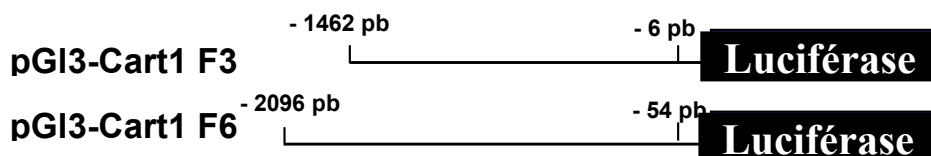


Figure MI-5 : plasmides pGI3-Sox9 et Cart1

3.6.1. Co-Transfection au phosphate de calcium

Les HEK293 ont étéensemencées à une densité de 80.000 cellules/puits dans une plaque 6 puits et transfectées lorsqu'elles ont atteint 40-60% de confluence. La co-transfection a été faite par la technique au phosphate de calcium. Le vecteur pGl3-Sox9 ou -Cart1 (300ng) et pCMV-SPORT- β -gal (Promega) (100ng) ont été mélangés à la solution de CaCl₂ (2.5 mM) et ajouté, goutte à goutte, à la solution HBS 2X (140mM NaCl ; 1,5 mM Na₂HPO₄.2H₂O ; 50mM Hepes, pH 6.9). Le mélange a été incubé pendant 30 min à température ambiante et ajouté goutte à goutte au milieu de culture des cellules pendant 1 nuit. Après 20 h les cellules ont été stimulées par rSPARC ou rWnt5a.

3.6.2. Test luciférase

Les cellules ont été lavées une fois avec du PBS et lysées 5 minutes à température ambiante par 100 μ L du tampon de lyse (25mM Trisphosphate pH 7,8 ; 2mM EDTA ; 1 mM DTT; 10% glycérol, 1% Triton® X-100). Le tapis cellulaire a été centrifugé à 4°C pendant 5 minutes à 12000g. Pour éviter une dégradation de la luciférase par la chaleur, les tubes sont placés immédiatement sur la glace. Pour chaque échantillon, 10 μ L de surnageant sont déposés en duplicate dans une plaque 96 puits. La mesure de l'activité luciférase est réalisée après avoir ajouté le tampon de lecture luciférase (470 μ M luciférine, 530 μ M ATP, 270 μ M Coenzyme A ; Tampon : 40mM Tris-phosphate ; 2.14mM MgCl₂ ; 5.4mM MgSO₄; 0.2mM EDTA ; 66.6mM DTT). Une réaction d'oxydation se produit lorsque la luciférase est en contact avec son substrat, la luciférine. Cette réaction entraîne l'émission de photons, facilement quantifiables. Le luminomètre pour microplaque permet l'injection automatique de 100 μ L de substrat par puits et la détection immédiate de l'émission de lumière (cumulée pendant la seconde qui suit l'injection). Les résultats obtenus sont normalisés par rapport à la quantité de protéines et par l'activité de la β -galactosidase qui est mesurée après une heure d'incubation à 37°C à l'abri de la lumière et en présence du tampon de lecture de la β -galactosidase (PBS, MgCl 1mM, X-gal 0.5mg/mL (Promega)).

3.7. Interaction SPARC-LRP1

3.7.1. Immunocytochimie par immunofluorescence indirecte.

L'expression de protéines de SPARC à l'état basal a été étudiée par immunofluorescence sur les lignées MEF LRP^{+/+} et MEF LRP^{-/-}. Les cellules sontensemencées sur lamelles à 5000 cellules par puits d'une plaque 24 puits. Après 24 à 48 h, les cellules sont à 40% de confluence, la plaque est mise en chambre froide à 4°C sur la glace. Le milieu de culture est alors retiré

et les cellules sont lavées 1x par du PBS froid. Une saturation des sites de fixation non spécifiques est réalisée par incubation des cellules avec une solution à 1% de BSA diluée dans du PBS pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules sont alors lavées et incubées avec des anticorps primaires dilués au 1/100 dans la solution de saturation. Cette incubation se fait à 4°C pendant 3 heures. Après 3 lavages au PBS x1 3 fois, les cellules sont fixées pendant 45 min dans une solution de PFA 4 % diluée dans du PBS 1x. Après lavage 1 fois avec du PBS x1, les anticorps secondaires anti-Ig de lapin couplés à un fluorophore (Alexa 488), sont dilués au 1/500 dans une solution de BSA 1% et incubés avec les cellules pendant 2 h à 4°C. Enfin, les cellules sont lavées par du PBS x1 3 fois, incubées 5 min avec une solution de DAPI 1/10000 et rapidement rincées à l'eau. Les lamelles sont séchées, montées sur une lame avec une goutte de Vectashield puis scellées au vernis à ongle. Les lames sont observées grâce à un microscope à fluorescence (Leica DMRX).

3.7.1. Fractionnement cellulaire

Le fractionnement subcellulaire a été réalisé sur les cellules MEF LRP+/+ et MEF LRP-/- à 80% de confluence sur une boîte de pétrie de 100cm². Les cellules sont récupérées, centrifugées et lavées avec un tampon PBS 1X froid. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du tampon d'extraction A (10mM HEPES pH7.4, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 250mM Sucrose, 50mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 25mM βglycerophosphate) contenant des inhibiteurs de protéases (10µg/ml leupeptin, 0.5mM PMSF, 2.8µg/ml Aprotinin, 1mM DTT) et lysées par homogénéisation à la seringue 22G. Le lysat cellulaire est alors centrifugé 5 min à 890 g et à 4°C. Le surnageant constitue le PNS (lysate cellulaire dépourvu de la fraction nucléaire) et le culot la fraction nucléaire.

La fraction nucléaire est dissoute dans 100µl de tampon C (20 mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 % (v/v) glycerol, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 0,42 M NaCl, 50 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 25 mM β glycerophosphate) contenant des inhibiteurs de protéases (Pepstatine 5µg/ml, Leupeptine 10µg/ml, PMSF 0,5mM, Aprotinine 2,8 µg/ml, DTT 1mM, ALLN 20mg/ml) et incubée pendant 1h30 à 4°C sous agitation sur la roue. Le temps écoulé, la solution est ultracentrifugée à 4°C pendant 40 minutes à 50000rpm, le surnageant de l'ultracentrifugation est récupéré et constitue la fraction nucléaire.

Le PNS quant à lui est récupéré et ultracentrifugé 45 min à 100000g et à 4°C afin de séparer la fraction membranaire (le culot) de la fraction cytosolique (surnageant). Le culot est dissout dans du tampon SDS (150mM Tris-HCl pH 6.8, 100mM NaCl, 1% SDS, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 50mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 25mM glycérophosphate) contenant des inhibiteurs de protéases précédemment cités.

Les concentrations protéiques de chaque fraction sont déterminées par la technique colorimétrique de Bradford contre une gamme étalon de BSA et analysées par Western-Blot.

3.7.2. Immunoprécipitation

▪ Préparation du lysat cellulaire

Les cellules HEK 293 (Human embryonic kidney 293) sont rincées par du PBS x1 froid, lysées dans un tampon de lyse (0.1% SDS, 150mM NaCl, 1% Triton x-100, 10mM HEPES, 2mM EDTA, 50mM NaF, 2mM Na₂VO₄, 0.1% sodium deoxycholate, 1.53mM Na₂HPO₄, le pH est ajusté à 7.4 avec NaH₂PO₄, 0.5mM PMSF, 2.8µg/ml aprotinin, 10µg/ml leupeptin, 5µg/ml Pepstatin) et homogénéisées avec une seringue 23g. Après 30 min sur la glace les lysats cellulaires sont centrifugés pendant 40 minutes à 13000 rpm et à 4°C. Les surnageants sont prélevés et dosés par la technique colorimétrique de Bradford (Bio-Rad). La lecture au spectrophotomètre à 595 nm est effectuée contre une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA : 0 à 2 mg/ml).

▪ Préparation des billes d'agarose

Les billes d'agarose couplées à la protéine A (Sigma) sont lavées 3 fois avec du tampon de lyse et incubées pendant 2h sur la roue avec 4µg d'anticorps anti-LRP1 par échantillon dilué au 1/10 dans le tampon de lyse. Pour ôter l'excédant d'anticorps les billes/anticorps sont lavés 3 fois avec du tampon de lyse. Elles sont alors réparties équitablement dans chaque tube échantillon et centrifugées. Le surnageant est ôté et substitué par le lysat cellulaire de Hek 293.

▪ Immunoprécipitation et analyse

L'interaction billes/anticorps anti-LRP1 et LRP1 des cellules de Hek se fait à 4°C en rotation toute la nuit. Le lendemain matin les échantillons sont centrifugés et le surnageant récupéré. Afin d'ôter les interactions non spécifiques les billes/anticorps/protéines sont lavés 2x successivement par des tampons TETN (25mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM EDTA, 1% triton x-100, 1mM NaF, 200µM Na₃VO₄) contenant des concentrations de sel décroissant (500mM NaCl puis 250 mM NaCl) puis 2x avec du Tris-EDTA.

Le complexe bille/anti-LRP1/LRP1 est mis au contact toute la nuit avec le milieu conditionné enrichi en SPARC. Le lendemain le complexe est lavé comme précédemment afin de limiter les interactions non spécifiques par des solutions de TETN 500, TETN 250 et TE complétées par des inhibiteurs de protéases (PMSF 0.5mM, leupeptin 10µg/ml et aprotinin 2.8 µg/ml). Après l'ajout de 15µl par échantillon de tampon Laemmli/1/20 β-mercaptoéthanol et dénaturation 10 min à 96°C les interactions sont détruites. Les protéines immunoprécipitées sont alors analysées par western-blot.

3.8. Interaction Wnt5a (cMyc)-SFRP2

3.8.1. Immunoprécipitation (Cf partie 3.6.5)

3.9. CHIP PPAR γ / SFRP2

(E. Soutoglou and I. Talianidis *Science* **295** (2002))

3.9.1. Fixation et lyse des cellules :

Les cellules à une densité de 6.10^8 sont fixées à l'aide de 1% de formaldéhyde pendant 1 min à température ambiante. Puis le formaldéhyde en excès est neutralisé à l'aide de Glycine (1.67M).

Les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS, pH 7.0 froid, grattées dans du PBS puis centrifugées à 300xg pendant 5 min. Le culot est repris dans du tampon Hepes 25mM (Hepes, pH 7.8, 25mM, MgCl $_2$ 1.5mM, KCl 10 mM, NP40 0.5%, DTT 1mM), incubé 10 min à 4°C puis centrifugé 5 min, 800xg à 4°C.

Le culot est homogénéisé dans du tampon Hepes 50mM (Hepes, pH7.9 50mM, NaCl 140 mM, EDTA 1mM, Triton X-100 1%, Na-deoxycholate 0.1%, SDS 0.1%), soniqué (15x10 sec -30 sec. Off) puis centrifugé 15min à 12000xg à 4°C. Le surnageant est utilisé pour une immunoprécipitation.

3.9.2. Immunoprécipitation

Le protocole d'immunoprécipitation est identique à celui décrit par ailleurs à l'exception du tampon de lavages (Hepes, pH7.9 50mM, NaCl 500 mM, EDTA 1mM, Triton X-100 1%, Na-deoxycholate 0.1%, SDS 0.1%). Puis le complexe ADN-Protein est élué des billes à l'aide d'un tampon Tris 50mM pH 8.0, EDTA 1mM, SDS 1% pendant 10min à 65°C.

L'éluât est ensuite additionné de NaCl 4 M et de RNase 10 μ g/ml, incubé 5 heures à 65°C et ensuite incubé 20 min à 37°C. Après cette incubation, l'éluât est traité à l'aide de protéinase K 50 μ g/ml, EDTA 1mM pendant 2 heures à 42°C.

L'extraction de l'ADN de l'éluat est effectuée suivant la méthode de Parekh et Manniatis (1999) avec une solution de phénol/ chloroforme/ isoamyl alcool (25 :24 :1) dans du tampon Tris 10mM pH8.0, EDTA 1mM. L'ADN de la phase aqueuse est précipité à l'aide d'acétate de Sodium 3M dans de l'éthanol 100% à -20°C pendant 30 min.

L'analyse de l'ADN obtenue se fait par PCR en temps réel. 10 à 50 ng d'ADN sont amplifiés par PCR en utilisant du SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) suivant les recommandations du fournisseur.

Partie 1 :

Résultats

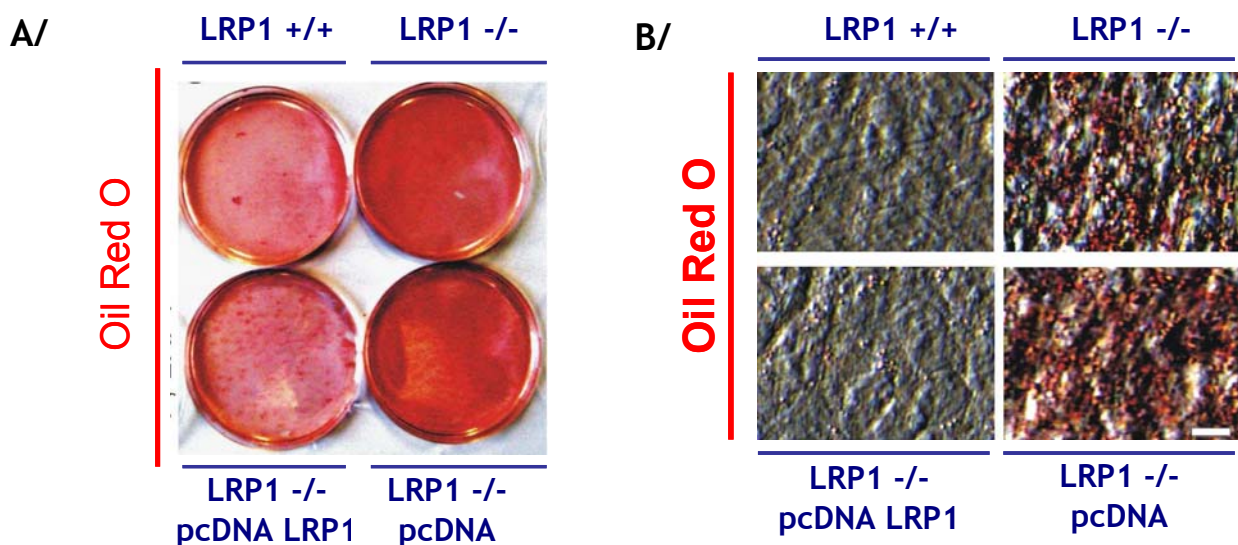
4. Résultats

4.1. LRP1 dans la différenciation cellulaire

4.1.2. LRP1 dans le contrôle de la différenciation adipocytaire

Pour déterminer l'implication de LRP1 dans le contrôle de la différenciation adipocytaire *in vitro*, nous avons utilisé un protocole bien établi dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) basé sur un mélange adipogénique, contenant de l'insuline, de la dexaméthazone, de l'isobutylmethylxanthine (IBMX) et un agoniste de PPAR γ , la rosiglitazone, pendant 10 jours [Student et al.,1980]. Les MEF LRP1 $-/-$, utilisées dans cette expérience, sont des cellules embryonnaires immortalisées et prélevées chez l'embryon déficient en LRP1 [Herz et al.,1992]]. De plus pour s'assurer que l'effet observé provient de LRP1 nous avons transfecté les MEF LRP1 $-/-$ précédentes avec un plasmide pcDNA qui code pour LRP1 (LRP1 $-/-$, pcDNA LRP1) ou avec le plasmide vide servant de contrôle (LRP1 $-/-$, pcDNA).

Il a été montré, que le transcrite de LRP1 dans les pré-adipocytes 3T3-L1 augmente pendant les 2 premiers jours lors de l'expansion clonale et retourne à un niveau basal à la fin de la période de différenciation adipocytaire [Terrand et al.,2009]. Ceci indique que LRP1 joue un rôle au cours de la phase précoce de la différenciation. La coloration à l'huile rouge (Oil Red O), après 10 jours de croissance dans un milieu adipogénique, révèle que les MEF déficients en LRP1 accumulent nettement plus de lipides neutres que les MEF sauvages (Figure I-1A et 1C). L'analyse microscopique révèle la présence de nombreuses gouttelettes lipidiques principalement en l'absence de LRP1 (Figure I-1B). Par conséquent la présence de LRP1 est importante pour prévenir l'accumulation de lipides dans les MEF.



C/

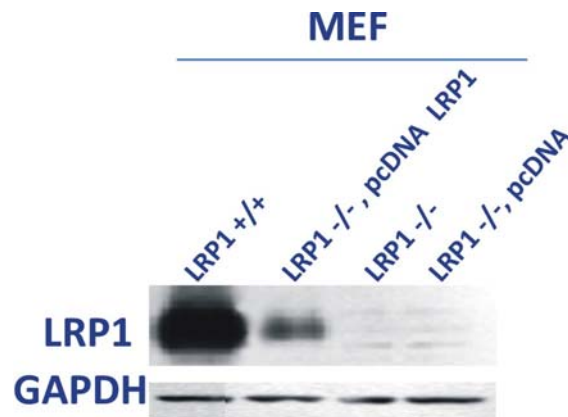


Figure I-1 : LRP1 un inhibiteur de l'accumulation lipidique. A/ Coloration à l'huile rouge (Oil red O) des MEF LRP1 +/+, LRP1^{-/-}, LRP1^{-/-} retransfectés par le plasmide pcDNA codant pour le LRP1 (LRP1^{-/-}, pcDNA LRP1) et MEF LRP1^{-/-} retransfectés par le plasmide pcDNA vide (LRP1^{-/-}, pcDNA) après 10 jours de culture en milieu adipogénique. B/ Analyse microscopique après coloration à l'huile rouge (Oil Red O) (Echelle : 50 μ m). C/ Analyse par western-blot de l'expression de LRP1 des MEF LRP1 +/+, LRP1^{-/-}, LRP1^{-/-} pcDNA LRP1 et LRP1^{-/-} pcDNA (figure représentative de n=5 expériences)

4.1.2. LRP1 dans le contrôle de la différenciation chondrocytaire

Pour étudier l'implication de LRP1 dans la différenciation chondrocytaire nous avons utilisé des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) LRP1^{flox/flox} en culture primaire prélevés sur l'embryon à E13,5 de l'embryogenèse. Pour exciser LRP1 dans ces cellules nous les infectons avec un adénovirus qui exprime la Cre recombinase. Pour une excision significative de LRP1 nous infectons les cellules à 15 MOI de virus dans un milieu contenant 10% de NCS (Newborn calf Serum) pendant 5 jours avant de les placer dans un mélange de différenciation chondrocytaire (Figure I-2A).

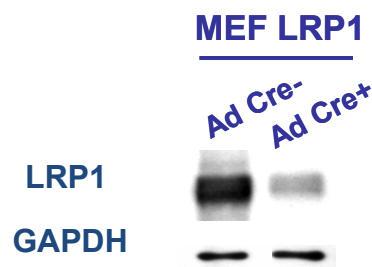


Figure I-2A : Excision de LRP1 des MEF LRP1^{flox/flox}. Analyse de l'expression de LRP1 et de la GAPDH par western blot du lysat cellulaire des MEF LRP1^{flox/flox} infectés par un adénovirus qui code pour la CRE recombinase (Ad Cre+) ou par un adénovirus sauvage (Ad Cre-)(blot représentatif de n=5 expériences).

Les cellules sont maintenues pendant 17 jours dans un mélange chondrogénique. Plusieurs protocoles de différenciation chondrocytaire ont été testé sur les MEF LRP1^{flox/flox} infectés par

un adénovirus Cre+ (LRP1^{-/-}) et par l'adénovirus Cre- (LRP1^{+/+}) et le protocole utilisant 10 ng/ml de TGF-β et 10% de FBS (Fetal calf serum), a été retenu pour ses capacités à induire la différenciation.

Nos résultats montrent qu'en présence du milieu inducteur chondrogénique, la coloration au bleu d'alcan des glycosaminoglycanes (GAG) sulfatés ou au rouge d'alizarine des phosphates de calcium dans les MEF est plus marquée en présence de LRP1 qu'en son absence (Figure I-2B). Ceci met en évidence la présence de GAG sulfatés dans la matrice extracellulaire et des dépôts de phosphate de calcium dans les MEF LRP1^{+/+}, caractéristiques des chondrocytes.

L'observation au microscope à fond clair montre qu'après 17 jours de culture dans un milieu chondrogénique seules les MEF LRP1^{+/+} forment des amas de cellules ou des nodules cartilagineux caractéristiques de la condensation cellulaire observée lors de la phase précoce de la chondrogenèse (Figure I-2C).

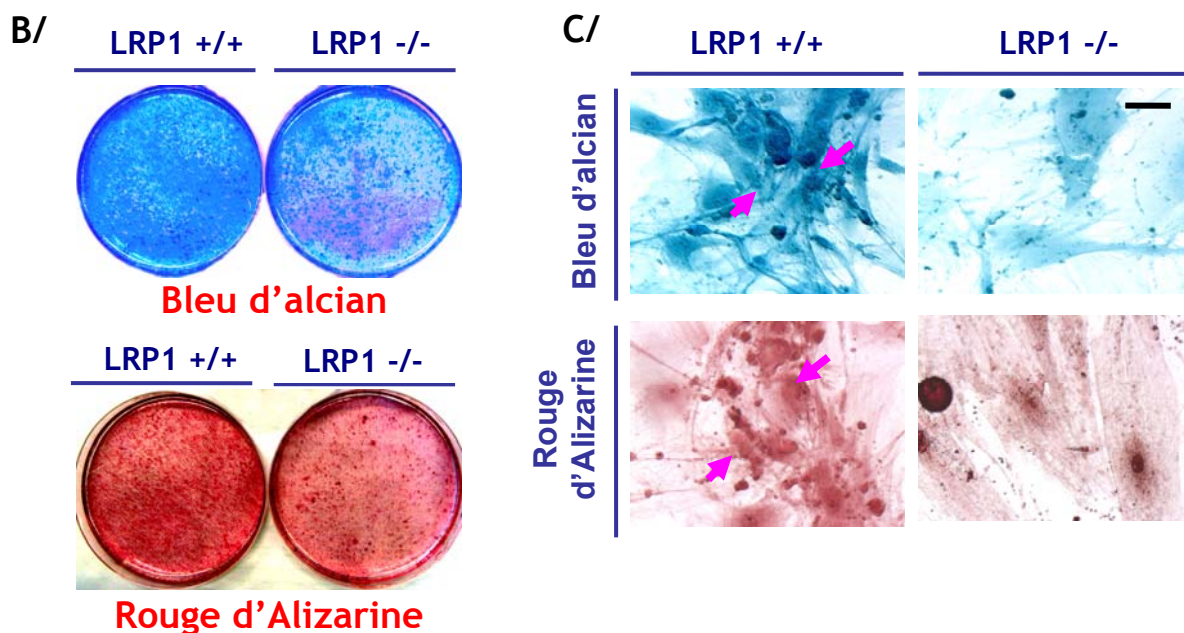


Figure I-2B et 2C : LRP1 nécessaire pour l'activation du programme de chondrogenèse. A/ Coloration au bleu d'alcan (photo du haut) et au rouge d'alizarine (photo du bas) des MEF LRP1^{flox/flox} infectés par l'adénovirus CRE (LRP1^{-/-}) et sauvage (LRP1^{+/+}) après 17 jours en milieu chondrogénique. B/ Observation microscopique à fond clair de la coloration au bleu d'alcan et au rouge d'alizarin en présence et en l'absence de LRP1 après 17 jours de différenciation (Echelle; 30 μm) (Les flèches roses représentent les nodules cartilagineux ou des amas de cellules) (photos représentatives de n=3 expériences).

Pour déterminer si les changements morphologiques, induits en présence de LRP1 par un cocktail de différenciation chondrocytaire, sont associés à des modifications transcriptionnelles caractéristiques des chondrocytes, nous avons analysé, par RT-PCR après

17 jours de croissance dans un milieu chondrogénique, l'expression du transcrite de Sox9 et de Cart1, deux protéines activatrices de la chondrogenèse.

Nos résultats montrent, en présence de LRP1, une augmentation significative de l'expression de Sox9 et une faible induction du transcrite de Cart1 après 17 jours de différenciation. En revanche, en l'absence de LRP1, l'expression de Sox9 reste inchangée après 17 jours de croissance dans un milieu chondrogénique et est significativement inférieure à celle en présence de LRP1. L'expression de Cart1 est très faible avant et après différenciation dans les MEF LRP1 -/- (Figure I-2D).

Ceci met en évidence que la présence de LRP1 est nécessaire à l'induction de l'expression de Sox9 et de Cart1 au cours de la chondrogenèse.

Cependant après 17 jours de différenciation on n'observe qu'une faible induction de l'expression de Cart1. Il a été décrit que l'induction de Cart1 lors de la chondrogenèse est précoce et transitoire [Zhao et al., 1994]. Par conséquent pour observer une augmentation plus marquée de Cart1 dans les MEF LRP1 +/+, il aurait probablement fallu réduire la durée de traitement par le TGF- β (Figure I-2D).

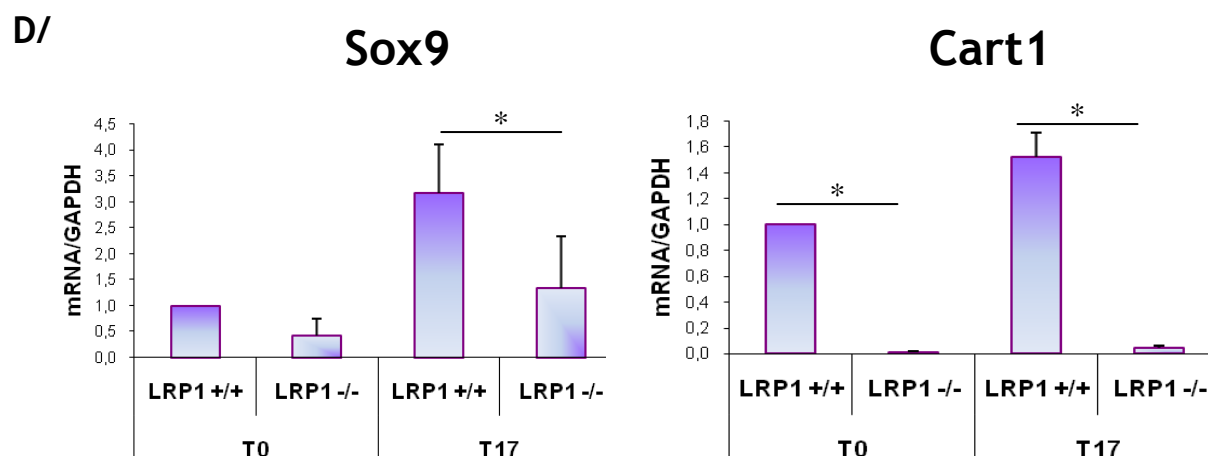


Figure I-2D: LRP1 active l'expression de Sox9 et Cart1 au cours de la différenciation chondrocytaire. Analyse par PCR quantitative en temps réel de l'expression de Sox9 (gauche) et Cart1 (droite) avant (T0) et après 17 jours (T17) de différenciation chondrocytaire dans les MEF LRP1 flox/flox infectés par l'adénovirus Cre- (+/+) et par l'adénovirus Cre+ (-/-) (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, * $p < 0.05$ LRP1+/+ versus LRP1-/-).

La présence de LRP1 semble être nécessaire, *in vitro*, pour la condensation cellulaire, pour l'induction de l'expression de Sox9 et Cart1, pour l'accumulation de GAG dans la matrice extracellulaire et pour la formation de dépôts de phosphate de calcium. Ceci suggère que LRP1 contribue à la formation de chondrocytes en régulant différentes étapes clé de la chondrogenèse.

4.2. Caractérisation phénotypique des souris déficientes en PPAR γ en présence ou non de LRP1

Afin de comprendre les mécanismes d'action utilisés par LRP1 pour contrôler la différenciation chondrocytaire nous avons inhibé l'adipogenèse en inactivant l'expression de PPAR γ dans les CML. Ainsi l'inactivation de PPAR γ et/ou de LRP1 dans les CML chez la souris permettra de comprendre l'implication de LRP1 dans la chondrogenèse.

4.2.1. Génération des souris déficientes en PPAR γ et/ou en LRP1 dans les CML chez la souris

Nous étudierons la formation des chondrocytes dans un modèle d'athérosclérose, afin de comprendre la formation de la calcification vasculaire, une complication de l'athérosclérose. Par conséquent dans le but d'augmenter la susceptibilité des souris déficientes en LRP1 et à la fois en LRP1 et en PPAR γ dans les CML à développer des lésions athéroscléreuses, nous les avons croisées avec des souris déficientes en récepteurs aux LDL (LDLr -/-).

Après croisement, afin de confirmer le génotype de ces souris nous procédons à l'analyse de l'ADN extrait de la queue de souris. L'analyse des gènes de la Cre recombinase (SM22Cre), de PPAR γ , de LRP1 et du récepteur aux lipoprotéines LDL (LDLr) est réalisée par PCR (Figure I-3A).

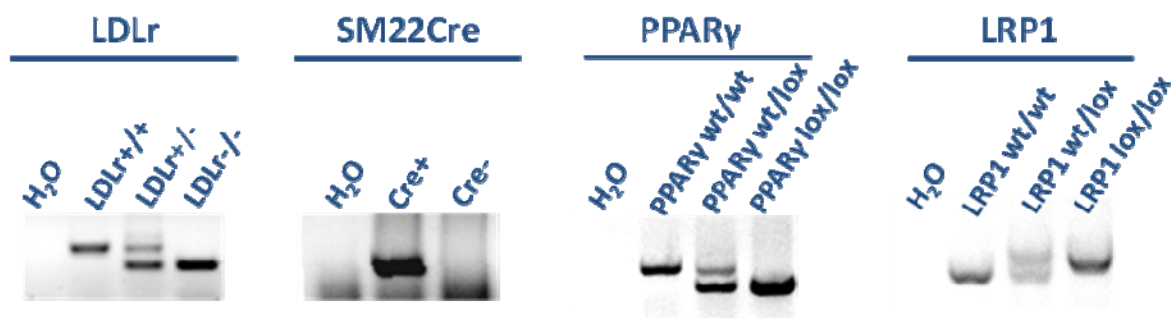


Figure I-3A : Détermination du génotype des souris. Analyse par PCR de l'expression des gènes du récepteur des LDL (LDLr), de la CRE recombinase sous la dépendance du promoteur SM22 (SM22Cre), de PPAR γ et de LRP1 à partir d'extrait d'ADN génomique prélevé à la queue après croisement des différentes souches murines.

Afin de s'assurer que l'inactivation de LRP1 et/ou PPAR γ est effective dans les CML des aortes de souris, elles sont disséquées. L'aorte prélevée est nettoyée, ouverte dans le sens de la longueur, l'endothélium est gratté à l'aide d'une pince courbe et rincé pour enlever un maximum de cellules endothéliales. Ceci permet de limiter la contamination du lysat d'aortes par d'autres cellules que les CML.

L'inactivation de LRP1 dans les CML chez la souris est mis en évidence par western-blot sur du lysat d'aortes dépourvues d'endothélium. On observe une diminution de l'expression de LRP1

dans les lysats protéiques des aortes dépourvues de LRP1 (LRP1 $-/-$ et PPAR γ /LRP1 $-/-$) en comparaison aux lysats contrôles (LRP1 $+/+$ et PPAR γ /LRP1 $+/+$) (Figure I-3B).

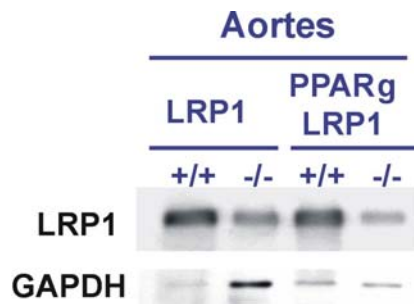


Figure I-3B : Excision de LRP1. Analyse par western-blot de l'expression de LRP1 à partir d'extraits d'aortes de souris LRP1 $^{flox/flox}$ et LRP1/PPAR γ $^{flox/flox}$ après croisement avec des souris SM22 Cre $^{+}$ ($-/-$) et SM22 Cre $^{-}$ ($+/+$)(Blot représentatif de $n=3$ animaux).

Pour inactiver l'expression des 2 isotypes de PPAR γ (PPAR γ 1 et PPAR γ 2) l'équipe de D. Metzger a décidé d'exciser un fragment contenant les exons 1 et 2. Ce fragment possède le codon ATG, initiateur de la traduction, et code pour le domaine de liaison à l'ADN [Imai T. et al., 2004]. L'excision des exons 1 et 2 de PPAR γ est vérifiée par PCR en utilisant deux couples de primer différents à partir d'ADN extrait d'aortes de souris sans endothélium (Figure I-3C b). On observe, par PCR en utilisant les couples de primer P1/P3, qu'après action de la Cre recombinase (PPAR γ $-/-$ et PPAR γ /LRP1 $-/-$) l'apparition d'une bande uniquement si l'excision est réalisée (Figure I-3C a).

Par conséquent l'excision de LRP1 et/ou de PPAR γ dans les aortes des souris qui exprime la Cre recombinase sous la dépendance du promoteur SM22 est réalisée.

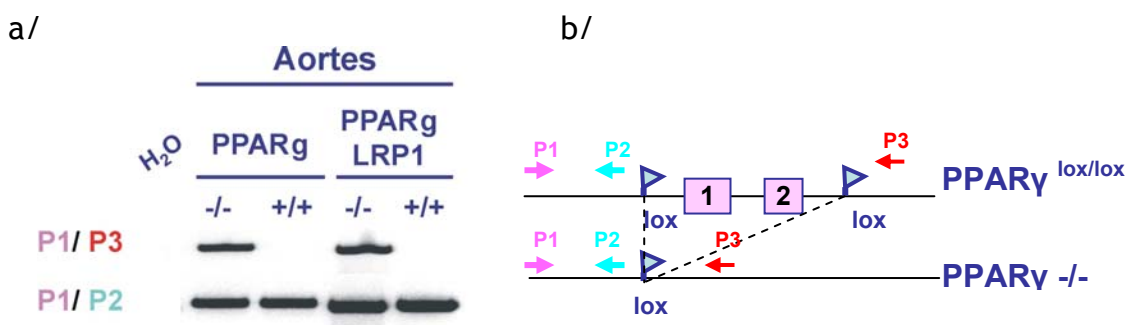


Figure 3C : Excision de PPAR γ . (a) Analyse par PCR de l'excision de PPAR γ à partir d'extrait d'ADN d'aortes de souris PPAR γ $^{flox/flox}$ et LRP1/PPAR γ $^{flox/flox}$ après croisement avec des souris SM22 Cre $^{+}$ ($-/-$) et SM22 Cre $^{-}$ ($+/+$). (b) Schéma représentant l'excision des exons 1 et 2 du gène de PPAR γ après action de la CRE recombinase et la répartition des amorces utilisées pour la PCR (P1/P2 ; amorces de la PCR contrôle, P1/P3 ; amorces de la PCR d'excision avec apparition d'une bande amplifiée si excision des exons 1 et 2 du gène PPAR γ)(PCR représentative de $n=4$ animaux).

4.2.2. Caractérisation du phénotype des souris déficientes en PPAR γ et/ou en LRP1

L'hypertension artérielle est un facteur de risque de l'athérosclérose [Asmann et al.,1999][Luft et al. 1998] et conduit de manière précoce à la calcification vasculaire [Rennenberg et al.,2008].

Pour caractériser le phénotype de ces souris mutantes nous avons dans un premier temps étudié la pression artérielle systolique à l'âge de 3 mois. La pression artérielle de ces souris est mesurée à la queue par pléthysmographie tous les jours sur une période de 15 jours.

Les résultats montrent que les souris déficientes en PPAR γ , sans régime athérogène, présentent une augmentation de la pression artérielle systolique de 35 ± 3.9 mmHg par rapport aux souris sauvages (Figure I-4A). En revanche cette augmentation n'est pas observée chez les souris déficientes à la fois en PPAR γ et en LRP1 (Figure I-4A).

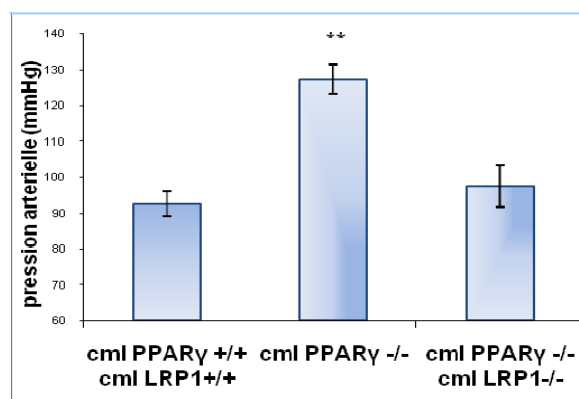


Figure I-4A: Hypertension artérielle systolique des souris déficientes en PPAR γ au niveau des CML. Mesure de la pression artérielle (mmHg) par pléthysmographie au niveau de la queue des souris sauvages (+/+) et déficientes en PPAR γ et/ou en LRP1 (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, ** $p < 0.01$ comparé aux souris contrôles)(Figure représentative de $n = 10$ animaux).

Afin de déterminer si l'augmentation de la pression induisait des modifications physiologiques nous avons analysé si ces animaux présentent une anomalie cardiaque ou des modifications de la réactivité vasculaire. A l'observation, les coupes transversales de cœurs de souris déficientes en PPAR γ ou en PPAR γ /LRP1 (-/-), en comparaison aux cœurs contrôles, ne présentent pas d'hypertrophie ventriculaire (Figure I-4B). L'analyse de la réactivité vasculaire, des anneaux d'aortes abdominales dont les CML sont déficientes en PPAR γ , comparée à celle d'aortes contrôles n'a pas mis en évidence de modification de la contraction à l'analogue du thromboxane A2 ou de la relaxation artérielle à l'acétylcholine (Figure I-4C).

Cette augmentation de la pression artérielle systolique pourrait s'expliquer par une augmentation de la rigidité vasculaire systémique et/ou par une augmentation des résistances périphériques.

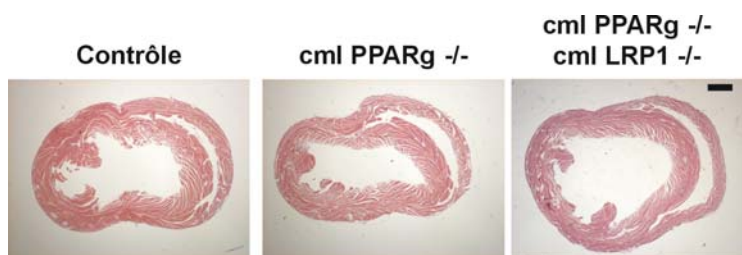


Figure 4B: L'excision de PPAR γ n'induit pas d'hypertrophie ventriculaire. Coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) de coupes transversales de cœurs de souris contrôles ou déficientes en PPAR γ et/ou en LRP1 (Echelle : 300 μ m) (Photos représentatives de n=5 animaux).

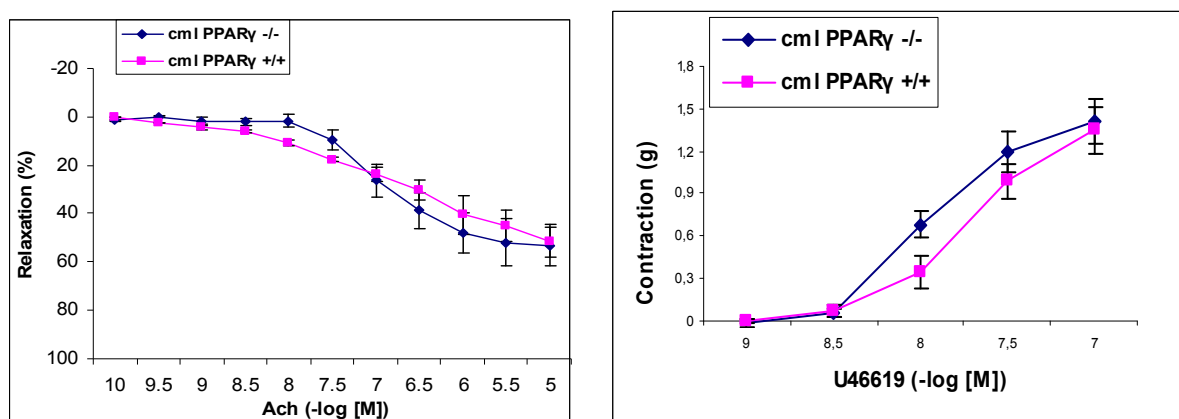


Figure I-4C: L'excision de PPAR γ ne modifie pas la réactivité vasculaire des aortes. Mesures de la relaxation vasculaire à l'acétylcholine (Ach) et de la contraction vasculaire à l'U46619 (analogue du thromboxane A2) sur des anneaux d'aortes de souris sauvages ou déficientes en PPAR γ et /ou en LRP1 dans des cuves à organes isolés (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM).

4.2.3. Caractérisation du phénotype des souris déficientes en PPAR γ et/ou en LRP1 sous régime athérogène

Pour étudier la formation et caractériser les plaques d'athérome, les souris contrôles et déficientes en PPAR γ , en PPAR γ /LRP1 et en LRP1 au niveau des CML (toutes LDLr-/-) sont soumises à l'âge de 3 mois à un régime athérogène, riche en cholestérol et en acide cholique. Afin de déterminer la durée de régime des souris déficientes en LRP1 ou en PPAR γ au niveau des CML nécessaire à la formation de lésions athéroscléroseuses, nous avons analysé la formation des plaques d'athérome dans les aortes entières après 6 semaines, 11 semaines et 6 mois de régime. Nous avons observé après coloration des aortes au rouge Sudan IV que les souris LRP1 -/- développent de nombreuses lésions après 11 semaines de régime (Figure I-5A). Cependant, les souris déficientes en PPAR γ ne développent que très peu de lésions athéroscléroseuses après 11 semaines de régime. Nous avons ainsi prolongé la durée de régime jusqu'à 6 mois, ce qui nous a permis d'observer la formation de plaques d'athérome (Figure I-5B).

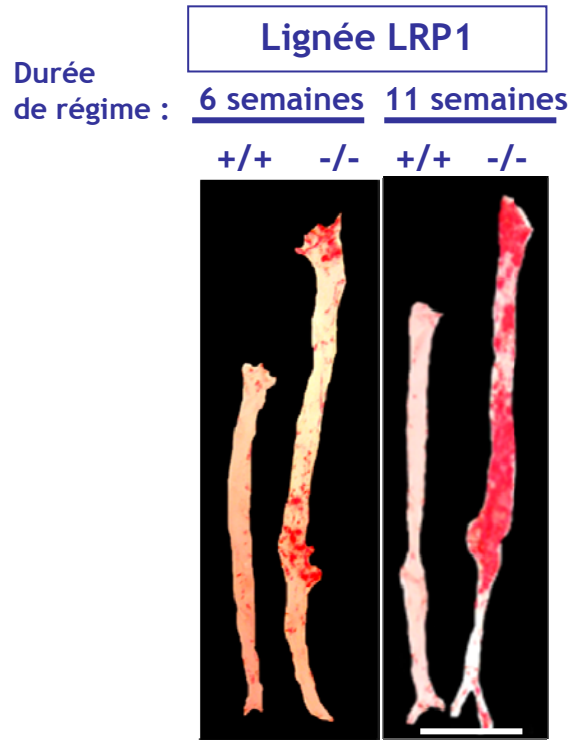


Figure I-5A : Formation de lésions athérosclérose après 11 semaines de régime en l'absence de LRP1 dans les CML. Coloration au rouge sudan IV des aortes entières de souris contrôles LDLr^{-/-} et des souris déficientes en LRP1 (-/- dans les CML (LDLr^{-/-}) ayant subit un régime athérogène pendant la durée indiquée (Echelle : 1 cm).

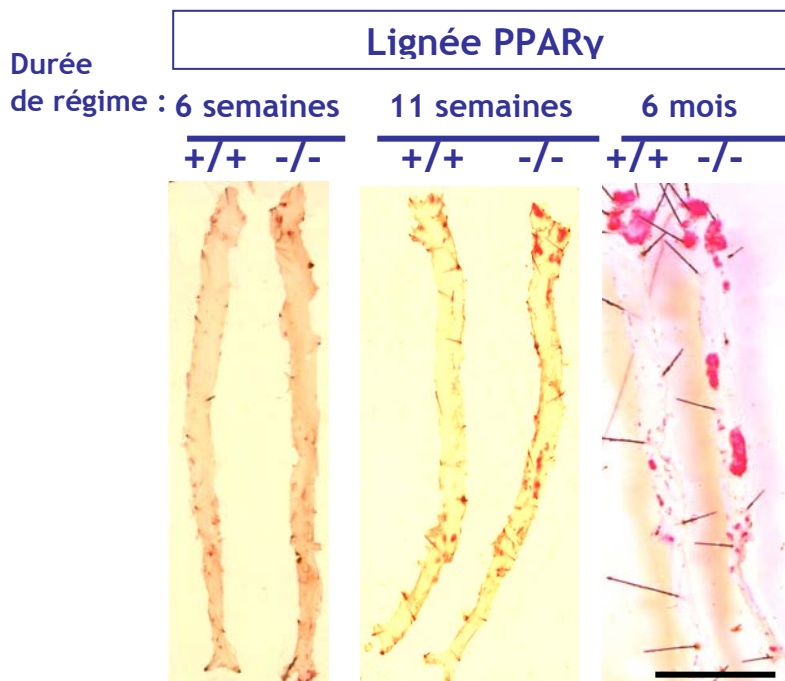


Figure I-5B : Formation de lésions athérosclérose après 11 semaines de régime en l'absence de PPAR. Coloration au rouge sudan IV des aortes entières de souris contrôles LDLr^{-/-} et des souris déficientes en LRP1 (-/- dans les CML (LDLr^{-/-}) ayant subit un régime athérogène pendant la durée indiquée (Echelle : 1 cm).

- Analyse de l'évolution des poids des souris au cours du régime

Les courbes de poids de ces souris sur 11 semaines ne révèlent aucune différence significative par rapport aux souris contrôles. Seules les souris PPAR γ -/- présentent une différence significative de poids à la fin de 6 mois de régime en comparaison avec les souris contrôles (Figure I-6).

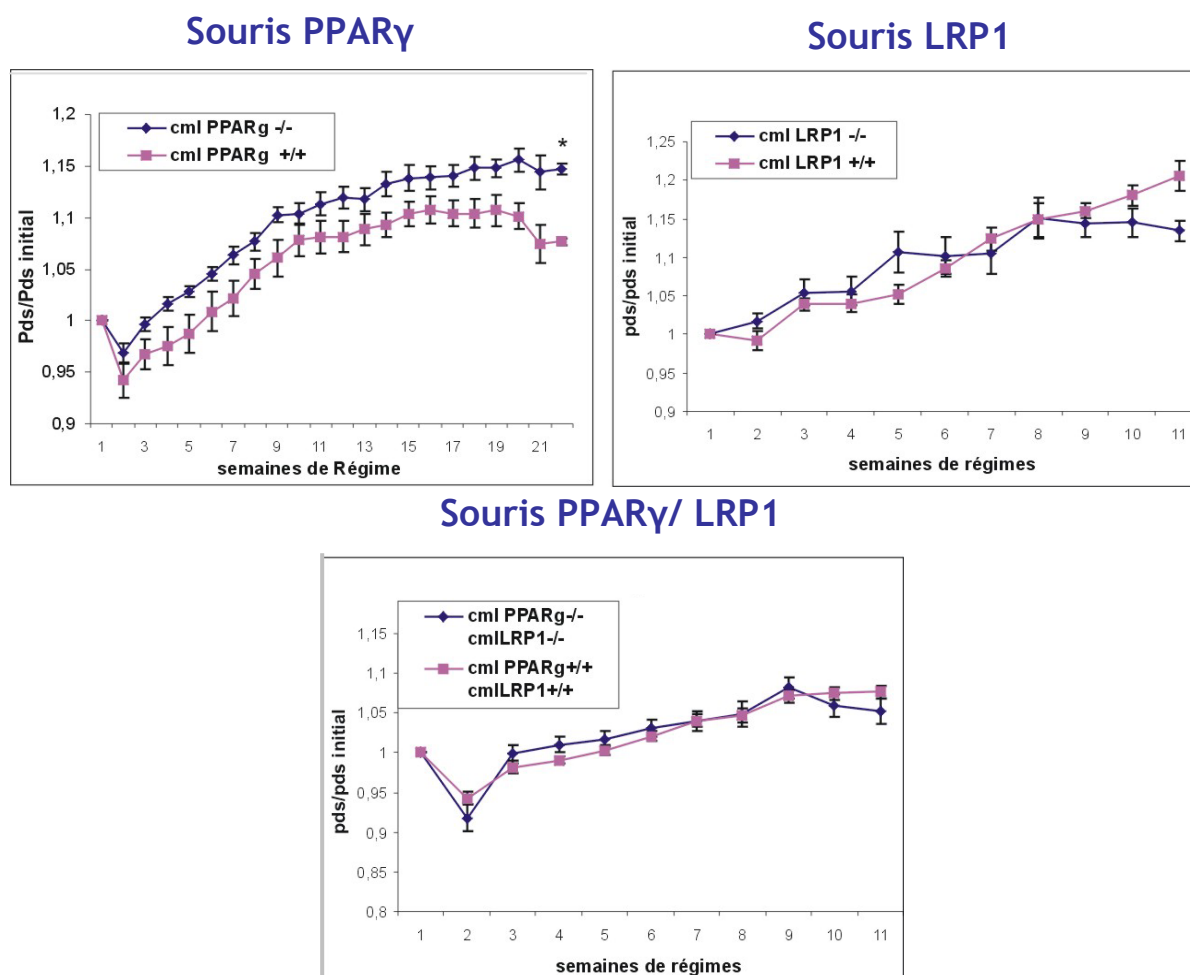


Figure I-6: Courbes de poids des animaux au cours du régime athérogène. Pesée hebdomadaire des souris contrôles LDLr-/- comparée aux souris déficientes en PPAR γ (PPAR γ -/-), en LRP1 (LRP1 -/-) et à la fois en PPAR γ et en LRP1 (PPAR γ -/-, LRP1 -/- dans les CML (LDLr-/-) au cours du régime (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, * p <0.05 comparé aux souris contrôles).

- Analyse de la formation des lésions athéroscléreuses

A la fin de la période de régime, les animaux contrôles et mutants ne présentent pas d'anomalies phénotypiques visibles. En effet l'observation macroscopique et microscopique des organes des souris (foie, rein, poumon, cœur), après régime et en comparaison avec les souris contrôles, ne présentent pas d'anomalies histologiques.

L'aorte est alors analysée afin de caractériser les lésions athéroscléreuses formées. L'aorte est prélevée de la crosse aortique jusqu'à la bifurcation iliaque, ouverte et colorée au rouge Sudan IV, afin de mettre les lésions athéroscléreuses en évidence. La coloration des lipides en rouge va permettre de quantifier la surface des lésions par rapport à la surface totale de l'aorte. Les résultats montrent que les souris déficientes en PPAR γ développent deux fois plus de lésions que les souris contrôles. Cette différence est encore plus marquée chez les souris déficientes en LRP1 et en PPAR γ /LRP1 avec 5 fois plus de lésions athéroscléreuses par rapport aux souris contrôles (Figure I-7). Ceci suggère que dans les CML, PPAR γ au même titre que LRP1 est impliqué dans la protection de la formation des lésions athéroscléreuses.

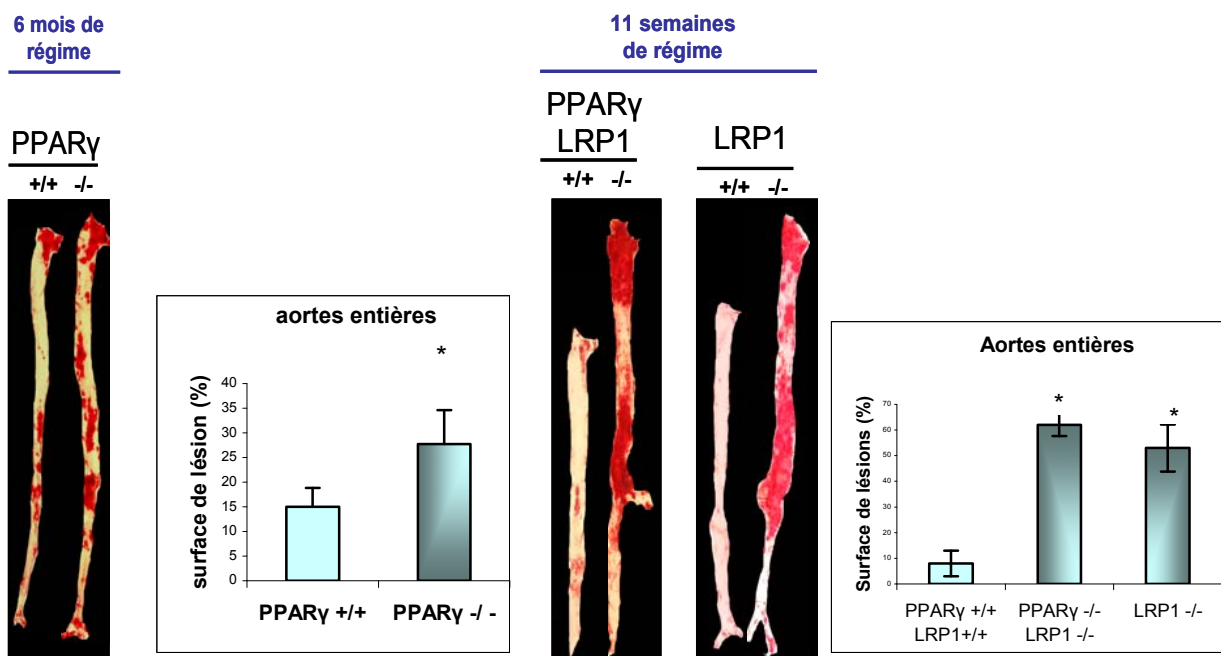


Figure I-7 : PPAR γ et LRP1 protègent contre la formation de lésions athéroscléreuses. Coloration au rouge sudan IV des aortes entières de souris contrôles LDLr $^{-/-}$ et des souris déficientes en PPAR γ (PPAR γ $^{-/-}$), en LRP1 (LRP1 $^{-/-}$) et à la fois en PPAR γ et en LRP1 (PPAR γ $^{-/-}$ LRP1 $^{-/-}$) dans les CML (LDLr $^{-/-}$) ayant subi un régime de type « Paigen » pendant le temps indiqué. Quantification des lésions athéroscléreuses (Echelle : 1 cm) (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, * p <0.05 comparé aux souris contrôles)(Photos représentatives de $n=6$ animaux).

- Analyse de la composition des lésions athéroscléreuses

L'analyse histologique, après coloration à l'hématoxyline/éosine et au Von Kossa des coupes transversales d'aortes de souris déficientes en PPAR γ au niveau des CML, nous permet de mettre en évidence la composition des lésions athéroscléreuses formées après 6 mois de régimes riche en cholestérol.

L'analyse microscopique révèle la formation de lésions athéroscléreuses dépourvues de cellules spumeuses mais formées de cellules accumulant dans la matrice extracellulaire du phosphate de calcium, mis en évidence par la coloration au Von Kossa (flèches bleues, [Figure I-8A, b,j,f,l](#)). De plus l'analyse du transcrite de Sox9 et de Cart1 par hybridation *in situ*, montre une induction de l'expression de Sox9 (flèches bleues [Figure I-8B](#)) et Cart1 au sein de ces plaques d'athéromes (flèches noires, [Figure I-8B](#)). Ceci montre que les cellules présentes au sein de la plaque d'athérome sont des cellules de type chondrocyte.

En revanche l'excision spécifique de LRP1 ou de PPAR γ /LRP1 dans les CML de la paroi vasculaire des souris, conduit à la formation de lésions athéroscléreuses composées principalement de cellules spumeuses (flèches noires, [Figure I-8A](#)). Nous n'observons pas de dépôts de phosphate de calcium après coloration au Von Kossa et l'expression de Sox9 et Cart1 n'est pas induite en l'absence de LRP1 ou de PPAR γ /LRP1 dans les CML des aortes de souris ([Figure 8B](#)). En l'absence de LRP1 il ne se forme pas des cellules de type chondrocyte au sein de la plaque.

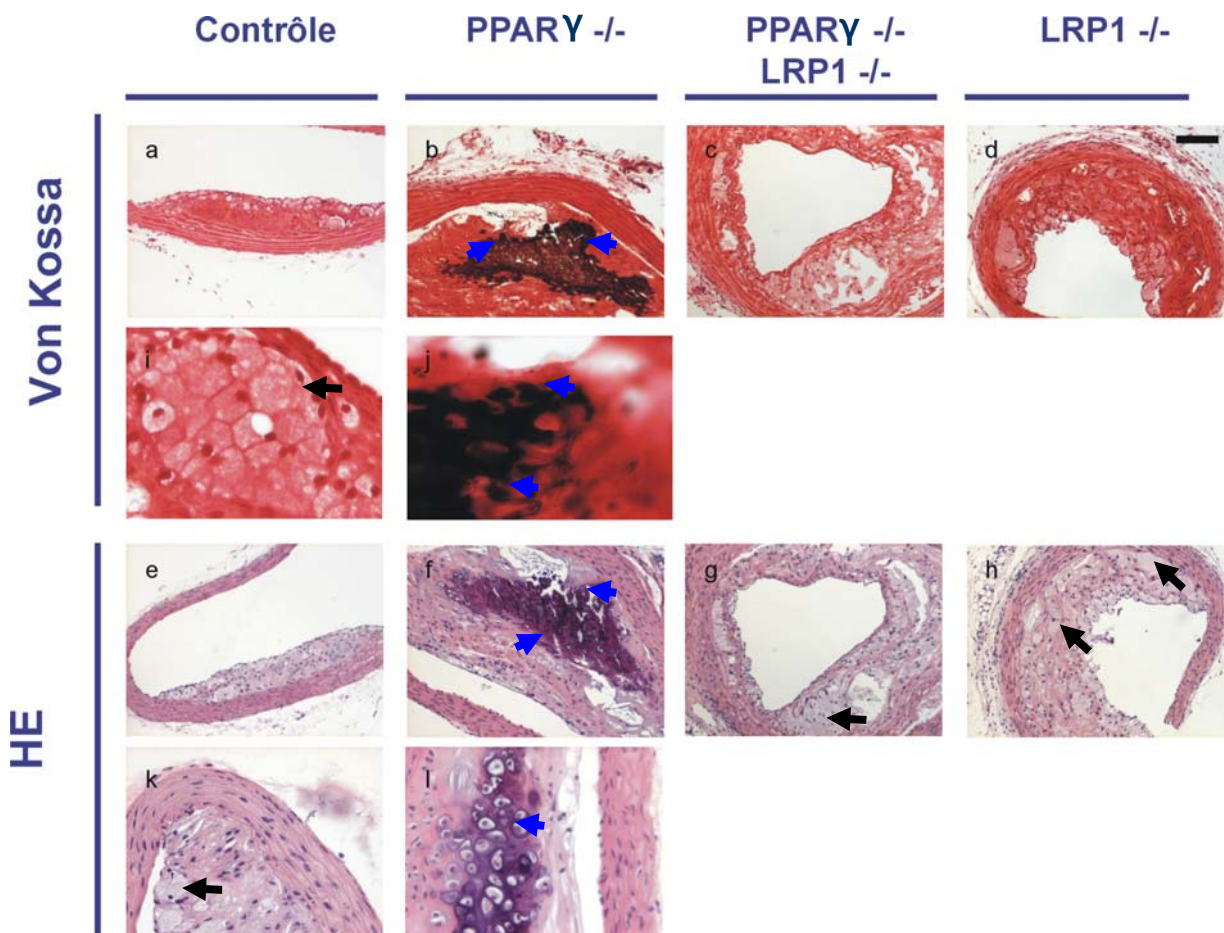


Figure I-8A: Formation de cellules spumeuses dans les aortes déficientes en LRP1 et PPAR γ /LRP1 et formation de cellules de types chondrocytes dans les aortes en l'absence de PPAR γ . Coloration à l'hématoxyline/éosine (H&E) et au Von Kossa de coupes transversales de la crosse aortique de souris

contrôles *LDLr*^{-/-} et des souris déficientes en *PPAR γ* (*PPAR γ* ^{-/-}), en *LRP1* (*LRP1*^{-/-}) et à la fois en *PPAR γ* et en *LRP1* (*PPAR γ* ^{-/-} *LRP1*^{-/-}) dans les CML (*LDLr*^{-/-}) après régime de type Paigen Diet. (Echelle : 100 μ m (a à g) 40 μ m (i à l), les flèches noires représentent les cellules spumeuses, les flèches bleues représentent les cellules de type chondrocyte)(Photos représentatives de n=8 animaux).

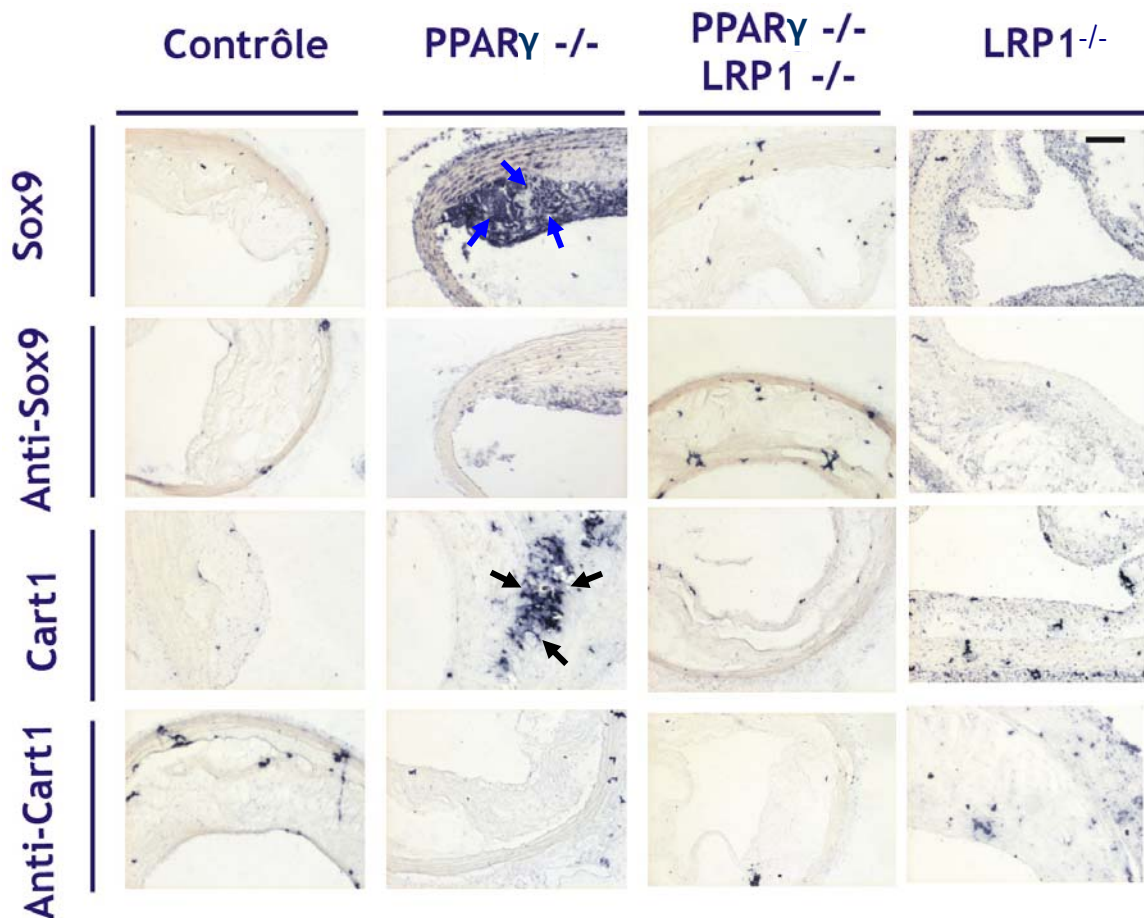


Figure I-8B: Surexpression de Sox9 et Cart1 dans les aortes déficientes en PPAR γ au niveau des CML. Hybridation in situ de de Sox9 et de Cart1 sur des coupes transversales de la crosse aortique de souris contrôles *LDLr*^{-/-} et des souris déficientes en *PPAR γ* (*PPAR γ* ^{-/-}), en *LRP1* (*LRP1*^{-/-}) et à la fois en *PPAR γ* et en *LRP1* (*PPAR γ* ^{-/-} *LRP1*^{-/-}) dans les CML (*LDLr*^{-/-}) après régime de type « Paigen». Les sondes inverses anti-sens respectifs de chaque gène sont utilisées en contrôles négatifs (les flèches bleues représentent la localisation de l'expression de *sox9* et les flèches noires de *Cart1*) (Echelle : 100 μ m)(Photos représentatives de n=3 expériences)

L'analyse du transcrite des aortes de souris déficientes en *PPAR γ* dans les CML, par RT-PCR en temps réel, révèle une augmentation de l'expression de l'alcaline phosphatase (ALP) (Figure I-9). L'ALP est une enzyme indispensable à la minéralisation osseuse et sa surexpression à été mis en évidence dans les aortes calcifiées humaines [Tyson et al., 2003]. D'autre part l'expression de l'ALP est diminuée voir inchangée dans les aortes où l'expression de *LRP1* est réprimées dans les CML (Figure I-9).

La présence de LRP1 et l'absence de PPAR γ dans les CML semble être nécessaire à la formation de cellules de type chondrocyte dans la paroi vasculaire. Néanmoins lorsque LRP1 est absent ou PPAR γ est présent dans les CML, la paroi vasculaire accumule des cellules spumeuses.

Nous montrons que LRP1 est nécessaire pour l'activation du programme de différenciation chondrocytaire et que l'absence de PPAR γ accélère le phénomène.

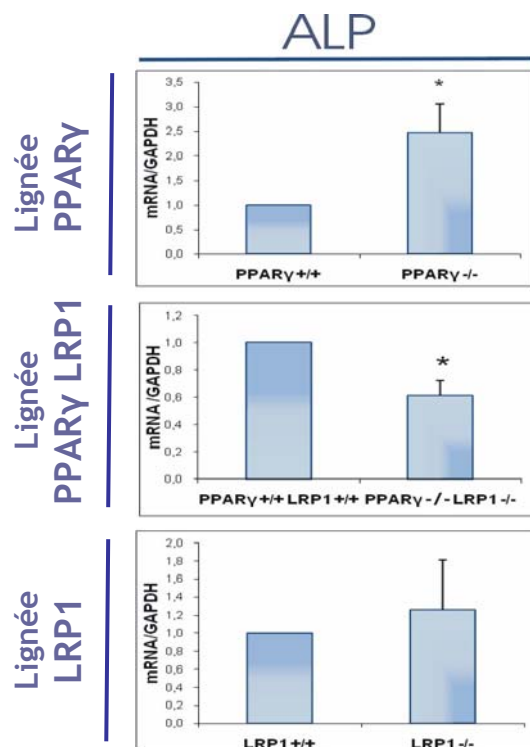


Figure 1-9: Surexpression de l'ALP en l'absence de PPAR γ dans les aortes. Analyse de l'expression du transcrite de l'alcaline phosphatase (ALP) par RT-PCR en temps réel dans les extraits d'ARN prélevés d'aortes des souris déficientes en PPAR γ (PPAR γ -/-), en LRP1 (LRP1 -/-) et à la fois en PPAR γ et en LRP1 (PPAR γ -/-, LRP1 -/-) dans les CML (LDLr-/-) en comparaison aux souris contrôles LDLr-/- après régime athérogène (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, *p<0.05 comparé aux souris contrôles)(Photos représentatives de n=5 expériences).

4.3. Mécanismes d'action utilisés par LRP1 pour contrôler la différenciation chondrocytaire

Pour comprendre le mécanisme d'action utilisé par LRP1 pour contrôler la chondrogenèse et l'accumulation du cholestérol des MEF au cours de l'adipogenèse, nous avons analysé la composition en protéine du milieu extracellulaire en présence et en l'absence de LRP1 après 10 jours de croissance dans un milieu adipogénique. L'analyse protéomique, du milieu de culture des MEF LRP1+/+, LRP1-/-, LRP1-/- retransfectés avec le LRP1 (-/-, LRP1) et LRP1-/-

retransfectés avec un vecteur contrôles n'exprimant pas le LRP1 (-/-, Mock), révèle une accumulation importante de SPARC dans ce milieu de culture uniquement en l'absence de LRP1 (Figure I-10). Ceci suggère que LRP1 est responsable de l'accumulation de SPARC dans le milieu de culture des MEF.

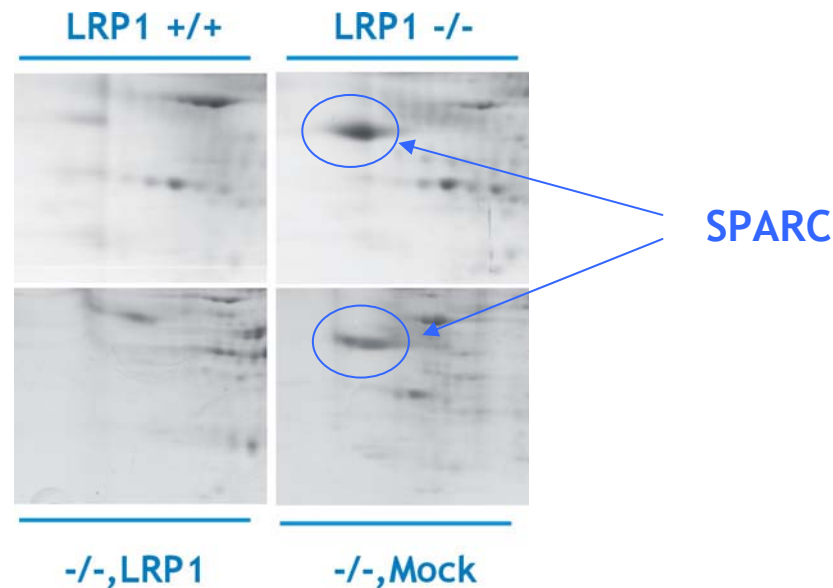


Figure I-10: Accumulation de SPARC dans le milieu de culture des cellules en l'absence de LRP1. Analyse protéomique du milieu extracellulaire des MEF LRP1 +/+, LRP1 -/-, LRP1 -/- retransfectés par le plasmide pcDNA codant pour le LRP1 (-/-, LRP1) et LRP1 -/- retransfectés par le plasmide pcDNA vide (-/-, Mock) après 10 jours de différenciation adipogénique par gel 2 dimensions et identification des protéines par spectromètre de masse (figure représentative de n=2 à 3 expériences).

4.3.1. Modification de la localisation de SPARC sous l'influence de LRP1

LRP1 peut moduler l'accumulation de SPARC soit en inhibant son expression ou soit en modulant son internalisation.

Nous avons suivi l'expression du transcrit de SPARC sous l'influence de LRP1 après 17 jours de croissance en milieu chondrogénique.

L'analyse du transcrit, des MEF LRP1 +/+ et MEF LRP1 -/- soumis à un cocktail de différenciation chondrocytaire, par RT-PCR en temps réel ne montre pas de modification transcriptionnelle de SPARC (Figure I-11). LRP1 ne module pas l'expression de SPARC avant et après chondrogenèse.

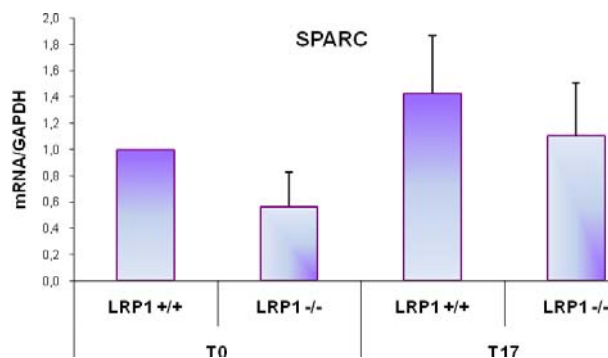


Figure I-11: LRP1 ne modifie pas l'expression du transcrite de SPARC au cours de la différenciation chondrocytaire. Analyse de l'expression du transcrite de SPARC par RT-PCR en temps réel au cours de la différenciation chondrocytaire dans les MEF $LRP1^{flox/flox}$ après infection par l'adénovirus exprimant la CRE recombinase (LRP1^{-/-}) ou infectés avec l'adénovirus sauvage (LRP1^{+/+}) (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM).

Pour déterminer si LRP1 module l'internalisation de SPARC, nous avons immunomarcqué SPARC dans les MEF en présence et en l'absence de LRP1 à l'aide d'un anticorps fluorescent (Figure I-11).

L'immunomarquage de SPARC, à 4 °C sans perméabilisation de la membrane plasmique au triton-X100, permet de marquer la protéine lorsqu'elle est localisée à la membrane. L'analyse par microscopie confocale des MEF à l'état non différenciés, démontre qu'en l'absence de LRP1, SPARC est faiblement localisée à la membrane. En revanche en présence de LRP1 (MEF LRP^{+/+} et MEF LRP^{-/-}, pcDNA LRP1) on identifie SPARC à la membrane (Figure I-12A).

De plus le marquage intracellulaire de SPARC montre que SPARC en présence de LRP1 est principalement localisé dans le noyau des MEF, ce qui n'est pas observé en absence de LRP1 (Figure I-12B).

Ces observations sont confirmées par fractionnement cellulaire après 17 jours de croissance dans un milieu chondrogénique. En effet SPARC est localisée dans les compartiments cytosolique et nucléaire en présence de LRP1 (Figure I-13). Or en l'absence de LRP1 (MEF LRP^{-/-} et MEF LRP^{-/-} pcDNA), l'expression de SPARC est très minoritaire dans le cytoplasme et complètement absente dans le noyau (Figure I-13). La présence mineure de SPARC dans le cytoplasme en l'absence de LRP1 pourrait s'expliquer par la synthèse endogène de SPARC.

Ainsi LRP1, sans moduler l'expression de SPARC, est nécessaire pour l'accumulation de SPARC dans le cytoplasme et dans le noyau avant et après différenciation chondrocytaire.

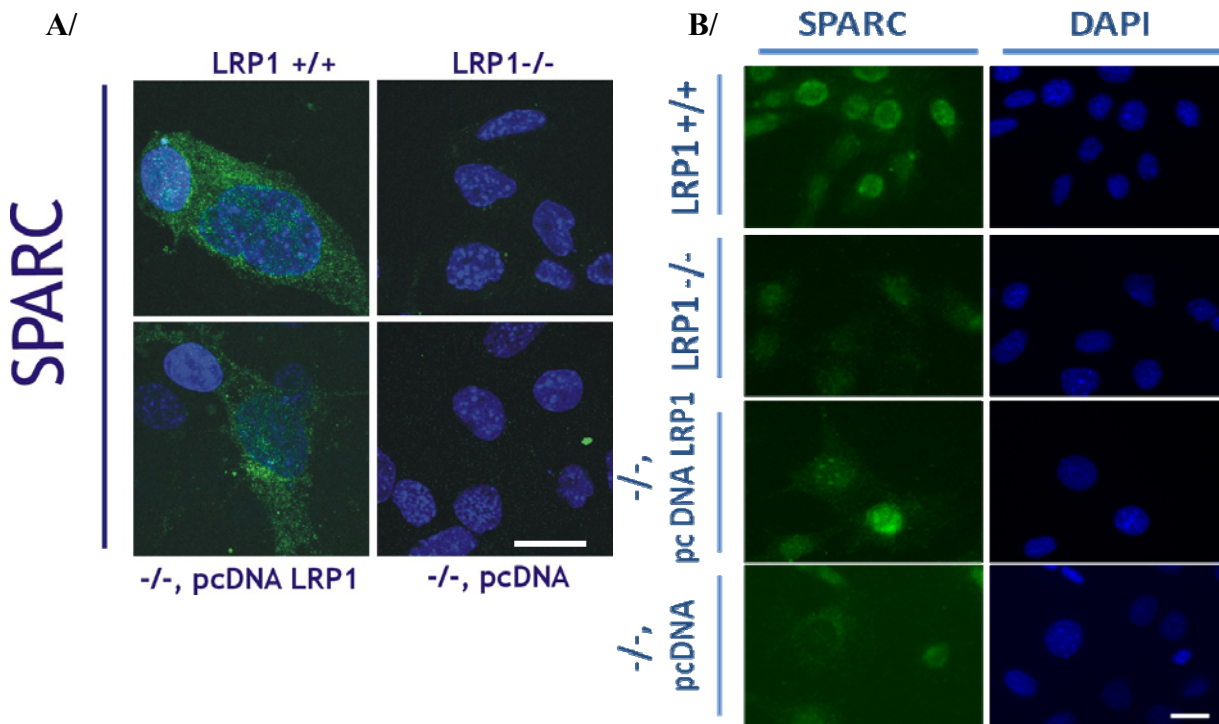


Figure I-12: LRP1 permet l'internalisation et la migration de SPARC dans le noyau des MEF à l'état non différenciés. **A/** Immunomarquage de SPARC (en vert) dans les MEF LRP1 +/+, LRP1 -/-. LRP1-/- retransfectés par le pcDNA codant pour le LRP1 et LRP1-/- retransfectés par le pcDNA vide (LRP1-/-, pcDNA) à 4°C sans perforation de la membrane plasmique et marquage par le DAPI du noyau (en bleu). Analyse par microscopie confocale. (Images représentatives de n=3 expériences) **B/** Immunomarquage de SPARC (en vert) dans les MEF LRP1 +/+, LRP1 -/-, LRP1 -/- retransfectés par le pcDNA codant pour le LRP1 et LRP1-/- retransfectés par le pcDNA vide (LRP1-/-, pcDNA) après perméabilisation de la membrane plasmique au triton x-100 et marquage par le DAPI du noyau (en bleu). Analyse par microscopie à fluorescence (Images représentatives de n=3 expériences) (Echelle : 30µm).

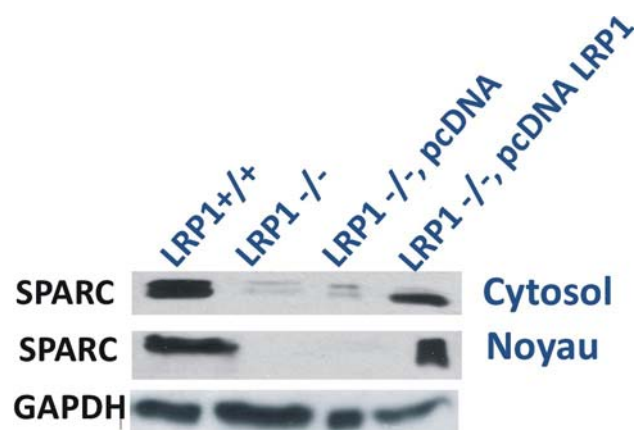


Figure I-13: la présence de LRP1 est nécessaire au recrutement de SPARC à la membrane et dans le noyau après différenciation chondrocytaire. Fractionnement cellulaire des MEF LRP1 +/+, LRP1 -/+, LRP1 -/- retransfectés par le pcDNA codant pour le LRP1 et LRP1-/- retransfectés par le pcDNA vide (LRP1-/-, pcDNA) et analyse par western-blot de l'expression de SPARC dans les différents compartiments cellulaires (blot représentatif de n=3 expériences).

Pour déterminer si LRP1 régule également la l'internalisation de SPARC *in vivo*, nous avons suivi son expression dans les aortes des souris déficientes en PPAR γ et/ou en LRP1.

Nos résultats montrent que, en accord avec l'observation *in vitro*, l'analyse du transcrite de SPARC sur les extraits d'ARN des aortes mutantes, par RT-PCR en temps réel, ne révèle pas de modification significative entre les différentes souches mutantes (Figure I-15).

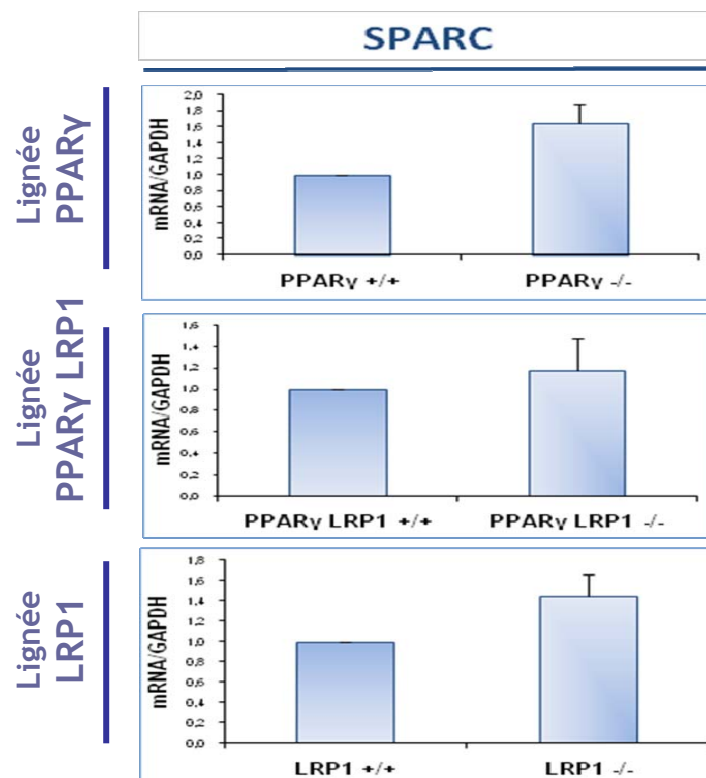


Figure I-15: LRP1 et PPAR γ ne modifient pas l'expression du transcrite de SPARC dans les aortes de souris. L'expression de l'ARNm de SPARC est analysée par RT-PCR en temps réel à partir d'extrait d'ARN d'aortes de souris déficientes en LRP1 (LRP1 $^{-/-}$), en PPAR γ (PPAR γ $^{-/-}$) et à la fois en LRP1 et en PPAR γ (PPAR γ $^{-/-}$ LRP1 $^{-/-}$ dans les CML (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM).

L'analyse de l'expression de SPARC dans les aortes des souris mutantes comparé aux souris contrôles révèle une diminution de l'expression de SPARC en l'absence de LRP1 dans les CML (LRP1 $^{-/-}$) (Figure I-14, voie 1). Cette réduction de l'expression de SPARC est également observée dans les aortes déficientes à la fois en LRP1 et en PPAR γ dans les CML (PPAR γ LRP1 $^{-/-}$) (Figure I-14, voie 5).

LRP1 ne module pas l'expression transcriptionnelles de SPARC *in vivo* et réduit l'expression protéique de SPARC en son absence.

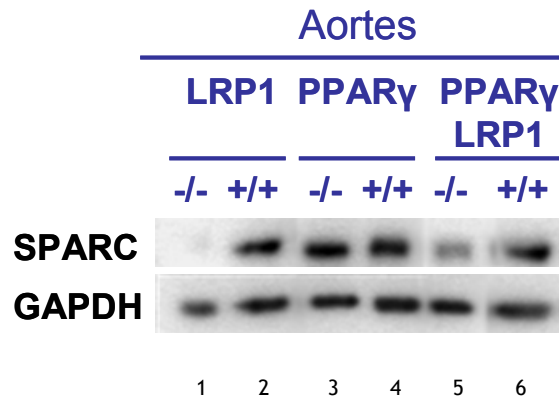


Figure I-14: LRP1 maintient l'expression de SPARC dans les aortes des souris. Analyse de l'expression de SPARC par western-blot dans le lysat total d'aorte de souris déficientes en LRP1 (LRP1 $-/-$, voie 1), en PPAR γ (PPAR γ $-/-$, voie 3) et à la fois en LRP1 et en PPAR γ (PPAR γ LRP1 $-/-$, voie 5) dans les CML comparé au lysat des aortes de souris contrôles (voie 2,4 et 6)(blot représentatif de n=4 animaux de chaque souche)

Afin de confirmer les résultats *in vitro* nous avons suivie l'internalisation de SPARC par immunohistochimie. Le marquage *in situ* de SPARC (marquage brun) sur des coupes transversales d'aortes démontre que seul en présence de LRP1 dans les CML, SPARC est retrouvée dans la lésion athéroscléreuse principalement localisée dans les noyaux et à la membrane des cellules de la lésions. L'expression de SPARC en l'absence de LRP1 n'est pas détectée dans les noyaux des cellules de la lésion athéroscléreuse (Figure I-16).

In vivo la présence de LRP1 est nécessaire à l'internalisation de SPARC dans le noyau.

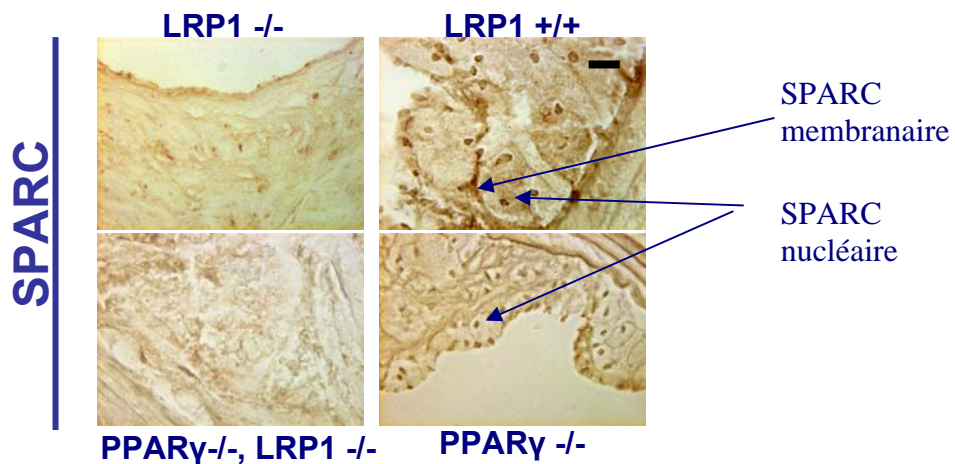


Figure I-16: LRP1 permet le recrutement de SPARC à la membrane et dans le noyau des cellules de la lésion athéroscléreuse d'aortes de souris. Immunomarquage de SPARC sur des coupes transversales d'aortes de souris déficientes en LRP1 (LRP1 $-/-$), en PPAR γ (PPAR γ $-/-$) et à la fois en LRP1 et en PPAR γ (PPAR γ $-/-$ LRP1 $-/-$) dans les CML. (Marquage brun correspond à l'expression de SPARC) (Echelle : 50 μ m)(Photos représentatives de n=3 expériences).

Par conséquent, l'internalisation de SPARC et sa migration dans le noyau, *in vivo* et *in vitro*, nécessite la présence de LRP1.

4.3.2 Interaction de SPARC avec LRP1

LRP1 est un récepteur d'endocytose capable de fixer un grand nombre de ligands différents. Afin de déterminer si SPARC est un ligand de LRP1, nous avons immunoprécipité LRP1 purifié à partir de la fraction membranaire des Hek293 et analysé l'expression de SPARC.

Nos résultats montrent que SPARC et LRP1 co-immunoprécipitent dans un même complexe membranaire (Figure I-17 voie 1).

Ceci suggère que SPARC se fixe au niveau du domaine extracellulaire de LRP1 ce qui permettrait, par l'internalisation de SPARC dans la cellule.

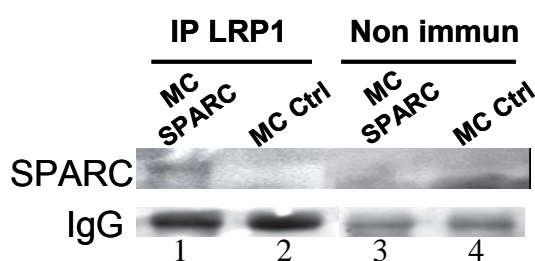


Figure I-17 : Co-immunoprécipitation de SPARC et de LRP1. Immunoprécipitation (IP) de LRP1 des HEK293 puis incubation toute la nuit avec un milieu conditionné enrichi en SPARC recombinant humain (MC SPARC) ou avec un milieu conditionné contrôle (MC Ctrl). Analyse par western-blot de l'expression de SPARC (blot représentatif de n=2 expériences).

4.3.3 Rôles de SPARC dans la cellule

Nous avons montré *in vivo* qu'en présence de LRP1 et de SPARC intracellulaire les lésions athéroscléreuses sont composées de cellules surexprimant Sox9 et Cart1 (Figure I-8B).

Pour déterminer le rôle de SPARC dans la régulation de la chondrogenèse et dans la régulation de Sox9 et de Cart1 nous utilisons un système d'activation à la luciférase. Pour cela les régions du promoteur des gènes Sox9 et Cart1 ont été clonées et associées au gène de la luciférase. Les HEK293 sont transfectées avec les vecteurs pGL3-Sox9 ou pGL3-Cart1. Vingt-quatre heures après la transfection, les Hek293 sont traitées pendant 5h avec du milieu conditionné rhSPARC (C= 200mg/mL de protéines totales) et avec un milieu contrôle (Mock) qui ne contient pas de rhSPARC.

Les résultats montrent qu'en présence du milieu conditionné rSPARC, l'activité luciférase dans les cellules transfectées avec le vecteur pGL3-Sox9 ou pGL3-Cart1 est induite (Figure I-18). SPARC semble activer l'expression des gènes Cart1 et Sox9.

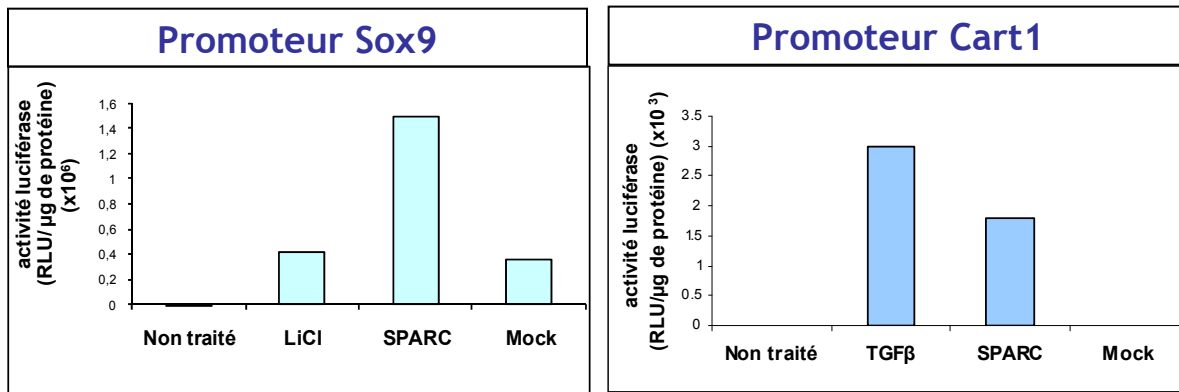


Figure I-18 : SPARC induit l'expression de Sox9 et de Cart1. Test d'activation à la luciférase du promoteur Sox9 (gauche) et Cart1 (droite) après traitement des Hek293 avec le milieu conditionné enrichi en SPARC recombinant ou avec du milieu contrôle sans SPARC (Mock). Le contrôle positif utilisé pour activer le promoteur Sox9 est le chlorure de lithium (LiCl) et celui de Cart1 est le TGF-β. (résultats représentatif de n=3 expériences)

SPARC a également été décrite comme inhibant l'adipogenèse via l'activation de Wnt/β-catenin [Nie et al., 2009] et induit la formation de cartilage [Rotland et al., 2008].

Par ailleurs il a été montré que l'activation de Wnt/β-catenin inhibe l'adipogenèse [Nie et al., 2009] et permet l'activation de la chondrogenèse sous la dépendance de Sox9 [Yano et al., 2005].

SPARC contrôlerait le programme de différenciation chondrocytaire en modulant la voie de Wnt. Pour vérifier cette hypothèse nous avons suivie l'activation de la β-catenin après traitement par le milieu conditionné enrichit en SPARC recombinant (rSPARC) dans les MEF LRP +/+.

Nos résultats montrent qu'après 24 h de traitement par rSPARC, la β-catenin migre dans le noyau (Figure I-19).

Ce résultat suggère que l'activation de l'expression de Sox9 et de Cart1 dans les MEF LRP +/+ en réponse à SPARC est, entre autre, due à l'activation de la voie de Wnt/β-catenin.

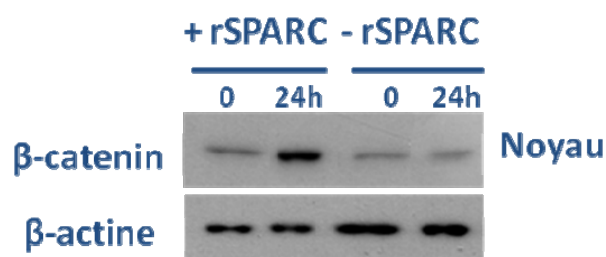


Figure I-19 : SPARC permet le recrutement de la β-catenin dans le noyau. Fractionnement cellulaire des MEF LRP1+/+ après traitement pendant 24h avec le milieu conditionné enrichi en SPARC recombinant (rSPARC) ou avec le milieu contrôle (-rSPARC) et analyse de l'expression de la β-catenin dans la fraction nucléaire (blot représentatif de n=3 expériences).

La présence de LRP1 dans les CML de la paroi vasculaire permet l'internalisation de SPARC dans la cellule, l'activation de Sox9 et de Cart1 ainsi que la stabilisation de la β -catenin. Cependant le mécanisme d'action utilisé par SPARC pour activer l'expression de Sox9 et de Cart1 n'est pas encore compris. SPARC pourrait activer l'expression de Sox9 et Cart1 par l'intermédiaire de la β -catenin ou pourrait également activer directement les facteurs de transcription lors de sa migration dans le noyau et induire l'activation de Sox9 et Cart1.

4.3.4 Mécanisme de régulation utilisé *in vivo*

Nous avons montré *in vitro* que la présence de LRP1 est nécessaire à l'internalisation de SPARC dans la cellule (Figures I-12 et 13), à l'activation de Sox9 et de Cart1 (Figure I-18) et à la stabilisation de la β -catenin (Figure I-19). Néanmoins *in vivo* la présence de LRP1 dans les CML de la lésion athéroscléreuse n'est pas suffisante pour induire la formation de cellules de type chondrocyte (Figure I-8A). Pour observer la formation de calcification vasculaire *in vivo*, en plus de la présence de LRP1, l'expression de PPAR γ doit être supprimée dans les CML de la paroi vasculaire (Figure I-8A).

Pour comprendre l'implication de PPAR γ dans ce phénomène de différenciation et en posant comme hypothèse que c'est la voie canonique de Wnt qui en est responsable, nous avons étudié l'expression des protéines régulatrices de la voie de Wnt/ β -catenin dans les aortes des souris mutantes. L'inactivation de l'expression de SFRP2 chez la souris se traduit par une syndactylie et une poly-syndactylie pré-axiale principalement au niveau des membres postérieurs. SFRP2 est décrite comme une protéine inhibitrice de la chondrogenèse chez la souris [Ikegawa et al., 2008].

Nous avons alors analysé l'expression du transcrite de SFRP2 dans les extraits d'ARN des aortes de souris mutantes. Nous avons montré que l'expression du transcrite de SFRP2 est complètement abolie dans les aortes déficientes en PPAR γ et réduite significativement chez les doubles mutants (PPAR γ $-/-$ LRP1 $-/-$) (Figure I-20A et B gauche). L'analyse du transcrite des aortes déficientes en LRP1 ne révèle pas de réduction de l'expression de SFRP2 (Figure I-20C gauche). L'inactivation de PPAR γ dans les CML semble être responsable de l'inhibition de SFRP2.

Nous avons ensuite déterminé quelle protéine de la famille des Wnt est impliquée dans la formation des cellules de type chondrocyte. Il a été montré que l'expression de Wnt5a, une protéine de la famille des Wnt, est induite uniquement en présence de LRP1 au cours du protocole de différenciation adipocytaire dans les MEF [Terrand et al., 2009]. De plus Wnt5a a été impliquée dans l'activation de la formation des chondrocytes [Yang et al., 2003]. Nous avons donc analysé l'expression de Wnt5a dans les aortes de souris par RT-PCR en temps réel. L'analyse de l'expression de Wnt5a, dans les aortes des souris, indique une activation de son ARNm inversement corrélé à l'expression de SFRP2. En effet l'expression de Wnt5a est

augmentée dans les aortes déficientes en PPAR γ dans les CML (Figure I-20A droite) et diminuée voir inchangée dans celles des mutants cml LRP1 $^{-/-}$ et cml PPAR γ /LRP1 $^{-/-}$ respectivement (Figure I-20B et C droite). Par conséquent la présence de LRP1 semble être nécessaire *in vivo* à induire l'expression de Wnt5a.

Ceci suggère que LRP1 dans les CML va induire l'expression de Wnt5a et PPAR γ celle de SFRP2 qui inhiberait la voie canonique de Wnt5a.

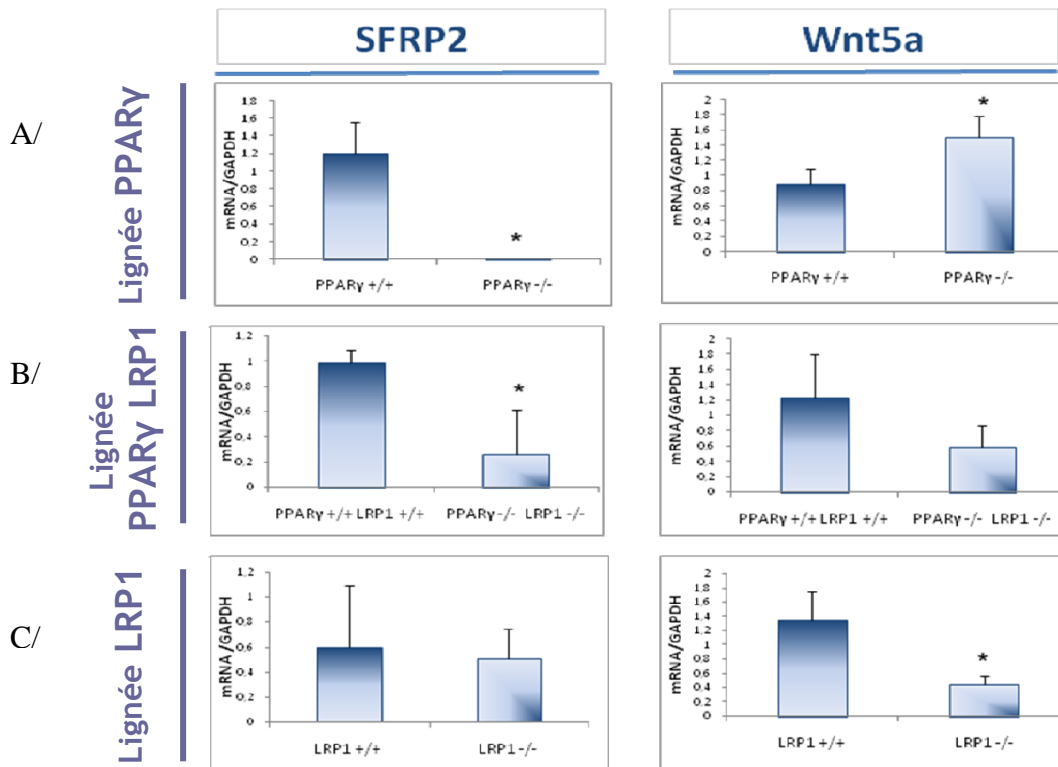


Figure I-20 : inhibition de l'expression de SFRP2 et induction de l'expression de Wnt5a en l'absence de PPAR γ et en présence de LRP1 dans les aortes de souris. Analyse par RT-PCR en temps réel de l'expression du transcrite de SFRP2 et de Wnt5a dans les aortes en l'absence de LRP1 (LRP $^{-/-}$) ou PPAR γ (PPAR $\gamma^{-/-}$) ou à la fois de PPAR γ et de LRP1 (PPAR γ /LRP1 $^{-/-}$) dans les CML après régime athérogène (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, * p <0.05 comparé aux souris contrôles) (figure représentative de $n=5$ expériences).

SFRP2 inhibe la voie canonique des Wnt en se fixant à la protéine Wnt et en l'empêchant d'activer son récepteur [Kawano et al.2003]. Dans notre modèle SFRP2 se fixerait à Wnt5a pour bloquer l'activation de la voie des Wnt. Pour tester cette hypothèse nous avons immunoprécipité Wnt5a-cMyc du milieu extracellulaire des Hek293 après transfection avec le vecteur pcDNA Wnt5a-cMyc et analysé par western-blot l'expression de SFRP2.

Nos résultats montrent que Wnt5a-cMyc exprimé dans le milieu co-immunoprécipite avec SFRP2 (Figure I-21). Ceci suggère que SFRP2 est capable d'inhiber la voie de signalisation induite par Wnt5a.

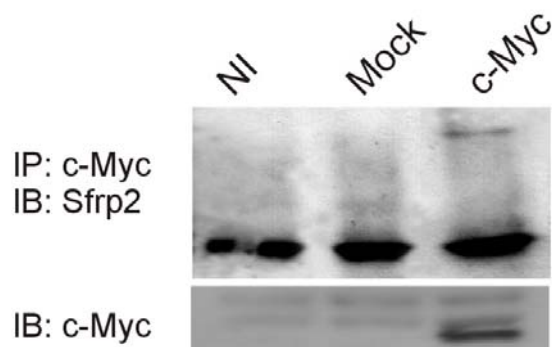


Figure I-21 : Wnt5a co-immunoprécipite avec SFRP2. Immunoprécipitation de Wnt5a-cMyc du milieu extracellulaire des Hek293 après transfection par le pcDNA Wnt5a-cMyc (c-Myc) et du milieu contrôle (Mock) et analyse par western blot de l'expression de SFRP2. IB :cMyc, contrôle de la présence de Wnt5a-cMyc dans le milieu extracellulaire des cellules transfectées par le pcDNA Wnt5a-cMyc. (NI ; Non immun) (Blot représentatif de N=3 expériences).

Afin de déterminer si SFRP2 est un gène cible de PPAR γ , nous avons utilisé la technique de CHIP (Chromatin ImmunoPrecipitation). Pour cela nous avons immunoprécipité la chromatine par l'anticorps anti-PPAR γ , par l'anti-LRP1, qui constitue le contrôle négatif, et par l'anti-ARN polymérase II (Pol II), qui constitue le contrôle positif. La présence de la région promotrice de SFRP2 est analysée par RT-PCR en temps réel. La région promotrice de SFRP2 (de -700 à -200 pb en aval du site d'initiation de la transcription) a été choisie pour la présence d'une séquence PPRE (-651pb ; AGGTCAAATTTTCTCC), un élément de réponse à PPAR γ .

Nos résultats révèlent une interaction entre le récepteur nucléaire PPAR γ et le promoteur de SFRP2 dans les MEF après 24h de traitement par un cocktail de différenciation adipocytaire contenant de la rosiglitazone, de l'insuline, de la dexamétazone et de l'IBMX (Figure I-22). Cette interaction est plus importante en l'absence de LRP1 qu'en sa présence et est équivalente à l'interaction entre Pol II et la même région promotrice (Figure I-22). Par conséquent SFRP2 est un gène cible de PPAR γ .

Ainsi *in vivo*, en l'absence de PPAR γ , l'expression de SFRP2 est inactivée dans les CML.

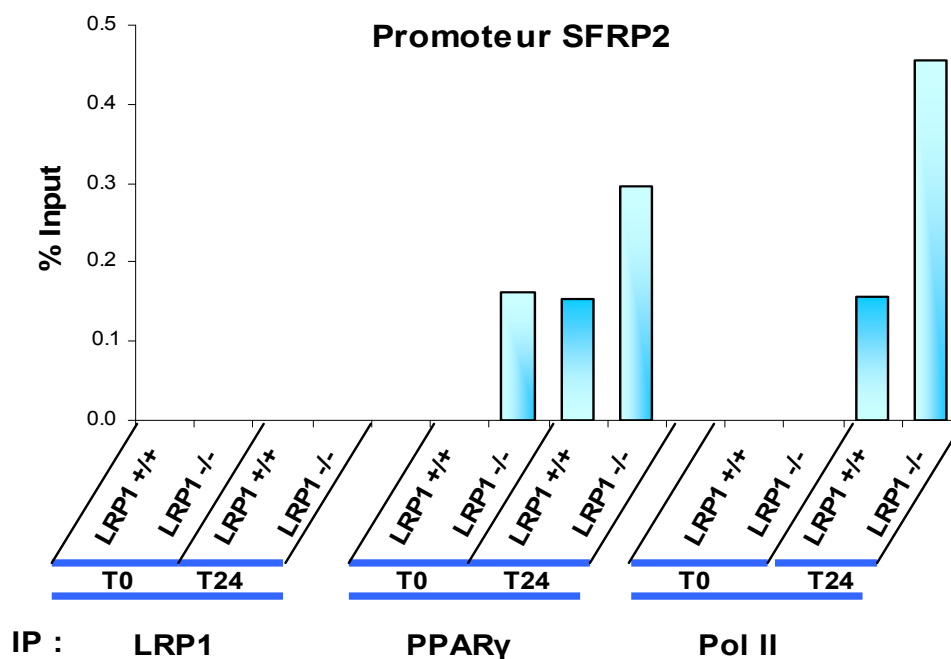


Figure I-22 : SFRP2 est un gène cible de PPAR γ . Immunoprécipitation de la chromatine par PPAR γ , par LRP1 et par l'ADN polymérase II (Pol II) des MEF LRP1 $^{+/+}$ et MEF LRP1 $^{-/-}$ après 24h de traitement par un cocktail de différenciation adipocytaire (IBMX, rosiglitazone, Insuline, Dexaméthazone) et analyse par RT-PCR en temps réel de la co-immunoprécipitation avec la région promotrice de SFRP2 allant de -200 à -700 pb de la séquence d'initiation de la transcription (Résultat représentatif de n=2 expériences).

Nous avons montré que l'activation de l'expression de Wnt5a par LRP1 et l'inhibition de l'expression de SFRP2 en l'absence de PPAR γ permet *in vivo*, la différenciation des CML en cellules de type chondrocytes dans la plaque d'athérome. Pour déterminer si Wnt5a induit l'expression des gènes cibles de la chondrogenèse, nous avons étudié l'activation des promoteurs de Sox9 et de Cart1 par le test à la luciférase après traitement des HEK 293 par un milieu conditionné enrichi en Wnt5a recombinant (Wnt5a) ou par le milieu contrôle (Mock). Nos résultats montrent que Wnt5a active de façon équivalente au chlorure de lithium (LiCl qui constitue le contrôle positif) le promoteur Cart1 (Figure I-22).

Donc l'induction de l'expression de Wnt5a dans les aortes des souris déficientes en PPAR γ contribue à l'activation de l'expression de Cart1.

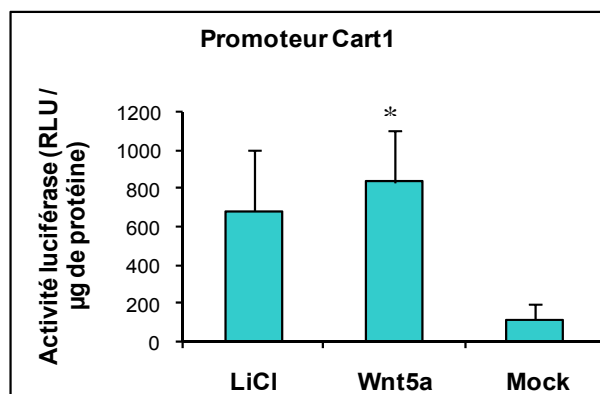


Figure I-22 : Wnt5a induit l'expression de Cart1. Test d'activation à la luciférase du promoteur de Cart1 après traitement des Hek293 avec le milieu conditionné enrichi en Wnt5a recombinant ou avec du milieu contrôle sans Wnt5a (Mock). Le contrôle positif utilisé pour activer le promoteur Cart1 est le chlorure de lithium (LiCl) (résultats représentatif de n=3 expériences)(les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, * $p < 0.05$ comparé contrôle Mock).

Donc nous avons montré que SFRP2 est un gène cible de PPAR γ et que *in vivo* l'expression de SFRP2 est induite dans la paroi vasculaire. De plus LRP1 induit l'expression de Wnt5a dans la paroi vasculaire et Wnt5a peut activer *in vitro* l'expression de Cart1. Et enfin SFRP2 peut se lier à Wnt5a.

4.4. LRP1 et PPAR γ des régulateurs de la chondrogenèse

Dans cette étude nous avons mis en évidence l'implication de LRP1 et de PPAR γ dans les processus de différenciation chondrocytaire.

En effet *in vivo* sous régime athérogène, l'inactivation de PPAR γ dans les CML chez la souris, entraîne la formation de lésions athéroscléreuses composées de cellules accumulant du phosphate de calcium et surexprimant Sox9 et Cart1. Les souris déficientes en LRP1 et en PPAR γ /LRP1 dans les CML développent également plus de plaques d'athérome riches en cellules spumeuses que les souris contrôles.

Le mécanisme mis en jeu dans chaque souche murine pour induire la formation de cellules spumeuses ou de type chondrocyte est le suivant:

A/ (Figure I-23A) Les CML sauvages exprimant LRP1 vont être capable d'internaliser SPARC. SPARC dans la cellule va pouvoir activer l'expression de Sox9 et Cart1 et stabiliser la β -catenin. De plus la présence de LRP1 va induire l'expression de Wnt5a.

La présence de PPAR γ dans les CML va induire l'expression de SFRP2. La sécrétion de SFRP2 dans le milieu extracellulaire va neutraliser l'activation de la voie canonique de Wnt5a et réduire l'expression de Cart1.

Cependant l'expression de Sox9, Cart1 et l'activation de la β -catenin induite par SPARC ne semble pas être suffisante pour induire un changement phénotypique des CML.

Ainsi les souris contrôles ne présentent pas de lésions calcifiées mais des lésions accumulant de nombreuses cellules spumeuses.

B/ (Figure I-23B) Les CML déficientes en LRP1 ne recrutent plus de SPARC dans la cellule et ainsi l'activation de Sox9 et Cart1 est abolie. L'absence de LRP1 réduit également l'expression de Wnt5a ce qui réduit l'activation de la voie de Wnt5a.

De plus la présence de PPAR γ et son activation *in vivo* induit l'expression de SFRP2, un inhibiteur de la voie des Wnt/ β -catenin. SFRP2 séquestre Wnt5a à distance de son récepteur et bloque ainsi l'induction de Cart1.

L'absence de LRP1 et la présence de PPAR γ bloque la chondrogenèse.

Les lésions formées en l'absence de LRP1 sont formées principalement de cellules accumulant des lipides.

C/ (Figure I-23C) Les CML dont l'expression de PPAR γ est réprimée présentent *in vivo* une augmentation de Sox9 et Cart1.

En présence de LRP1 et en l'absence de PPAR γ , SFRP2 n'est pas exprimée, et ne peut prévenir l'activation par Wnt5a des deux protéines majeures impliquées dans le programme de différenciation chondrocytaire, Sox9 et Cart1. SPARC pourra également activer l'expression de Sox9 et Cart1.

L'association des deux processus va conduire les CML à changer de phénotype et se différencier en cellules de type chondrocyte ce qui entraîne la formation de calcification vasculaire.

D/ (Figure I-23D) Enfin l'absence de LRP1 et de PPAR γ dans les CML bloquent le recrutement de SPARC dans la cellule et réduit l'expression de Wnt5a. L'absence de PPAR γ bloque l'expression de SFRP2. Wnt5a présent pourra activer la voie canonique des Wnt et induire l'expression de Cart1. L'induction mineure de Cart1 n'est pas suffisante pour que la cellule se différencie en cellule de type chondrocyte.

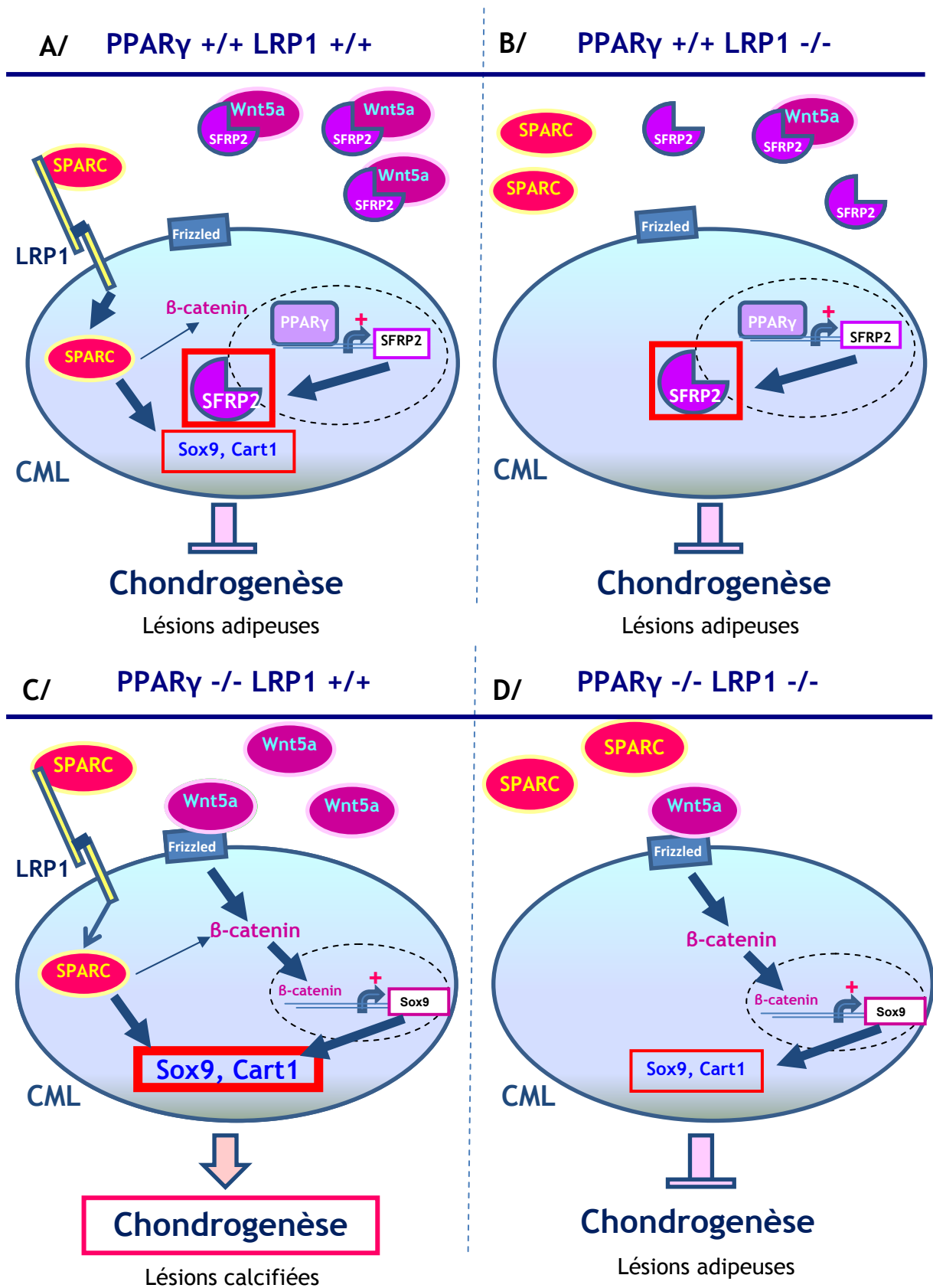


Figure I-23: Mécanisme d'action utilisé par LRP1 pour contrôler la différenciation cellulaire.

Partie 1 :

Conclusion

5. Conclusion

Les fonctions de LRP1 dans l'accumulation de cholestérol et d'esters de cholestérol sont à ce jour bien comprises. Dans cette étude nous avons mis en évidence l'implication de LRP1 et de PPAR γ dans les processus de différenciation chondrocytaire.

L'expression de LRP1 et/ou de PPAR γ dans les CML protège contre l'athérosclérose. *In vitro* nous avons mis en évidence que la présence de LRP1 est nécessaire pour l'activation du programme de différenciation chondrocytaire et qu'en son absence les cellules accumulent des lipides neutres sous la forme d'esters de cholestérol. *In vivo* en l'absence de PPAR γ , LRP1 induit la formation de lésions athéroscléreuses dépourvues de cellules spumeuses mais présentant des cellules accumulant du phosphate de calcium et surexprimant Sox9 et Cart1, des marqueurs spécifiques des chondrocytes. Ainsi *in vivo* le phénomène de différenciation chondrocytaire induit en présence de LRP1 est accéléré en l'absence de PPAR γ .

Le mécanisme d'action utilisé par LRP1 et par PPAR γ pour induire la formation de ces lésions calcifiées passe par le recrutement de SPARC dans la cellule et l'activation de la voie canonique induite par Wnt5a.

LRP1 en fixant SPARC au niveau de son domaine extracellulaire va permettre l'internalisation du complexe et la libération de SPARC dans la cellule. SPARC peut alors activer l'expression de Sox9 et Cart1 et stabiliser la β -catenin. Cependant *in vivo* le recrutement de SPARC dans les CML n'est pas suffisant pour qu'elles puissent se différencier en cellules de type chondrocyte. C'est en l'absence de PPAR γ , que LRP1 induit *in vivo* ce changement phénotypique. L'activation de PPAR γ *in vivo* va induire l'expression de ses gènes cibles notamment SFRP2. SFRP2 est une protéine sécrétée qui va permettre de séquestrer les protéines Wnt à distance de leur récepteur. Wnt ne pourra plus activer la voie canonique et induire l'expression de Sox9 et Cart1.

En l'absence de PPAR γ , l'expression de SFRP2 est réprimée et l'expression de Wnt5a est induite par LRP1. L'activation de la β -catenin et de LEF a été décrite comme activateur de l'expression de Sox9 [Yano et al.,2005] de plus nous avons montré que Wnt5a est également capable d'induire l'expression de Sox9 et de Cart1. Ainsi SPARC via LRP1 associé à l'activation de la voie de Wnt5a va permettre la trans-différenciation des CML en cellules pseudo-chondrocytaires et la formation de lésions calcifiées.

Partie 1 :

Discussion

6 *Discussion*

6.1 Rôle de PPAR γ et LRP1 dans CML de la paroi vasculaire

L'étude de l'inactivation de LRP1 et/ou de PPAR γ dans les cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire nous a permis de mettre en évidence la coordination de ces deux partenaires dans de nombreux processus de régulation vasculaire entraînant la formation de plaques d'athérome.

En effet l'inactivation de LRP1 ou de PPAR γ dans les CML entraîne, en l'absence du récepteur aux LDL, la formation accrue de plaques d'athérome tout au long de l'aorte. Cet épaissement de l'intima utilise de nombreux processus de régulation notamment la prolifération et la différenciation, conduisant à la formation de cellules spumeuses et à la calcification vasculaire, des CML.

6.1.1 *LRP1 et PPAR γ : modulateurs de la différenciation des CML de la paroi vasculaire*

LRP1 et PPAR γ sont des protéines impliquées dans le contrôle de la différenciation cellulaire [Lehti et al.,2009][Terrand et al.,2009]. Dans cette étude nous avons montré que la répression de PPAR γ et /ou de LRP1 dans les CML modifie la composition de la plaque d'athérome (Figure I-8A). Elle est principalement composée de cellules spumeuses lorsque l'expression de LRP1 ou à la fois de PPAR γ et de LRP1 est inactivé dans les CML (Figure I-8A). Cependant lorsque LRP1 est présent et PPAR γ est réprimé dans les CML on observe la formation de cellules accumulant du phosphate de calcium et des GAG sulfatés et surexprimant deux facteurs de transcriptions spécifiques des chondrocytes, Sox9 et Cart1 (Figures I- 2B, 2C, 2D, 8A (b, j, f, l), 8B). Ces lésions formées en l'absence de PPAR γ dans les CML ont les caractéristiques d'une calcification vasculaire de l'intima.

6.1.1.1 PPAR γ et LRP1 : modulateurs de la formation des cellules spumeuses au cours de l'adipogenèse

La formation des stries lipidiques, caractérisées par la formation de cellules spumeuses gorgées de lipides, est une étape précoce dans le développement de l'athérosclérose [Roos et al.,1986]. De nombreuses études ont établi que ces cellules spumeuses sont issues de macrophages dérivés des monocytes circulants [Tabas et

al.,2002][Ross et al.,1993]. Cependant l'existence de CML accumulant les lipides *in vivo* [Faggiotto et al.,1984] et la capacité des CML à se différencier en cellules spumeuses *in vitro* [Wolfbauer et al., 1986][Klouche et al.,2000][Rong et al.,2003] ont été démontrées. Les CML sont capables d'accumuler des lipides tels que les esters de cholestérol [Hashimoto et al.,1988], des lipoprotéines modifiées et ainsi participer à la formation du cœur lipidique de la plaque d'athérome.

Dans notre étude nous avons montré que l'absence de LRP1 ainsi que la double inactivation de LRP1 et de PPAR γ dans les CML entraînent la formation de lésions spumeuses (Figure I-8A). Ceci signifie que LRP1 et/ou PPAR γ contrôlent le processus de capture lipidiques.

Dans un cocktail de différenciation adipocytaire nous avons montré que LRP1 dans les MEF inhibe l'accumulation de lipides neutres (Figure I-1). Le programme de différenciation adipocytaire est activé en présence de LRP1 après stimulation par un cocktail de différenciation adipocytaire, mais n'entraîne pas la formation d'adipocytes [Terrand et al., 2009].

Les protéines de la famille de Wnt sont des molécules importantes de la signalisation qui sont impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire et de la différenciation cellulaire au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte. La voie de signalisation de Wnt est capable d'inhiber l'adipogenèse [Nie et al.,2009] et de réguler le métabolisme du cholestérol [Fujino et al., 2003][Mermelstein et al., 2007]. De plus la présence de LRP5 un corécepteur de Frizzled est important pour le métabolisme normal du cholestérol. Nous avons ainsi montré qu'en activant la voie canonique de Wnt par induction de l'expression de Wnt5a, nous corrigeons l'accumulation anormale de cholestérol dans les MEF LRP1 $^{-/-}$ [Terrand et al. 2009]. L'absence de Wnt5a et de LRP1 dans les MEF conduit à une augmentation de l'expression d'un récepteur de capture du cholestérol, le récepteur au LDL sans induire l'expression de récepteur d'efflux du cholestérol, tels que l'apolipoprotéine A1, ABCG1 (ATP-binding cassette subfamily G member 1), SCARB1 (scavenger receptor class B member 1) et à la formation de cellules spumeuses.

D'autre part, nous avons montré que LRP1 régule, par la voie canonique de Wnt, l'activation de l'acetyl-coA carboxylase (ACC) et ainsi la synthèse des acides gras [Terrand et al.,2009]. Nous avons également montré *in vitro* durant le programme de différenciation adipocytaire que l'expression de HSL une enzyme induisant la lipolyse est réduite en l'absence de LRP1 [Terrand et al.,2009]. LRP1 permet de maintenir un taux d'acide gras constant en activant la synthèse et la dégradation des acides gras.

Cette observation explique pourquoi dans les MEF LRP1 +/+ nous n'observons pas une accumulation de triglycérides malgré le programme de différenciation adipocytaire activé. LRP1 contrôle l'accumulation du cholestérol, le métabolisme des acides gras et la lipolyse des acides gras. L'absence de LRP1 dans les CML chez la souris conduit à la formation de cellules spumeuses au sein de la plaque d'athérome (Figures I-8A d,h)

La présence de PPAR γ dans les CML chez la souris entraîne au même titre que l'inactivation de l'expression de LRP1 dans les CML, la formation de cellules spumeuses dans les lésions athéroscléreuses (Figures I-8A a,e). Il est connu que PPAR γ est exprimé dans les cellules spumeuses provenant des macrophages et dans les lésions athéroscléreuses [Marx et al.,1998][Ricote et al.,1998][Ricote et al., 1998b][Tontonoz et al.,1998]. L'activation de PPAR γ régule la transcription de nombreux gènes liés à la capture et au métabolisme lipidique. CD36, un gène cible de PPAR γ , est un récepteur éboueur de la classe B (SR-B) qui capture jusqu'à 50% des lipides dans les macrophages et est surexprimé dans les CML de la paroi vasculaire [Greenwald et al.,1992][Nozaki et al., 1995]. Cependant l'expression de ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1), un récepteur d'efflux du cholestérol est diminuée dans les CML vasculaires, ce qui contribue à la formation de cellules spumeuses [Choi et al.,2009]. De plus le facteur de croissance, PDGF présent au sein de la plaque d'athérome contribue à l'expression de PPAR γ dans les CML [Fu et al., 2001]. Ainsi la sur-activation de la voie du PDGFBB en l'absence de LRP1 dans les CML chez la souris contribue d'avantage à la formation des cellules spumeuses [Boucher et al.,2003]. D'autre part nous avons montré que SFRP2 est un gène cible de PPAR γ (Figure I-22). Wnt5a produit par LRP1 bloque l'accumulation du cholestérol [Terrand et al., 2009]. L'inhibition de Wnt5a par SFRP2 active donc l'accumulation de cholestérol dans les CML en présence de PPAR γ . La présence de PPAR γ inhibe l'action de Wnt5a par SFRP2, active l'expression de protéines de capture du cholestérol et permet la formation de cellules spumeuses.

Par conséquent l'absence de LRP1 ou la présence de PPAR γ dans les CML conduit à les CML de la paroi vasculaire à accumuler du cholestérol, et contribue ainsi à la croissance du cœur lipidique de la plaque d'athérome.

6.1.1.2 PPAR γ et LRP1 : modulateurs de la formation de cellules cartilagineuses au cours de la chondrogenèse

L'absence de PPAR γ et la présence de LRP1 dans les CML bloquent la formation de cellules spumeuses mais entraînent la formation de cellules de type chondrocyte et conduit à une calcification vasculaire accélérée (Figures I-8A, 8B, 9).

La calcification vasculaire est induite par un dépôt anormal de phosphate de calcium dans la paroi vasculaire. Dans les lésions athéroscléreuse, la calcification est principalement observée dans l'intima des vaisseaux sanguin sous forme de ponctuation dispersée dans la lésion ou associée au centre nécrotique. Bien que considérée comme un processus dégénératif et incontrôlé, la présence de protéines relatives à l'os, de cellules morphologiquement proche des chondrocytes et de tissus cartilagineux dans les lésions calcifiées soulignent la nature active des cellules de la lésion athéroscléreuse [Shanahan et al.,1999][Moe et al.,2002][Tyson et al., 2003][Bobryshed et al.,2005]. Steitz et al. ont montré l'association de la calcification vasculaire à la transition phénotypique des CML, dans lesquelles sont exprimées des protéines ostéogéniques telles que l'ostéopontine, l'ostéocalcine et Cbfa1/Runx2 [Steitz et al.,2001]. De plus l'analyse histologique d'aortes calcifiées humaines, de souris ApoE -/- [Bobryshed et al.,2005] et de souris MGP -/- [Speer et al., 2009] ont confirmé que la trans-différenciation des CML en chondrocytes contribue à la calcification athéroscléreuse. Cette différenciation est associée à l'augmentation de l'expression de Sox9 [Bobryshed et al.,2005] ou à l'activation de ERK 1/2 [Speer et al.,2009]

Notre étude a permis de comprendre un des mécanismes utilisé par les CML pour se différencier en cellules de type chondrocytes et exprimer Sox9 et Cart1. Le modèle animal que l'on a utilisé consistait à bloquer la formation de cellules spumeuses à partir des CML et à engager la CML vers une autre voie de différenciation cellulaire, celle de la chondrogenèse. Pour cela nous avons inactivé l'expression de PPAR γ , un activateur majeur de la différenciation adipocytaire. De plus pour comprendre le rôle de LRP1 dans ces phénomènes de différenciation cellulaire nous avons ou non inhibé l'expression de LRP1 dans les CML.

Nous avons montré que ces souris développent une augmentation de la pression artérielle systolique (Figure I-4A). Cette augmentation de pression induite par modification génétique de PPAR γ a été mise en évidence dans plusieurs études. En effet l'activation de PPAR γ par les thiazolinedinediones (TZD) diminue la pression

artérielle et protège contre les maladies cardiovasculaires [Bennett et al., 2004][Dormandy et al.,2005]. D'autre part toujours en accord avec nos observations la mutation de PPAR γ sous la dépendance du promoteur spécifique des CML entraîne une hypertension sévère [Halabi et al.,2008]. Dans notre modèle nous n'avons pas observé de modification de la réactivité vasculaire (Figures I-4C) ce que Halabi et al. ont mis en évidence dans leur étude [Halabi et al.,2008].

L'hypertension artérielle est un facteur de risque lié à l'athérosclérose pouvant conduire à des complications sévères telles que la calcification vasculaire [Rennenberg et al.,2008].

Ainsi les CML ont la possibilité de former des cellules de type chondrocyte (Figures I-8A b,f,j,l) au sein de la plaque d'athérome comme celles observées par Bobryshed et al. dans les lésions calcifiées humaines [Bobryshed et al.,2005]. L'analyse histologique *in vivo* et *in vitro* nous a permis de mettre en évidence deux partenaires impliqués dans la formation de ces cellules pseudo-chondrocytaires au sein de la lésion : SPARC et la voie de Wnt/ β -catenin.

Nous avons montré une augmentation de l'expression de Wnt5a dans l'aorte des souris PPAR γ *-/-* (Figures I-20). L'expression de Wnt5a par l'activation de TGF- β conduit à la stabilisation de la β -catenin et conduit à la différenciation des cellules mésenchymateuses en chondrocytes surexprimant Sox9 [Zhou et al.,2004]. Wnt5a produit seulement en la présence de LRP1 [Terrand et al., 2009] dans la paroi vasculaire active la voie canonique et ainsi active l'expression de Cart1 (Figures I-21) qui induit à son tour l'expression de protéines chondrogéniques qui contribuent aux changements morphologiques observés dans les cellules pseudo-chondrocytaires. Par ailleurs de nombreuses études ont montré l'implication des Wnt dans la calcification vasculaire [Shao et al., 2005][Al-aly et al.,2007]. L'activation de Wnt est une des conséquences de l'expression de Msx2 induite par BMP-2 (Bone morphogenic protein 2) dans les plaques calcifiées chez la souris LDLr $-/-$, induisant l'activation de l'ostéogenèse [Shao et al.,2005]. D'autres études ont également montré que l'expression de LRP5 un co-activateur de la voie canonique de Wnt est activée dans des zones des valves cardiaques humaines où la chondrogenèse ou l'ostéogenèse est enclenchée [Caira et al., 2006]. Enfin Wnt semble avoir un rôle bien établi dans la régulation de la calcification vasculaire et dans la trans-différenciation *in vitro* des CML de l'aorte en ostéoblastes [Hruska et al,2005][Bostrom et al., 1993][Shao et al.,2005][Zebboudji et al,2002][Rawadi et al.,2003]. Cependant dans notre étude nous n'avons pas mis en évidence de modification de l'expression de BMP-2 et -4, en

revanche l'activation de Wnt/ β -catenin et l'expression de Sox9 et Cart1 conduit à la formation de cellules de type chondrocyte dans les aortes des souris LRP1^{+/+} et PPAR γ ^{-/-} (Figures I-8B et 21).

Néanmoins SPARC est également un membre actif dans la régulation de la calcification vasculaire. SPARC est exprimée dans les CML prélevées de paroi vasculaire possédant un potentiel important à former des précurseurs ostéogéniques [Watson et al.,1994]. SPARC a été décrit comme inhibiteur de l'adipogenèse et inducteur de l'ostéogenèse [Nie et al.,2009]. SPARC réprime l'expression de facteurs de transcription adipogènes tels que C/EBP β , C/EBP α et PPAR γ et des gènes spécifiques des adipocytes (aP2) [Nie et al.,2009]. SPARC induit également l'accumulation et la migration de la β -catenin dans le noyau, une voie contrôlée en partie par l'ILK (integrin- linked kinase) une protéine cible de SPARC [Barker et al.,2005]. SPARC contrôle également par ILK la production de protéines de la matrice extracellulaire et des intégrines et contribue ainsi aux changements morphologiques des cellules lors de la différenciation cellulaire [Nie et al.,2009][Francki et al.,1999][Bradshaw et al.,2003b][Gruber et al.,2005]. En accord avec les résultats nous avons prouvé que SPARC est capable par l'intermédiaire de LRP1 de réguler l'activation de la voie de Wnt (Figure I-19) et l'expression des facteurs de transcription Sox9 et Cart1 (Figure I-18) et ainsi permettre d'activer les changements morphologiques de la cellule tels que l'expression de GAG sulfaté, l'accumulation de phosphate de calcium et l'expression de l'ALP.

L'absence de PPAR γ et la présence de LRP1 dans les CML contribuent par activation de la voie de Wnt/ β -catenin et par internalisation de SPARC à l'activation de la chondrogenèse et à la formation de lésions athéroscléreuse.

6.1.2 LRP1 et PPAR γ : Inhibiteurs de la prolifération cellulaire

Nous avons montré que l'inactivation de l'expression de PPAR γ et /ou de LRP1 dans les CML provoque une incidence accrue à la formation de plaques d'athérome (Figures I-7, I-8A).

Plusieurs études ont montré que l'activation de PPAR γ bloque la prolifération des CML de la paroi vasculaire en inhibant la progression dans le cycle cellulaire [Wakino et al.,2000][Bruemmer et al.,2003][Dios et al.,2003]. L'activation de PPAR γ par les glitazones bloque la dégradation de p27^{Kip1}, une CDKI (cyclin-dependant kinase inhibitor) qui inhibe l'activité de la cyclin/CDK et par conséquent réduit la

phosphorylation de la protéine RB (retinoblastoma) ce qui entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 [Wakino et al.,2000]. De plus l'activation de PPAR γ bloque la réplication de l'ADN en inhibant l'expression des protéines de maintenance du minichromosome (MCM protein) et par conséquent en bloquant la signalisation de la famille des facteurs de transcription E2F qui permettent l'entrée en phase S [Bruemmer et al.,2003 b][Ohtani et al.,1999].

PPAR γ peut également interagir avec des molécules de la signalisation intracellulaire pour contrôler l'expression de gènes [Gilde et al., 2006]. En effet, il a été montré que PPAR γ est capable de bloquer la phosphorylation et l'activation de ERK $\frac{1}{2}$ [Kim et al.,2009][Marx et al., 2004], une protéine kinase impliquée dans la voie du PDGFBB et du récepteur β au PDGF entraînant la prolifération des CML de la paroi vasculaire. Cette régulation passe par la modulation de la transcription de l'apolipoprotéine E (ApoE). En effet un élément de réponse à PPAR (PPRE) est présent dans le promoteur de l'ApoE [Galetto et al., 2001]. L'inactivation conditionnelle de l'expression de PPAR γ chez la souris résulte en la diminution de l'expression de l'ApoE. L'ApoE inhibe la prolifération et la migration des CML induite par le PDGFBB [Zeleny et al., 2002][Ishigami et al.,1998], c'est en se liant au LRP1 que l'ApoE entraîne l'internalisation et la dégradation du récepteur au PDGF, empêchant ainsi l'activation de la voie de ERK [Boucher et al., 2003][Newton et al., 2005][Boucher et al.,2004]. Ce phénotype est également observé chez les souris où l'expression de LRP1 est inactivée dans les CML. En effet au laboratoire nous avons montré que l'inactivation de LRP1 dans les CML chez la souris, révèle une augmentation de la phosphorylation de ERK $\frac{1}{2}$ induite par le PDGFBB [Boucher et al.,2003]. LRP1 est un co-récepteur du récepteur au PDGF et est capable de lier le PDGFBB [Loukinova et al.,2003][Newton et al.,2005]. La formation de ce complexe membranaire est importante pour une activation régulée de la prolifération cellulaire. Ceci laisse penser que LRP1 et PPAR γ fonctionnent en partie en synergie pour contrôler la prolifération des CML et protéger contre l'athérosclérose.

D'autre part dans notre étude nous avons montré que PPAR γ induit l'expression de SFRP2, un inhibiteur de la voie canonique de Wnt (Figure 13). L'activation de la voie de Wnt/ β -catenin entraîne l'expression de la cyclin D1 et induit la prolifération de CML vasculaires [Wang et al.,2002, 2004]. SFRP1 un autre membre de la famille des protéines SFRP inhibitrices de la voie de Wnt/ β -catenin, bloque la prolifération des CML vasculaires [Ezan et al., 2004]. Ainsi PPAR γ semble également inhiber la croissance des CML de la paroi vasculaire en contrôlant la voie de Wnt/ β -catenin.

Nous avons montré que SPARC doit être internalisée dans la cellule par LRP1 pour moduler l'expression de gènes (Figures 6D, 6E, 7C). SPARC a été décrite comme une protéine bloquant la prolifération cellulaire en bloquant d'une part l'interaction du PDGFBB à son récepteur [Raines et al.,1992]. D'autre part, elle empêche la transition de la phase G1 vers la phase S en diminuant l'activité de Cdk2 associé à la cyclin-E, en inhibant l'expression de p107 et de la cyclin A et en bloquant la phosphorylation de RB [Motamed et al.,2002]. Ainsi LRP1 en modulant la localisation de SPARC semble réguler la prolifération des CML.

L'association de LRP1 et de PPAR γ régule la prolifération des CML de diverses manières, principalement en modulant l'expression de protéines nécessaires à la progression du cycle cellulaire vers la phase S et en contrôlant la voie de signalisation du PDGFBB et de Wnt/ β -catenin. Ainsi PPAR γ et LRP1 inhibe la prolifération des CML de la paroi vasculaire et protège contre la croissance de la plaque d'athérome.

6.2 Implication de cette étude

6.2.1 *Implication fondamentale*

La chondrogenèse est un processus complexe hautement régulée par divers stimuli incluant une variété d'hormones. Le processus de différenciation terminal qui est sous le contrôle d'une série complexe de régulateurs transcriptionnels, n'est pas complètement élucidé. En outre, on connaît quelques-uns des événements transcriptionnels impliqués dans la détermination chondrocytaire ainsi que les facteurs et les mécanismes qui régulent l'entrée dans le programme de différenciation chondrocytaire. Nous aspirons à identifier des nouveaux médiateurs cellulaires et moléculaires de la calcification artérielle et de nouveaux gènes impliqués dans le contrôle du programme de différenciation chondrocytaire. Nous avons, dans cette étude caractérisé LRP1 et PPAR γ comme des régulateurs clé de calcification artérielle et cartilagineuse. LRP1 contrôle la voie de signalisation de Wnt par l'intermédiaire de SPARC, une voie régulant les processus de différenciation cellulaires. Cette découverte étend la fonction de LRP1 d'un récepteur d'endocytose à la signalisation moléculaire impliquée dans des fonctions biologiques fondamentales, comme celle impliquée dans le contrôle de la détermination cellulaire.

6.2.2 *Implication Clinique*

Le concept de régulation des processus d'ossification pour prévenir de la calcification vasculaire a réapparu il y a environ 100 ans. Approximativement 15 % des plaques d'athérome carotidiennes et des valves cardiaques calcifiées développe une ossification. En outre la calcification dystrophique est toujours associée à un pronostic sombre, prédisposant les patients à une mortalité cardiovasculaire et à l'amputation des membres inférieurs. Malgré sa pertinence clinique, il n'y a aucune cible moléculaire appropriée et aucune thérapie satisfaisante qui peut aider à combattre la calcification vasculaire.

La compréhension des processus de chondrogenèse est importante aussi bien pour éviter la calcification de la paroi vasculaire que pour le traitement des maladies du cartilage ou des lésions. Le tissu cartilagineux lésé ne peut pas guérir spontanément et, s'il n'est pas traité, peut mener à l'osteoarthrite. En raison de sa capacité limitée à l'auto-réparation, le cartilage est un candidat idéal à l'ingénierie tissulaire. La régénération du cartilage est parmi les secteurs les plus prometteurs de réparation tissulaire. La disponibilité de nouveaux outils, comme des cellules mésenchymateuses multipotentes (MSC) et des technologies de transfert de gène constituent de nouvelles approches thérapeutiques. Cependant, les traitements actuels peuvent rarement rétablir la fonction complète du cartilage d'origine et il y a un besoin urgent d'une compréhension complète du programme de différenciation chondrocytaire. Notre études aspire à comprendre le mécanisme conduisant à la calcification vasculaire et à la chondrogenèse et favorisera ainsi une nouvelle approche thérapeutique profitable à la médecine cardiovasculaire, mais aussi la réparation de cartilage.

A ce jour, deux acteurs principaux, PPAR γ et LRP1 sont impliqués dans la régulation de la calcification vasculaire et dans la chondrogenèse. Ces deux protéines impliquées dans de nombreux processus de régulation de la différenciation cellulaire permettent d'orienter le devenir cellulaire. Ainsi en modulant leur expression on peut contrôler la détermination cellulaire. L'analyse phénotypique, des souris dont l'expression de PPAR et /ou de LRP1 est inactivée dans les CML, nous a permis de mieux comprendre le mécanisme utilisé par ces protéines pour induire la calcification vasculaire. De plus cette étude a révélé d'autres intermédiaires protéiques indispensables à cette régulation. La voie canonique de Wnt et la protéine SPARC.

Partie 1 :

Perspectives

7. Perspectives

7.1. LRP1 et PPAR γ dans la différenciation chondrocytaire *in vitro*

Afin de confirmer l'implication de PPAR γ et de LRP1 dans les phénomènes de chondrogenèse et de mieux comprendre le mécanisme d'action utilisé par LRP1 et PPAR γ pour contrôler le phénomène, l'analyse *in vitro* de ce phénotype reste à être établi. En effet la différenciation des MEF PPAR γ ^{flox/flox} et des MEF PPAR γ / LRP1^{flox/flox} ne nous ont pas permis d'induire de différenciation chondrocytaire après infection avec un adénovirus qui exprime la CRE recombinase. Afin de rendre cette différenciation possible et de prouver le rôle de LRP1 et de PPAR γ dans l'activation de la chondrogenèse *in vitro*, l'utilisation de cellules pluripotentes tels que les cellules ES ou les cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse semble être plus adaptée que les MEF.

L'obtention de cellules ES (Embryonnaire Souche) ou de cellules mésenchymateuses est possible à partir de nos animaux PPAR^{flox/flox} et/ou LRP1^{flox/flox}. Les cellules ES sont prélevées de la masse cellulaire interne (ICM) du blastocyste préimplantatoire [Reubinoff et al., 2000] [Thomson et al., 1998]. Les cellules ES possèdent la capacité de générer tous les types cellulaires de l'organisme représentant les trois lignages qui sont à l'origine de l'organisme adulte : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Ces caractéristiques primordiales en font un outil idéal pour confirmer l'implication de PPAR γ et de LRP1 dans les phénomènes de différenciation cellulaire.

7.2. Interaction entre SPARC et LRP1

L'interaction de SPARC et de LRP1 est un des mécanismes de contrôle de la différenciation chondrocytaire. LRP1 est capable d'internaliser de nombreux ligands comme PAI1, la thrombospondine, le PDGFBB, qui sont également des protéines interagissant avec SPARC [Cleardin et al.,1988] [Raines et al.,1992]. La compréhension de cette interaction nous permettra de mieux cibler le mécanisme utilisé par ces deux protéines pour contrôler la différenciation cellulaire.

Pour déterminer si cette interaction est directe nous avons développé plusieurs méthodes. La technique du Biacore permet d'étudier les interactions moléculaires en temps réel sans marquage d'un des deux interactants. L'appareil fonctionne sur le principe d'un biocapteur basé sur l'utilisation de la résonance plasmonique de surface qui détecte des variations de masse à la surface d'une sensor chip sur laquelle un des

deux interactants (LRP1) est immobilisé de façon non covalente par l'intermédiaire d'un anticorps. L'autre interactant (SPARC) est injecté par un système microfluidique dans un flux continu de tampon à la surface de la sensor chip. Le suivi en temps réel permet de déterminer les constantes cinétiques d'association et de dissociation, et d'en déduire la valeur de la constante d'affinité. La concentration en molécules fonctionnelles, la stoechiométrie, la cartographie des sites d'interaction ainsi que certains paramètres thermodynamiques peuvent également être déterminés par cette technologie. L'analyse de cette interaction au « Biacore » ne nous a, pour l'instant, pas permis de justifier d'une interaction directe entre LRP1 et SPARC. Nous utiliserons une autre approche en parallèle : le FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) basé sur la mesure du déclin de fluorescence du donneur (FLIM ; *fluorescence lifetime imaging microscopy*). Cette technique nous permet de mettre en évidence par transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes (SPARC-GFP (*green fluorescent protein*) le donneur et LRP1-TC, (rouge) l'accepteur) si les deux partenaires SPARC et LRP1 sont à une distance inférieure de 10 nm. Ceci permet de déterminer si cette interaction entre les deux partenaires est directe.

En revanche si l'interaction entre SPARC et LRP1 passe par un intermédiaire protéique, nous essayerons d'identifier l'intermédiaire protéique nécessaire à établir l'interaction entre SPARC et LRP1 par la technique d'ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*).

7.3. Rôle de SPARC dans le noyau

Nous avons montré que SPARC est internalisée dans la cellule par LRP1. Elle a été localisée dans le noyau, cependant sa fonction nucléaire n'est à ce jour pas encore comprise. SPARC est une petite protéine de 41kDa ne possédant pas de signal de localisation nucléaire (NLS). Cependant les protéines de poids moléculaire inférieur à 50 kDa sont capables de diffuser passivement dans le noyau [Yan et al.,2005].

De plus la localisation intracellulaire de SPARC est corrélée à une modulation de l'expression de gènes tels que Sox9 et Cart1 qui laisse penser que SPARC peut être un régulateur de la transcription. En effet l'analyse structurale de SPARC révèle la présence d'un domaine possédant deux régions de type « EF-Hand » ayant une grande affinité pour le calcium. Cette organisation fait penser à la protéine DREAM, régulateur de la transcription de gène calcium dépendant. Cependant SPARC ne semble pas avoir de domaine de liaison à l'ADN. Ceci peut être vérifié par la technique de CHIP (*Chromatin immunoprecipitationsequencing*).

7.4. Caractérisation phénotypique des souris déficientes en PPAR γ et/ou en LRP1 dans les chondrocytes et dans les cellules mésenchymateuses

Il est évident que les protéines impliquées dans les phénomènes de chondrogenèse vasculaire sont aussi impliquées dans la formation du cartilage et dans la minéralisation osseuse [Abedin et al 2004]. Pour déterminer le rôle respectif de LRP1 et de PPAR γ dans la formation du cartilage et comprendre leur rôle au cours des étapes de la chondrogenèse et de la différenciation chondrocytaire nous inactivons leur expression dans des cellules non différenciées. Nous croiserons des souris PPAR γ ^{flox/flox} et /ou LRP1^{flox/flox} avec des souris transgéniques qui expriment la CRE recombinase sous la dépendance du promoteur Prx1 spécifique des cellules mésenchymateuses ou du promoteur Col2a spécifique des chondrocytes. L'expression de la CRE dans les cellules Prx1 entraîne l'inactivation des gènes dans les cellules mésenchymateuses non différenciées des futurs membres et dans le mésenchyme craniofaciale [Logan et al.,2002]. Le collagène de type II est le marqueur principal des chondrocytes et est exprimé au cours de l'embryogenèse lors de la différenciation de somites en sclérotome [Ovchinnikov et al.,2000]. Ainsi l'expression de Col2-Cre entraîne l'excision de LRP1 et/ou de PPAR γ dans les chondrocytes après condensation mésenchymateuses.

L'analyse phénotypique de ces souris nous permettra de vérifier si le mécanisme mis en jeu dans la paroi vasculaire est identique lors de la formation du cartilage au cours de l'embryogenèse.

Mécanismes moléculaires utilisés par LRP1 pour contrôler la différenciation et la prolifération des CML dans l'Athérosclérose

Partie 2 :

LRP1-ShcA, un aiguilleur dans la voie de signalisation de l'IGF-1 impliqué dans la protection contre l'athérosclérose

Partie 2 :

Introduction

1 Introduction

1.1. La voie de l'IGF-1 dans le développement de l'athérosclérose

1.1.1. La voie de l'IGF-1

L'IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) est un polypeptide de 7500 Da impliqué dans la croissance cellulaire et synthétisé majoritairement dans le foie. L'IGF-1 circule à de fortes concentrations (150 à 400 ng/ml) dans le plasma lié aux 6 membres de la famille de l'IGFBP (IGF binding protein), principalement à l'IGFBP-3 le plus abondant dans la circulation. La forme libre et active représente moins de 1 % de la concentration totale circulante [Clemmons et al., 2007]. En plus de son effet endocrine sur de nombreux tissus, l'IGF-1 est sécrété par tous les types cellulaires et est capable d'agir de façon autocrine et paracrine [Delafontaine et al., 1995][Jones et al., 1995]. La majeure partie des effets induits par l'IGF-1 est dû à son interaction avec le récepteur à l'IGF-1 (IGF-1R). Ce récepteur est un hétéro-tétramère composé de deux sous unités α extracellulaires liées par des ponts disulfures à deux sous unités β transmembranaires et cytoplasmiques [Riedemann et al., 2006]. Le domaine extracellulaire possède le site de liaison à l'hormone et le domaine cytoplasmique possède l'activité catalytique tyrosine kinase. Après liaison de son ligand, le récepteur change de conformation et induit par son activité tyrosine-kinase son auto-phosphorylation servant ainsi de point d'ancrage à ShcA (Src-homology and collagen protein A), à IRS-1 (insulin receptor substrate 1) [Tsuruzoe et al., 2001][Surmacz et al., 1998][Sepp-Lorenzino et al., 1998], à IRS-2 [de Blaquièrre et al., 2009] et à ASK1 (Apoptosis Signal regulating Kinase 1) [Galvan et al., 2003] (Figure II-1). L'activation de ces protéines adaptatrices active un réseau de protéines kinases aboutissant à l'activation des voies de signalisation, incluant la voie de Pi3K/Akt (PKB) et celle de Ras/MAPK [LeRoith et al., 1995][Saltiel et al., 2001] (Figure II-1). Ces voies entraînent diverses actions biologiques telles que la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaire [Steward et al., 1996].

Le récepteur à l'IGF-1 peut fonctionner seul ou associé à un corécepteur, tel que à l'intégrine α V β 3 [Clemmons et al., 2005]. L'activation de l'intégrine α V β 3 par la vitronectin ou l'ostéopontin dans les CML permet d'induire une activation optimale de la voie de Ras :ERK à la stimulation par l'IGF-1 [Jones et al., 1996]. En effet la liaison d'un ligand à l'intégrine α V β 3, dans les CML, active le recrutement de SHP-2 (SH2 tyrosine phosphatase), une tyrosine phosphatase, au niveau de β 3. La phosphorylation de SHPS-1 (SHP-2 substrate-1), une protéine d'ancrage transmembranaire, par l'IGF-1 va permettre le recrutement de SHP-2 de β 3 vers SHPS. Le recrutement de SHP-2 au niveau de SHPS-1 est nécessaire pour le recrutement de

ShcA au niveau de SHPS-1, pour sa phosphorylation en tyrosine et pour une activation optimale de la voie des MAPK en réponse à l'IGF-1. En revanche en inactivant la liaison d'un ligand au niveau de l'intégrine α V β 3, la signalisation de l'IGF-1R est réduite [Maile et al.,2002][Clemmons et al.,1999][Zheng et al.,1998][Clemmons et al.,2005].

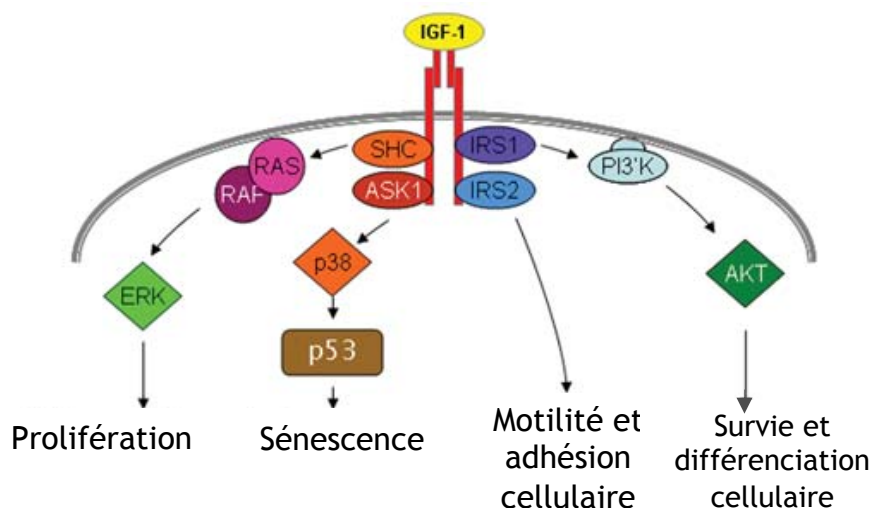


Figure II-1 : Voie de signalisation de l'IGF-1 (source : [Lewis et al.,2009])

1.1.2. L'IGF-1 dans l'athérosclérose

L'implication de l'IGF1 dans différentes étapes de l'athérosclérose est encore débattue et souvent controversée. Cependant de nombreuses études ont montré, chez l'Homme, qu'une diminution de la concentration systémique d'IGF-1 corrélée à une insensibilité à l'insuline accentue le phénomène de résistance à l'insuline et conduit à un risque accru à développer un diabète de type 2, des plaques d'athérome et un infarctus du myocarde [Vaessen et al.,2001] [Juul et al.,2002].

En plus de son effet systémique, l'IGF-1 est synthétisé localement dans les vaisseaux sanguins et fonctionne de façon autocrine et paracrine pour stimuler la progression des lésions athéroscléreuses. En effet, l'IGF-1 est surexprimé dans la paroi vasculaire, suite à une lésion vasculaire provoquée par un cathéter [Khorsandi et al.,1992] ou en cas d'hypertension dans un modèle de coarctation aortique chez le rat [Fath et al.,1993]. De plus, l'augmentation de l'expression l'IGF-1 dans la paroi vasculaire est induites par les macrophages activés dans la paroi lésée [Kirsteim et al.,1992] et les CML [Delafontaine et al.,1992] en réponse à divers stimuli proathérogènes tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou l'angiotensine II [Delafontaine et et al.,2007b]. Cependant d'autres facteurs proathérogènes tels que les LDL oxydés répriment cette augmentation de l'expression de l'IGF-1 [Scheidegger et al.,2000].

Les récepteurs à l'IGF-1 sont également abondants dans les CML de la paroi vasculaire et surexprimés par des facteurs stimulant l'athérosclérose tel que l'angiotensine II [Du et

al.,1999], les ROS [Du et al.,2001], le FGF [Schneidegger et al.,1999], le PDGF [Ververis et al.,1993].

L'augmentation de l'expression des récepteurs à l'IGF-1 sur les CML de la paroi vasculaire corrélée à une induction de l'expression de l'IGF-1 conduit à la migration et à la prolifération des CML de la paroi vasculaire et à la formation d'une néo-intima dans un modèle murin suite à une lésion pariétale [Zhu et al.,2001]. De plus, l'IGF-1 induit également la survie des CML. Ainsi, en plus de son action proliférative, l'IGF-1 bloque l'apoptose des CML entraînant la stabilisation de la lésion [Bennett et al.,1995].

Enfin l'activation de la voie de l'IGF-1 est également capable d'entraîner la dilatation vasculaire. Il peut s'opposer directement à la dysfonction endothéliale en stimulant la libération de monoxyde d'azote (NO), un vasorelaxant puissant [Walsh et al.,1996]. Il peut également stimuler la vasodilatation par l'activation des canaux potassiques qui induit alors une diminution de la quantité de calcium intracellulaire [Izhar et al., 2000].

Mises à part ces observations, de nombreuses équipes ont analysé l'implication directe de l'IGF-1 dans le développement de l'athérosclérose *in vivo*. L'inactivation de la signalisation de l'IGF-1 par la surexpression de l'IGFBP-4 chez le porc se traduit par une inhibition de la prolifération cellulaire et une réduction du développement d'une néo-intima [Nichold et al.,2007]. Chez le rat, l'octreotide, un octapeptide synthétique inhibiteur de l'IGF-1 [Yumi et al.,1994][Yumi et al.,1997][Grant et al.,1994] ou le décapeptide, analogue du domaine D de l'IGF-1 et antagoniste du récepteur à l'IGF-1 [Hayry et al.,1995] bloque la multiplication des CML, l'hyperplasie vasculaire et la resténose. Enfin chez la souris transgénique, la surexpression de l'IGF-1 dans les CML entraîne un épaissement de l'intima de la paroi vasculaire [Zhu et al.,2001]. Ces résultats ont été confirmés, chez l'Homme où l'augmentation de l'IGF-1 circulant est associée à une augmentation de l'épaissement de l'intima et de la média des artères [Kawachi et al. 2005].

1.2. Le LRP1 régulateur de la prolifération cellulaire et protecteur contre l'athérosclérose

1.2.1. Implication de LRP1 dans l'athérosclérose

De par son expression dans le foie, LRP1 a été considéré comme un récepteur de capture de lipoprotéines régulant l'homéostasie du cholestérol et protégeant contre l'athérosclérose. Des évidences biochimiques et génétiques ont montré que LRP1 en coopération avec les LDLr capture les lipoprotéines riches en apoE tels que les chylomicrons [Beisiegel et al.,1989][Rohlmann et al.,1998][Wilnow et al.,1994] et les lipases, contribuant directement à leur catabolisme [Herz et al., 2001]. En plus de son rôle d'épurateur de lipoprotéines, LRP1

est fortement exprimé dans la paroi vasculaire et dans les lésions athéroscléreuses [Luoma et al.,1994]. En effet LRP1 est surexprimé dans les macrophages et contribue à la formation de cellules spumeuses mais est également surexprimé dans les CML de l'intima [Watanabe et al. 1994]. Ces deux types cellulaires sont importants dans la formation des plaques d'athéromes. L'inactivation de LRP1 dans les CML chez la souris LDLr-/- ne présente pas d'effets sur la composition plasmatique ni sur la concentration de triglycérides. En revanche ces animaux présentent une hyperplasie sévère de l'aorte, une lamina élastique lésée et une hyper-susceptibilité à développer des lésions athéroscléreuses [Boucher et al.,2003]. Cette hypercellularité des aortes de souris déficientes en LRP1 et l'augmentation du nombre de cellules avec des noyaux plats typiques des CML suggèrent que l'épaississement de la paroi est dû à une hyper-prolifération des CML. Le marquage immunologique de ces aortes LRP1-/- révèle une surexpression du récepteur au PDGF (PDGFr), une augmentation de sa forme phosphorylée et de phospho-ERK ½ [Boucher et al.,2003].

1.2.2. LRP1 : régulateur de la voie du PDGFBB

Le PDGF est un facteur de croissance qui induit la migration et la prolifération des CML. Dans les années 1990, R. Ross démontre pour la première fois que la migration et la prolifération des CML induite par le PDGFBB est une étape clé dans la formation des plaques d'athérome [Ross ,1993]. *In vitro* l'exposition des CML à l'ApoE, un ligand de LRP1, réduit la migration cellulaire induite par le PDGFBB [Ishigami et al.,1998][Swertfeger et al.,2001]. L'inactivation de LRP1 dans ces cellules rétablit l'effet du PDGFBB en présence de l'ApoE. Ces données laissaient à penser qu'il existait un lien entre le PDGFBB et le LRP1.

L'analyse phénotypique des animaux déficients en LRP1 au niveau des CML a révélé une susceptibilité à former des plaques d'athérome accompagnée d'une hyper-activation de la voie du PDGF [Boucher et al.,2003]. L'équipe de J. Herz a alors testé l'effet d'un inhibiteur de l'activité kinase du PDGFr sur la formation de plaque d'athérome. Ils ont montré que le traitement par le Gleevec réduisait considérablement (d'environ 50%) la formation des lésions d'athéroscléreuses [Boucher et al.,2003]. Cependant le Gleevec inhibe d'autres protéines kinases. Par conséquent ces résultats ne prouvent pas que seule la voie du PDGFr soit régulée par LRP1.

Des études complémentaires ont permis de déterminer un des mécanismes utilisé par LRP1 pour contrôler la voie du PDGF. Dans les cavéoles, régions membranaires enrichies en cholestérol et en une variété de protéines de signalisation, la stimulation du PDGFBB entraîne la phosphorylation de la tyrosine du second motif NPXY présent dans le domaine cytoplasmique du LRP1 [Boucher et al.,2002][Loukinova et al.,2002]. Cette phosphorylation est dépendante de la formation d'un complexe membranaire entre le PDGFBB, le récepteur au PDGF et le LRP1, et de l'activité tyrosine kinase du PDGFr, de Src et de Pi3K (Phosphatidyl-

inositone 3 Kinase) [Loukinova et al.,2002][Boucher et al.,2002][Newton et al.2005]. Ainsi la formation du complexe membranaire et la phosphorylation en tyrosine du domaine cytoplasmique de LRP1 constituent un point d'encrage pour la protéine ShcA. La formation de ce complexe pourrait être utilisée par LRP1 pour contrôler la prolifération des CML et protéger contre l'athérosclérose (Figure II-2). LRP1 fonctionne comme un corécepteur du récepteur au PDGF.

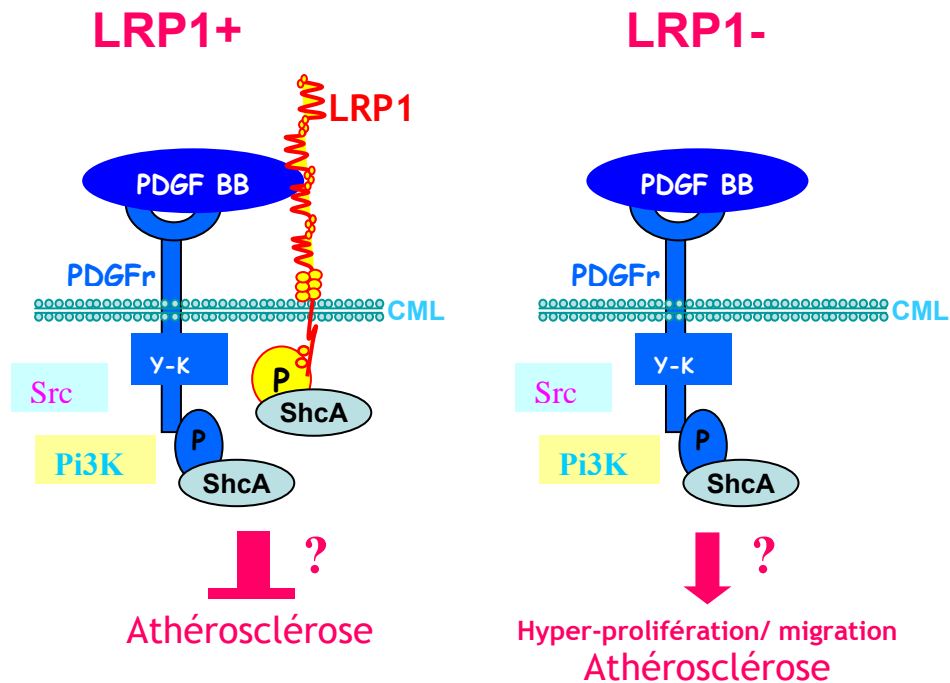


Figure II-2 : Hypothèse ; LRP1 régule la voie du PDGFBB, la prolifération des CML et protège contre l'athérosclérose (la formation du complexe membranaire dans la protection contre l'athérosclérose n'a pas encore été mis en évidence).

1.2.3. LRP1 : régulateur de la voie du TGF- β

LRP1 a été considéré comme étant le récepteur au TGF β -V et co-exprimé avec les récepteurs au TGF β -I, -II et -III. La présence de LRP1/TGF β -V est requise pour inhiber la croissance en réponse au TGF β par la voie de Smad 2/3 et des récepteurs au TGF β -I (TGF β -RI) et -II (TGF β -RII) (Figure II-3) [Huang et al.,2003][Tseng et al.,2004].

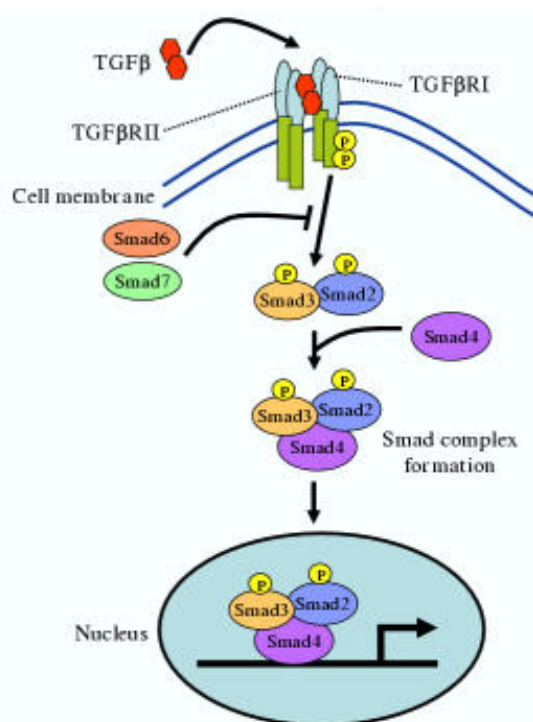


Figure II-3 : Signalisation cellulaire induite par le TGFβ (Source : [Narayan et al.,2003])

L'implication de LRP1 dans la régulation de la voie du TGF-β a été mise en évidence *in vivo* chez la souris. En effet, l'inactivation de l'expression de LRP1 dans les CML chez la souris LDLr^{-/-} entraîne une augmentation de la phosphorylation de Smad 2/3, une lamina élastique lésée, une aorte tortueuse, une augmentation des lésions athéroscléreuses et une augmentation de l'expression des gènes cibles du TGFβ dans la paroi vasculaire tels que la thrombospondine-1 et le récepteur au PDGF [Boucher et al.,2007]. TGFβ est le principal responsable de l'activation de Smad2/3 [Kretzschmar et al.1998] et le LRP1 a été décrit comme étant capable d'induire l'endocytose de ses ligands. LRP1/TGFβ-V est capable de lier directement TGFβ [Huang et al.,2003] et de former un complexe avec le récepteur au TGFβ-I [Liu et al.,1997]. Par liaison et endocytose du facteur de croissance actif et par séquestration du récepteur au TGFβ-I à distance du récepteur au TGFβ-II, LRP1 est dans une position centrale pour inhiber la voie du TGFβ et la croissance cellulaire. En revanche l'absence de LRP1 dans les CML de la paroi vasculaire se traduit par une activation de la voie du TGFβ conduisant ainsi à une prolifération excessive et la formation de lésions athéroscléreuses (Figure II-4).

De plus TGFβ est également capable d'induire l'expression à la fois de facteur de croissance tels que le PDGF, le CTGF (Connective Tissue Growth Factor) mais aussi du récepteur au PDGF [Battegay et al.,1990][Igarashi et al.,1993][Ihn et al.,2002][Taylor et al., 2000][Ikuno et al.,2002]. Ainsi, en l'absence de LRP1 dans les CML, l'induction de la voie du TGFβ entraîne l'expression de PDGF et l'activation du PDGF également responsable de l'hyper-susceptibilité à développer des plaques d'athérome [Boucher et al.,2007][Boucher et al.,2003].

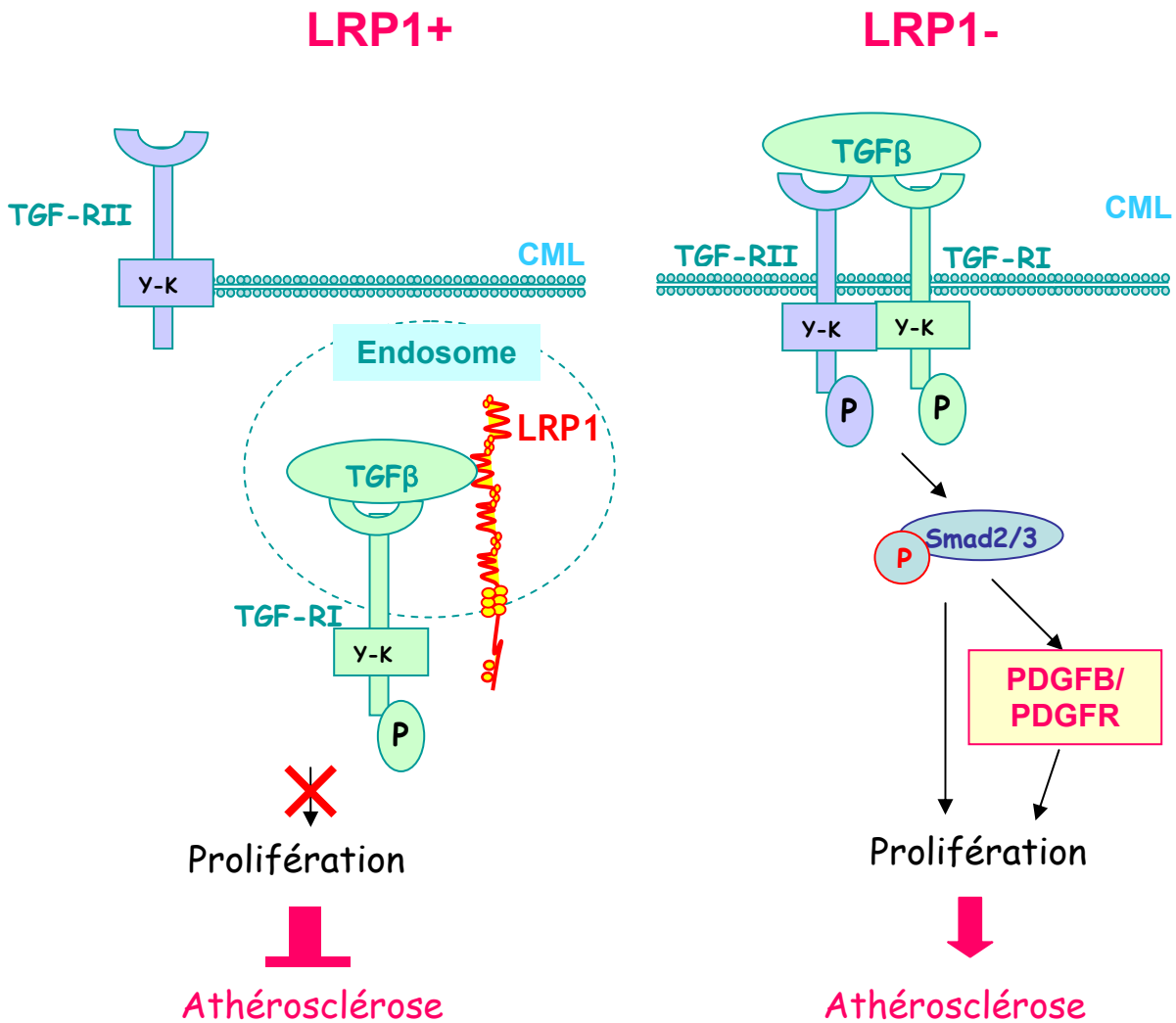


Figure II-4 : LRP1 régule la voie du TGF-β et ainsi protège contre l'athérosclérose. (TGF-RII ; récepteur au TGFβ II, Y-K ; tyrosine phosphorylé, P ; phosphorylation)

Par ailleurs, il a été montré que la voie du TGFβ peut également être régulée par la formation d'un complexe membranaire entre le LRP1 et la décorin, un protéoglycane de la famille des SLRP (Small Leucine-Rich Proteoglycan) impliqué dans la régulation des voies de signalisation tels que la voie de l'IGF-1 [Schonherr et al., 2005], de l'EGF [Moscatello et al., 1998] et du TGFβ [Takeuchi et al., 1994][Yamaguchi et al., 1990]. Cabello-Varrugio et al. ont montré que la présence à la fois de la décorin et de LRP1 est nécessaire pour induire l'activité transcriptionnelle de TGFβ [Cabello-Varrugio et al., 2007].

1.2.4. LRP1 : régulateur de la voie de l'IGFBP-3

Leal et al. ont montré que le récepteur au TGFβ-V, identifié comme étant le LRP1, est capable de lier l'IGFBP-3 et d'inhiber la croissance cellulaire indépendamment de l'IGF-1 [Leal et al., 1997][Leal et al., 1999]. L'équipe de Huang et al ont montré que cette régulation

par l'IGFBP-3 et TGF-RV/LRP1 implique deux autres protéines notamment IRS (insulin receptor substrat) et une phosphatase (PPase) agissant au niveau des sérines et des thréonines [Huang et al., 2004a] [Huang et al., 2004b].

Par ces observations, ils ont alors émis l'hypothèse suivante (Figure II-5). La phosphatase liée au domaine cytoplasmique de TGFβ-RV/LRP1 devient active suite à la liaison de l'IGFBP-3 au niveau du domaine extracellulaire de TGFβ-RV/LRP1. Cette activation va permettre le recrutement de IRS au niveau de la phosphatase. Le complexe, IRS-phosphatase, migre dans le noyau et déphosphoryle la protéine RB et d'autres protéines régulatrices du cycle cellulaire. Par conséquent cette migration résulte en l'arrêt du cycle en phase G1 et l'inhibition de la croissance. De plus, la stimulation par un analogue à l'IGF-1, ne possédant aucune affinité pour IGFBP-3, ou par l'insuline inverse le processus. En effet les facteurs de croissance stimulent la phosphorylation en tyrosine de IRS par interaction avec leur propre récepteur, entraînant l'activation des voies de signalisation, telles que la voie de Ras/MAPK ou celle des Akt/Pi3K et empêche la formation du complexe avec la phosphatase (PPase) au niveau du TGFβ-RV/LRP1 (Figure II-5). De plus il a été montré que IRS est capable de migrer dans le noyau et pourra alors induire la migration du complexe IRS-PPase dans le noyau [Sun et al., 2003].

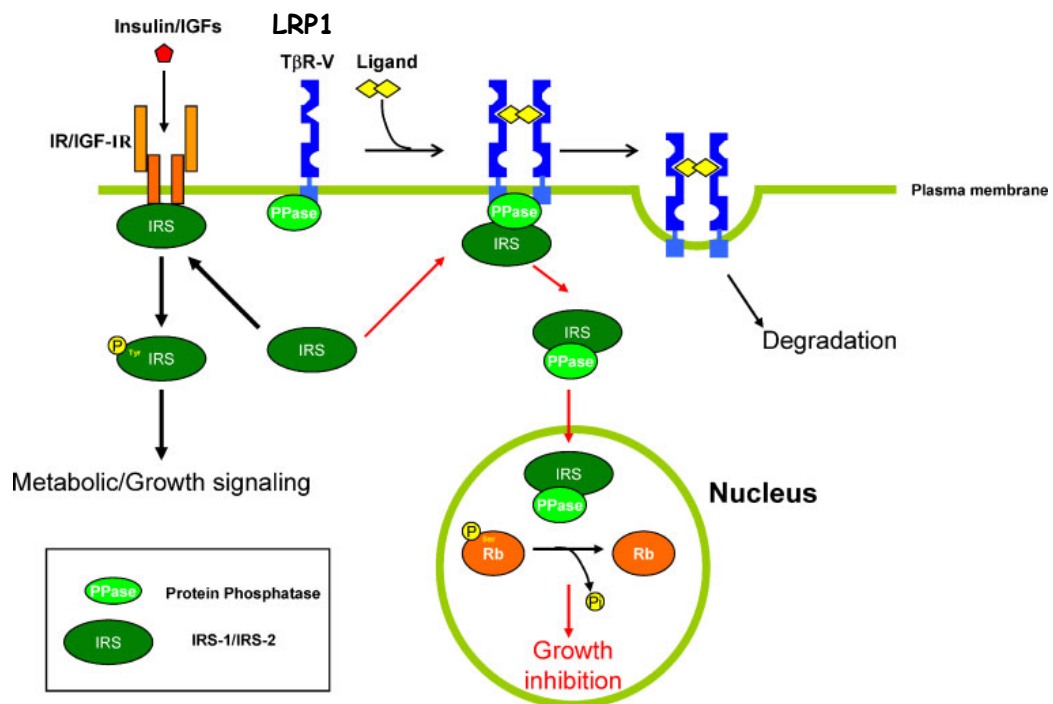


Figure II-5 : Hypothèse du mécanisme utilisé par LRP1 pour réguler la prolifération cellulaire via IGFBP-3 et IRS. (Source : [Huang et al., 2005]).

LRP1 est capable de contrôler, par différents mécanismes d'action, la prolifération cellulaire induite par le PDGFBB, le TGFβ et indépendamment d'un facteur de croissance. Parmi les

protéines impliquées dans la voie de l'IGF-1 qui conduisent à la prolifération cellulaire et qui peuvent interagir directement avec LRP1, ShcA semble être un bon candidat pour réguler la voie de l'IGF-1 par le LRP1.

1.3. Implication de ShcA dans la régulation par LRP1

1.3.1. Src homology and collagen protein : ShcA

La protéine Shc (SH2-containing sequence ou Src homologous and collagen) appartient à une famille qui possède trois membres nommés ShcA, ShcB/Rai et ShcC/Sli. ShcA est à ce jour la mieux caractérisée. Toutes les protéines Shc possèdent la même organisation protéique [Luzi et al.,2000] cependant leur localisation diffère. ShcA est exprimée de manière ubiquitaire alors que ShcB/Rai et ShcC/Sli sont principalement localisées dans les cellules neuronales [Pelicci et aal.,1996][Nakamura et al.,1998].

ShcA a été identifiée en 1992 comme étant une protéine adaptatrice capable de relier l'activation du récepteur à l'EGF à la cascade de Ras et des MAPK (Mitogen-activated protein kinase) [Bonfini et al.,1996][Ravichandran et al.,2001]. ShcA est une protéine qui existe sous trois isoformes. Deux d'entre-elles (52 kDa et 46 kDa) sont composées de trois domaines: un domaine SH2 situé en C-terminal, un domaine central CH1 (collagen homology 1) possédant des sites de phosphorylation en tyrosine (Y239, Y240 et Y317) et un domaine PTB en N-terminal [Pelicci et al., 1992][Ravichandran 2001] (Figure II-6). La troisième isoforme de 66 kDa, issue d'un épissage alternatif, possède en N-terminal un domaine supplémentaire CH2 (collagen homology 2) possédant des sites de phosphorylation en sérines et en thréonines [Migliaccio et al., 1997]. L'isoforme p52ShcA possède également une partie du domaine CH2 et des sites de phosphorylation en sérine et en thréonine (Figure II-6). La sérine S-29 de p52ShcA, équivalent à la S-138 p66ShcA, a été impliquée dans la régulation de la voie de l'insuline par sa liaison à une tyrosine phosphatase (PTP-PEST) [Faisal et al.,2002]. La phosphorylation en sérine S-36 du domaine CH2 de l'isoforme p66ShcA, l'implique dans les processus de stress oxydatif et d'apoptose [Purdom et al.,2003][Li et al.,2007][Migliaccio et al.,1999].

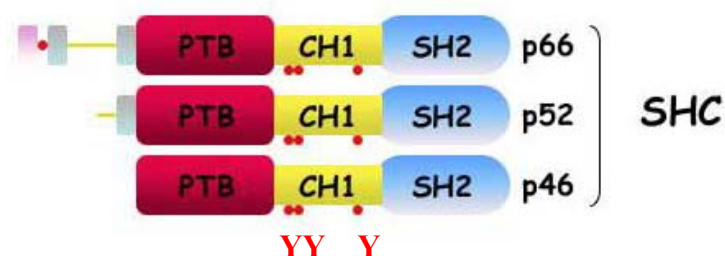


Figure II-6 : Organisation des trois isoformes de ShcA (• ; site de phosphorylation en tyrosine, ■ ; sites de phosphorylation en sérine thréonine)(Source ; Giuliana G., IFOM-IEO Campus, Italie)

Les trois isoformes de Shc sont capables, via leur domaine SH2 et/ou PTB, de se fixer aux résidus phosphorylés en tyrosines de nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase tels que le récepteur à l'EGF, à l'IGF-1 ou au PDGF [Ravichandran, 2001]. Ce recrutement de ShcA à la membrane, est suivi de son activation par phosphorylation au niveau des tyrosines du domaine CH1 [Bonfini et al., 1996]. ShcA phosphorylée en tyrosine servira de point d'ancrage à Grb2-Sos se liant par le domaine SH2 de Grb2 à la tyrosine 317 phosphorylée de ShcA. Actuellement, la cascade Shc : Grb2 : Sos : Ras qui conduit à l'activation de ERK $\frac{1}{2}$ et à la prolifération cellulaire représente la voie de signalisation la mieux connue en aval de ShcA [Bonfini et al., 1996] (Figure II-7). Il a été montré que l'inactivation de ShcA dans les 3T3-L1 bloque l'activation de la prolifération cellulaire induite par l'IGF-1 mais permet l'activation de la différenciation adipocytaire [Boney et al.,2000][Boney et al.,2001].

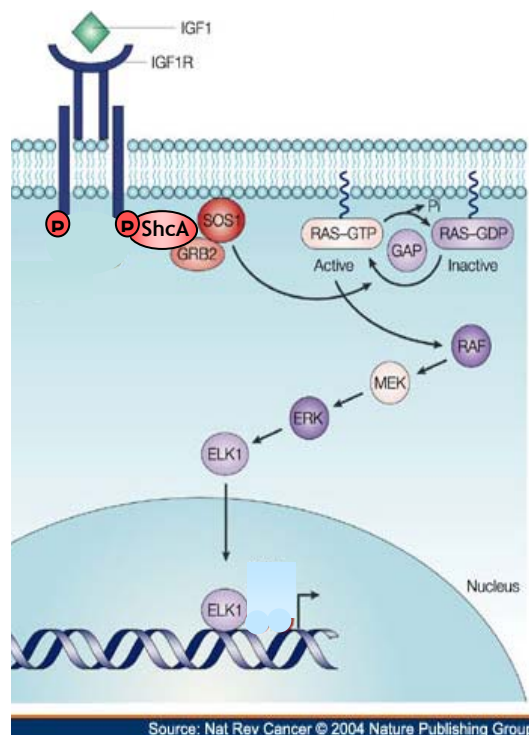


Figure II-7 : Cascade de signalisation de ShcA (Source : [Pollak et al.,2004])

L'étude de T. Pawson montre que ShcA est nécessaire au développement du système cardiovasculaire au cours de l'embryogenèse [Lai et al.,2000].

La délétion des exons 2 et 3 de ShcA par recombinaison homologue (contenant le site d'initiation de la transcription et une partie de la séquence qui code pour le domaine PTB de ShcA) est létale très tôt au cours de l'embryogenèse (avant E11.5) principalement causé par un défaut dans le développement cardiaque et dans l'organisation des vaisseaux. Ce défaut vasculaire est principalement visible dans le sac vitellin et dans la vascularisation cérébrale. L'analyse de la structure de l'aorte dorsale révèle une réduction significative dans les contacts des CE avec les cellules péri-endothéliales et le mésenchyme qui l'entoure. Ainsi les

auteurs ont démontré que ShcA semble être important dans la signalisation entre les CE et les cellules de support requises pour le remodelage angiogénique et pour le développement cardiaque [Lai et al.,2000].

L'analyse des cellules déficientes en ShcA montre que ShcA est capable d'induire la prolifération cellulaire par l'activation des Ras/MAPK après stimulation par les facteurs de croissance (EGF, PDGF). De plus ShcA permet la réorganisation du cytosquelette en fonction de la composition de la matrice extracellulaire [Lai et al.,2000].

1.3.2. *ShcA/LRP1 et la voie de l'IGF-1*

Dans les CML, la phosphorylation de ShcA et son association à Grb2 est nécessaire à la phosphorylation de ERK1/2 MAPK et à l'activation de la prolifération après stimulation par l'IGF-1 [Ling et al.,2005]. La phosphorylation de ShcA, nécessaire pour la croissance cellulaire après stimulation par l'IGF-1, a été confirmée dans les cellules de neuroblastomes humaines [Kim et al.,1998] et dans les cellules de muscle squelettique (L6) [Sasaoka et al.,2001]. De plus la réduction de l'expression du récepteur à l'IGF-1 chez la souris, révèle une réduction de la formation du complexe p52ShcA-Grb2 et de l'activation des MAPK [Holzenberger et al.,2003], ce qui prouve que ShcA est importante pour activer la voie de MAPK par l'IGF-1.

Pour activer la voie des MAPK et la prolifération des CML par l'IGF-1, Ling et al. ont montré que ShcA doit être recrutée avec SHP-2 (Src homology containing protein-tyrosine phosphatase), une tyrosine phosphatase, au niveau de SHPS-1 (SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate 1). Le recrutement de ShcA au niveau SHPS/SHP-2 est nécessaire pour la phosphorylation de ShcA et pour le recrutement de Grb2-Sos [Ling et al.2005]. De plus, ShcA, SHP-2 et SHPS sont toutes enrichies au niveau des cavéoles [Biedi et al.,2003][Maggi et al.,2002][Podar et al.,2002][Huo et al.,2003][Li et al.,1996]. D'autre part ShcA peut également se lier par son domaine PTB au niveau du récepteur à l'IGF après stimulation par l'IGF-1 [Craparo et al.,1995].

Par ailleurs, pour induire la phosphorylation de ShcA au niveau de la tyrosine 317, Barnes et al. ont montré que le domaine PTB de ShcA est nécessaire et que v-Src doit être active [Barnes et al.,2001]. Or, plus récemment il a été montré que le récepteur à SHP-2/SHP-1 activé par l'IGF-1 est capable de recruter les protéines kinases de la famille de Src [Lieskovska et al.,2006]. Ainsi, lors de l'activation du récepteur à l'IGF-1, le complexe SHP-2/SHP-1 recrute ShcA et Src et permet alors la phosphorylation de ShcA et l'activation de la voie des MAPK.

D'autre part, ShcA peut également se lier par son domaine PTB au domaine cytoplasmique de LRP1 lorsque ce dernier est phosphorylé en tyrosine. Le domaine cytoplasmique de LRP1 possède deux régions NPXY dont la seconde peut être phosphorylé par la protéine kinase v-Src [Barnes et al.,2001] ou par des facteurs de croissance tel que le PDGFBB [Barnes et al.,2003][Loukinova et al.,2002]. Ainsi le domaine cytoplasmique de LRP1 constitue un site

d'ancrage pour ShcA [Barnes et al.,2001], qui pourra alors être phosphorylé par v-src. De plus LRP1, au même titre que ShcA et que le récepteur à l'IGF-1, est principalement localisée dans les cavéoles. Néanmoins il existe peu d'études mettant en évidence le rôle de LRP1 sur la voie de l'IGF-1. Gallichio et al. montrent que LRP1 participe à la migration cellulaire induite par l'IGF-1 mais très probablement sans impliquer le récepteur à l'IGF-1 [Gallichio et al.,2003].

2. Objectif de l'étude

L'absence de LRP1 dans les CML chez la souris se traduit par une hyperprolifération des CML. De plus il a été montré que LRP1 contrôle la voie du PDGF et du TGF β et protège contre l'athérosclérose. Cependant la voie de l'IGF-1 est également impliquée dans le développement de l'athérosclérose.

ShcA est une protéine adaptatrice dont le rôle dans la prolifération induite par l'IGF-1 est bien connu. De surcroît, ShcA interagit avec le domaine cytoplasmique de LRP1 quand celui-ci est phosphorylé. La fonction de cette interaction physique entre ShcA et LRP1 dans la prolifération cellulaire et la formation des lésions athéroscléreuses reste encore inconnue. Nous pensons que le récepteur à l'IGF-1 et LRP1 coopèrent pour réguler la signalisation de l'IGF-1.

Notre hypothèse est que les récepteurs aux facteurs de croissance, en particulier le récepteur à l'IGF-I, LRP-1 et ShcA fonctionnent au sein d'un même complexe multimoléculaire dans lequel ShcA serait un intermédiaire nécessaire au LRP-1 pour contrôler la prolifération.

Objectif :

1. *In vitro*, caractériser le rôle du couple LRP1-ShcA dans la signalisation cellulaire induite par l'IGF-1.
2. *In vivo*, évaluer directement l'importance de ShcA dans le développement des lésions athéroscléreuses.

Partie 2:

*Matériels
&
Méthodes*

3. Matériels et Méthodes

3.1. Matériels

3.1.1. Types cellulaires

Les lignées cellulaires étudiées sont les lignées de fibroblastes embryonnaires de souris MEF sauvages ou déficientes en LRP1. Elles nous ont été gracieusement fournies par le Pr. J. Herz (UT Southwestern Medical Center, Dallas, Texas). Le milieu de culture utilisé est du DMEM (Gibco) complété par 10% de sérum de veau fœtal (SVF, GibcoBRL), 1% d'ultra-glutamine (Gibco) et par une solution de pénicilline/streptomycine (100U/ml et 100µg/ml, Gibco). Elles sont cultivées en atmosphère humide (95 %) avec 5 % de CO₂ dans une étuve thermostatée à 37°C.

Pour toutes les études réalisées, les cellules sontensemencées à une densité de 10⁵ cellules/ml de milieu dans des boites de pétrie de 100 cm de diamètre. Les numérations des cellules viables sont réalisées sur cellule de Malassez par le test d'exclusion au bleu trypan (Sigma) (les cellules blanches étant viables). A 80% de confluence le milieu de culture des cellules est changé par un milieu de culture sans sérum ((DMEM (gibco), 1/100 (v/v) pénicilline/streptomycine, 1/100 (v/v) ultra-L-glutamine) 0.3% BSA pendant 18h. Enfin elles sont stimulées par l'IGF-1 ou l'insuline à 20nM et à 100 ng/ml respectivement et récupérées pour être analysées.

3.1.2. Anticorps

Anticorps anti-ShcA monoclonale, anti-ShcA polyclonal (immunoprécipitation : 4µg/échantillon)(Upstate; 06-203), anti-SHP2 polyclonal (WB: dil. 1/500 dans le 5% de lait écrémé)(Santa-cruz biotechnology; sc-280), anti-Phospho-Akt (ser473) (WB: dil. 1/1000 dans le 3% BSA)(Cell Signaling technology; S-9271), anti-Akt (WB: dil. 1/1000 dans le 5% de lait écrémé)(Cell Signaling technology; S-9272), anti-Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204)(WB: dil. 1/1000 dans le 3% BSA)(Cell Signaling technology; S-9101), anti-p44/42 MAP Kinase (WB: dil. 1/1000 dans le 5% de lait écrémé)(Cell Signaling technology ; S-9102), anti-Phosphotyrosine clone 4G10 (WB: dil. 1/1000 dans le 3% BSA)(Upstate; 05-321), anti-IGF-IR (C-20) (WB: dil. 1/1000 dans le 5% de lait écrémé, IP ; 2µg)(Santa Cruz biotechnology; sc-713), anti-Phospho-mTOR (Ser2448)(WB: dil. 1/100 dans le 3% BSA)(Cell Signaling technology; S-2971), anti-mTOR (WB: dil. 1/100 dans le 5% de lait écrémé)(Cell Signaling technology; S-2972), anti-Grb2 (WB: dil. 1/1000 dans le 5% de lait écrémé), anti-GAPDH (WB: dil. 1/10000 dans le 5% de lait écrémé), anti-Ras (WB: dil. 1/10000 dans le 5% de lait écrémé)(Cell Biolabs).

3.1.3. Facteur de croissance

L'IGF-1 recombinant (PeproTech) est dissous après centrifugation dans de l'eau stérile à 0.1mg/ml et utilisé à 20nM.

3.2. Génération de souris déficientes en ShcA (KO conditionnel).

3.2.1. Génération de souris ShcA^{flox/flox} (Réalisée au labo par R.Matz)

Les sites loxP sont introduits par recombinaison homologue du côté 5' en amont de l'exon2 et du côté 3' en aval de l'exon 8. L'excision après action de la CRE recombinase supprimera un fragment d'environ 2kb contenant la séquence qui code pour la moitié NH2 terminale du domaine PTB. Ainsi, toute protéine produite par le locus ciblé sera déficiente en un domaine PTB complet et donc ne possèdera aucune activité de signalisation.

3.2.2. Génération des souris ShcA^{-/-} tissu spécifique

L'inactivation de ShcA dans les CMLV est réalisée en croisant les souris ShcA^{flox/flox} avec des souris transgéniques SM22CRE ou souris Tie2CRE (Don de Dr Yanagisawa M., UT Southwestern Medical Center, Dallas, Texas) pour inactiver ShcA dans les cellules endothéliales.

Nous croisons également ces souris avec des souris LDLr^{-/-} afin d'augmenter leur susceptibilité à développer des lésions athéroscléreuses.

Les souris contrôles ont pour génotype : ShcA^{flox/flox} LDLr^{-/-}

3.2.3. Régime proathérogène

- ◇ Régime riche en cholestérol et en acide cholique: Farine A03 (SAFE), 21% graisse, 1.25% Cholestérol, 0.5% Cholate
- ◇ Début du régime : souris de 3 mois
- ◇ Durée du régime : 3 à 6 mois

3.3. Mise en culture de MEF ShcA^{flox/flox}

Les embryons sont prélevés 13.5 jours après l'apparition du bouchon vaginal chez une souris de génotype ShcA^{flox/flox}. Après dislocation cérébrale, l'abdomen est incisé et l'utérus contenant les embryons est prélevé dans du PBS x1. Sous une hotte stérile à flux laminaire l'utérus est transvasé dans du PBS x1 stérile et rincé plusieurs fois. A l'aide de pinces stériles les embryons sont récupérés et détachés de leur sac amniotique. La tête et le foie de chaque embryon sont ôtés, la tête est récupérée afin de valider le génotype de la souris. Les embryons sont lavés plusieurs fois dans du PBS stérile x1 afin d'éliminer tous le sang résiduel.

Les embryons décapités sont placés séparément dans une boîte de pétrie de 60 cm de diamètre contenant 5 ml de trypsine-EDTA x1 où il sont hachés avec deux scalpels stériles et placés dans l'incubateur à cellules pendant 15 minutes. La suspension est alors homogénéisée à l'aide d'une pipette 10ml puis une seringue de 18G et placée dans l'incubateur à cellules pendant 3 minutes. On récupère la suspension cellulaire dans un flacon contenant 5 ml de milieu de culture (DMEM (gibco), 10% FBS, 1/100 (v/v) pénicilline/streptomycine, 1/100 (v/v) ultra-L-glutamine).

La suspension est laissée pendant 2 minutes sous la hotte afin de laisser précipiter les débris au fond du tube, le surnageant est prélevé et centrifugé 5 min à 1000g et à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot est repris dans 2 ml de milieu de culture et déposé dans une boîte de pétrie de 60 cm de diamètre. Les cellules sont mises dans l'incubateur pendant 24h. Au bout de 24h le milieu est changé et les cellules sont placées dans l'incubateur jusqu'à ce qu'elles atteignent une confluence d'environ 80%. Les cellules sont alors congelées ou utilisées. Toutes les cellules sont cultivées en atmosphère humide (95 %) avec 5 % de CO₂ dans une étuve thermostatée à 37°C.

3.4. *Excision de l'expression de ShcA dans les MEFs*

3.4.1. *Inactivation de ShcA dans les MEF ShcA^{flox/flox} par l'adénovirus-CRE*

Les cellules sont mises en culture dans un milieu à 10% FBS jusqu'à obtenir environ 60% de confluence. Elles sont alors infectées par l'adénovirus CRE+ et CRE- (don de Dr Metzger J., IGBMC, Strasbourg) à 15 MOI pendant 5 jours. Au bout du 4^{ème} jour d'infection le milieu est changé et remplacé par un milieu sans sérum contenant le virus et 0.3% de BSA. Après 18h dans ce milieu, les cellules sont traitées par l'IGF-1 à 20nM puis lysées et analysées.

3.4.2. *Inactivation de ShcA dans les MEF par si RNA*

Les MEFs utilisées sont des MEF sauvages dont le nombre de passage doit être inférieur à 15. Sur une plaque de 6 puits les MEF sontensemencées à 75000 cellules par puits et cultivées dans un milieu sans antibiotique (DMEM, 10% FBS, 1/100 ultra-glutamine). Le lendemain à 50% de confluence les cellules sont transfectées par le siRNA ShcA ou le siRNA contrôle pendant 24h. Le milieu de transfection est alors remplacé par du milieu de culture sans antibiotique frais. Au bout de 24h le milieu est à nouveau remplacé pendant 18 heures par un milieu sans sérum et sans antibiotique contenant de la BSA (DMEM, 1/100 ultra-glutamine, 0.3% BSA). Les cellules sont alors stimulées par 20nM d'IGF-1.

3.5. Méthodes d'analyses

3.5.1. Immunoprécipitation

▪ Préparation du lysat cellulaire

Les cellules traitées ou non par 20nM d'IGF-1 sont rincées par du PBS x1 froid, lysées dans un tampon de lyse (0.1% SDS, 150mM NaCl, 1% Triton x-100, 10mM HEPES, 2mM EDTA, 50mM NaF, 2mM Na₂VO₄, 0.1% sodium deoxycholate, 1.53mM Na₂HPO₄, le pH ajusté à 7.4 avec du tampon phosphate (NaH₂PO₄, PMSF, aprotinin, leupeptin) et homogénéisées avec une seringue de 23G. Après 30 min sur la glace les lysats cellulaires sont centrifugés pendant 40 minutes à 13000 rpm et à 4°C. Les surnageants sont prélevés et dosés par la technique colorimétrique de Bradford (Bio-Rad). La lecture au spectrophotomètre à 595 nm est effectuée contre une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA : 0 à 2 mg/ml).

▪ Préparation des billes d'agarose

Les billes d'agarose couplées à la protéine A (Sigma) sont lavées 3 fois avec du tampon de lyse et incubées pendant 2h sur la roue avec 4µg d'anticorps par échantillon dilué au 1/10 dans le tampon de lyse. Pour ôter l'excédant d'anticorps les billes/anticorps sont lavés 3 fois avec du tampon de lyse. Elles sont alors réparties équitablement dans chaque tube échantillon et centrifugées. Le surnageant est ôté et substitué par le lysat cellulaire.

▪ Immunoprécipitation et analyse

L'interaction billes/anticorps et protéine d'intérêt se fait à 4°C en rotation toute la nuit. Le lendemain matin les échantillons sont centrifugés et le surnageant récupéré. Afin d'enlever les peptides et protéines non spécifiques les billes/anticorps/protéines sont lavés 2x successivement par des tampons TETN (25mM Tris-HCl pH 7.5, 5mM EDTA, 1% triton x-100, 1mM NaF, 200µM Na₃VO₄) contenant des concentrations de sel décroissant (500mM NaCl puis 250 mM NaCl) puis 2x avec du Tris-EDTA. Après ajout de 15µl par échantillon de tampon Laemmli/1/20 β-mercaptoéthanol et dénaturation 10 min à 96°C les interactions protéine A/IgG sont détruites. Les protéines immunoprécipitées sont alors analysées par western-blot.

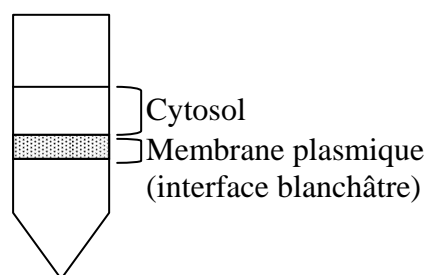
3.5.2. Fractionnement cellulaire par ultracentrifugation

Le fractionnement subcellulaire a été réalisé sur les cellules traitées avec la l'IGF-1 pendant 1 min, 10 min, 30 min et 4 heures. Les cellules sont récupérées, centrifugées et lavées en tampon PBS 1X froid. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du tampon d'extraction A (10mM HEPES pH7.4, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 250mM Sucrose, 50mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 25mM βglycerophosphate) contenant des inhibiteurs de protéases (10µg/ml leupeptin, 0.5mM PMSF, 2.8µg/ml Aprotinin, 1mM DTT) et lysées par

homogénéisation à la seringue 22G. Le lysat cellulaire est alors centrifugé 5 min à 890 g et à 4°C. Le surnageant est alors récupéré et ultracentrifugé 45 min à 100000g et à 4°C. Le surnageant constitue la fraction cytosolique et le culot la fraction membranaire. Le culot est resuspendu dans du tampon SDS (150mM Tris-HCl pH 6.8, 100mM NaCl, 1% SDS, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 50mM NaF, 2mM Na₃VO₄, 25mM glycérophosphate) contenant des inhibiteurs de protéases précédemment cités. Les concentrations protéiques de chaque fraction sont déterminées par la technique colorimétrique de Bradford contre une gamme étalon de BSA et analysées par Western-Blot.

3.5.3. Purification de la membrane plasmique sur gradient de Percoll

Le fractionnement subcellulaire a été réalisé sur les cellules traitées avec 20nM d'IGF-1 pendant 10 min, 30 min et 4 heures. Les cellules sont récupérées, centrifugées et lavées en tampon PBS 1X froid. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du tampon d'extraction A (20mM Tris pH7.9, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 250mM Sucrose) contenant des inhibiteurs de protéases (10µg/ml leupeptin, 0.5mM PMSF, 2.8µg/ml Aprotinin, 1mM DTT) et lysées par homogénéisation à la seringue de 22G. Le lysat cellulaire est alors incubé 20 min sur la glace et centrifugé 10 min à 1000 g et à 4°C. Le surnageant est alors récupéré et le culot resuspendu dans 300µl de tampon d'extraction A. Il est alors ré-incubé sur la glace 20 min, homogénéisé et centrifugé 10 min à 1000 g et à 4°C. Les surnageants sont rassemblés (~500µl) et déposés dans 7ml de Percoll 30% (Sigma) dilué dans le tampon A. Le mélange est ultracentrifugé pendant 30 min à 29000 rpm et à 4°C. Les différentes phases du gradient sont récupérées à la seringue de 1ml. Les concentrations protéiques de chaque fraction sont déterminées par la technique colorimétrique de Bradford contre une gamme étalon de BSA.



Gradient de Percoll 30%

3.5.4. Pull-down Assay (Kit Cell Biolabs): Activation de Ras

▪ Préparation du lysat cellulaire

Les cellules (MEF LRP+/+ et MEF LRP-/-) traitées ou non par 20nM d'IGF-1 pendant 10 et 30 min sont rincées par du PBS x1 froid et lysées dans un tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases (10µg/ml leupeptin, 0.5mM PMSF, 2.8µg/ml Aprotinin). Après 15 min

sur la glace les cellules sont décrochées mécaniquement et les lysats cellulaires sont centrifugés pendant 10 minutes à 14000 rpm et à 4°C.

- *Préparation des contrôles GDP/GTP*

Le surnageant contrôle de chaque lignée cellulaire est subdivisé en deux et complété à 1ml avec du tampon de lyse. Dans chaque tube est ajouté 10mM EDTA et 1x de GDP ou de GTP. Après 30 min à 30°C sous agitation, on ajoute 65mM MgCl₂ par échantillon. Le mélange est alors conservé sur la glace jusqu'au pull down assay.

- *Pull Down Assay*

Le volume de chaque surnageant est ajusté à 1ml avec du tampon de lyse. Les billes Raf1 RBD d'agarose sont ajoutées à chaque lysat cellulaire, incubées 1h à 4°C sous agitation douce et centrifugées 10 sec à 14000rpm. Les surnageants sont récupérés et les billes lavées 3 fois avec du tampon de lyse contenant les inhibiteurs de protéases. Après ajout de 40µl par échantillon de tampon Laemmli/1/20 β-mercaptoéthanol et dénaturation 5 min à 96°C les billes sont centrifugées 10 min à 14000 rpm. Les surnageants sont alors analysés par western-blot sur un gel d'acrylamide de 12%.

3.5.5. Analyse du cycle cellulaire

Les cellules ont été cultivées jusqu'à une confluence de 50-60%, dans des boites de 10-cm². Après traitement à l'IGF, les cellules ont été détachées à l'aide de trypsine 0.05% mM EDTA, lavées dans du PBS x1 et colorées avec du 0.02% propidium iodide (Sigma) pendant 5-10 min. Le contenu en ADN des cellules a été analysé à l'aide d'un FACSort (Becton Dickinson and Co. Immunocytometry Systems, San Jose, CA) équipé d'un laser ion-argon (488 nm). Le signal a été traité à l'aide du logiciel T software (Verity Software House, Inc., Topsham, ME).

Partie 2 :

Résultats

4. Résultats

4.1. Caractérisation *in vitro* du rôle de LRP1 dans la signalisation cellulaire induite par l'IGF-1

4.1.1. LRP1 co-immunoprécipite avec le récepteur à l'IGF-1

Afin d'analyser le rôle potentiel de LRP1 dans le contrôle de la voie de signalisation de l'IGF-1, nous testons si LRP1 et le récepteur à l'IGF-1 interagissent. La figure 1A montre que, dans les CML vasculaires humaines, le LRP1 et le récepteur à l'IGF-1 sont présents dans un même complexe à la surface de la membrane plasmique et que le traitement à l'IGF-1 augmente la formation de ce complexe (Figure II-1A). Nous avons montré que la cavéoline-1, une protéine marqueur des cavéole, n'est pas présente dans notre complexe, indiquant que l'interaction entre le récepteur à l'IGF-1 et le LRP1 est donc spécifique et non pas due à l'immunoprécipitation d'une fraction entière des cavéoles (Figure II-1A). Ce résultat a été confirmé dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) après l'immunoprécipitation du récepteur de l'IGF-1 et l'analyse par western blot avec un anticorps dirigé contre le domaine cytoplasmique de LRP1 (Figure II-1B).

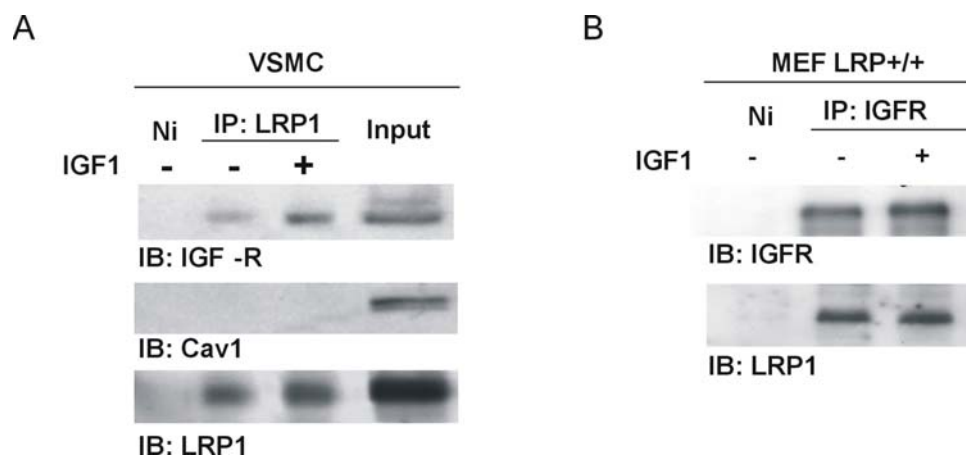


Figure II-1 : LRP1 co-immunoprécipite avec le récepteur à l'IGF-1. (A) Immunoprécipitation de LRP1 à partir de membrane plasmique purifiée des CML vasculaires stimulées par l'IGF-1 pendant 10 min à 20nM. Analyse par western blot avec des anticorps dirigés contre le récepteur de l'IGF-1 (R- IGF), la cavéoline-1 (Cav1) et le LRP1. (Input : lysat membranaire avant immunoprécipitation) **(B)** Immunoprécipitation du récepteur de l'IGF-1 à partir de membrane plasmique purifiée des MEF stimulées par l'IGF-1 pendant 10 min à 20nM. Analyse par western blot avec des anticorps dirigés contre LRP1 et le récepteur à l'IGF-1 (IGFR). (Ni : Non immun)(Blots représentatifs de n=4 expériences).

4.1.2. Activation du récepteur à l'IGF-1 sous l'influence de LRP1

LRP1 pourrait réguler la voie de signalisation de l'IGF-1 en activant l'internalisation du récepteur à l'IGF-1 et sa dégradation (Figure II-1).

Nous avons évalué si le LRP1 est capable de moduler l'expression du récepteur de l'IGF-1. A l'état basal non stimulé ainsi qu'après stimulation par l'IGF-1, nous n'observons pas de modification de l'expression du récepteur à l'IGF-1 en l'absence de LRP1, sur le lysat cellulaire total des MEF (Figure II-2).

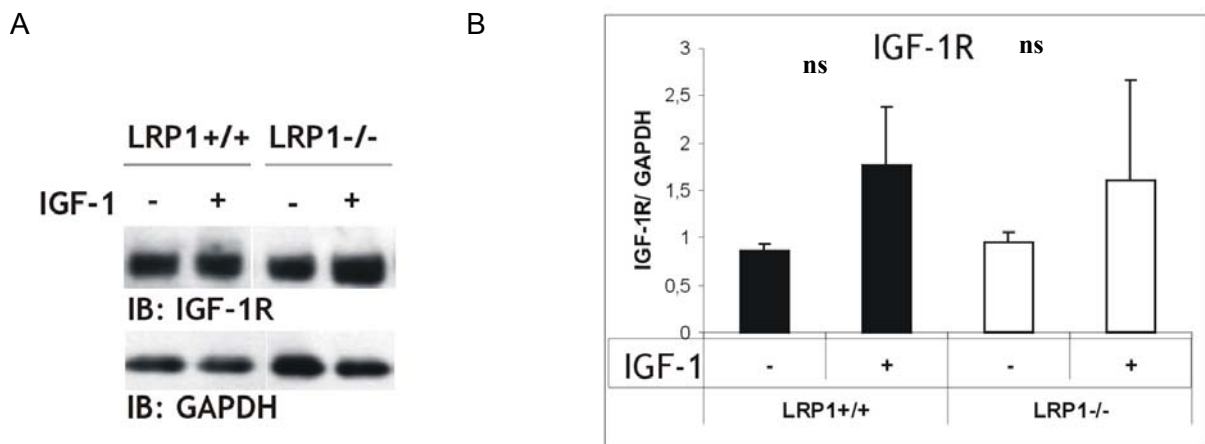


Figure II-2 : LRP1 n'altère pas l'expression du récepteur à l'IGF-1. (A) Analyse par western blot du lysat total des MEF LRP +/+ et -/- avant et après 10 minutes de traitement par l'IGF-1. **(B)** quantification de l'expression de l'IGF-1R par analyse de la densité des bandes de western blot (ns : non significatif)(Blots représentatifs de n=4 expériences).

La liaison de l'IGF-1 a son récepteur entraîne l'autophosphorylation du domaine cytoplasmique du récepteur à l'IGF-1 suivie du recrutement et de la phosphorylation en tyrosine de ses substrats incluant ShcA qui pourra alors lier Grb2 [Sasaoka et al., 1996][Sasaoka et al.,1994].

Nous avons ensuite évalué si LRP1 influence l'état d'activation par phosphorylation du récepteur à l'IGF-1. L'immunoprécipitation du récepteur à l'IGF-1 après 10 minutes de stimulation par l'IGF-1 ne révèle pas de modification de la phosphorylation en tyrosine du récepteur à l'IGF-1 en l'absence de LRP1 (Figure II-3). Ceci suggère que LRP1 contrôle la voie de l'IGF-1 en aval de son activation.

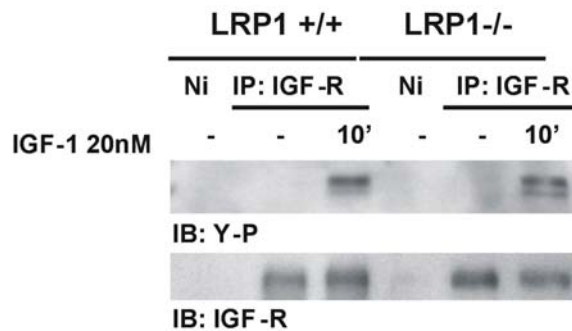


Figure II-3 : LRP1 n'altère pas la phosphorylation en tyrosine du récepteur à l'IGF-1. (A) Immunoprécipitation de l'IGF-1R de la fraction membranaire des MEF LRP1 +/+ et LRP1 -/- avant et après traitement pendant 10 minutes par 20 nM d'IGF-1 et analyse par western blot de la phosphorylation en tyrosine (Y-P) du récepteur (Blots représentatifs de n=3 expériences).

4.1.3. Le recrutement de ShcA à la membrane plasmique en réponse à l'IGF-1 est possible qu'en présence de LRP1

Nous avons testé si le recrutement de la protéine adaptatrice ShcA à la membrane plasmique après stimulation de l'IGF-1 est altéré en absence de LRP1. L'analyse par western blot de la membrane purifiée des MEF contrôles (LRP1 +/+) montre que l'expression des isoformes de ShcA est indétectable dans les cellules non stimulées et augmente après stimulation par l'IGF-1 avec un effet maximal au bout de 30 minutes de traitement (Figure II-4A). Cette augmentation de ShcA à la membrane plasmique est corrélée avec une diminution de l'expression de ShcA dans le cytoplasme (Figure II-4A). En revanche, en l'absence de LRP1 (LRP1 -/-) la migration de ShcA à la membrane plasmique est altérée en réponse au traitement à l'IGF-1 (Figure II-4A). Les trois isoformes de ShcA sont fortement exprimées à la membrane plasmique aussi bien dans les cellules non traitées que dans les cellules traitées à l'IGF-1 (Figure II-4A). L'augmentation de l'expression de ShcA dans la fraction membranaire totale des MEF LRP1 +/+ est également observée après stimulation par l'insuline et altérée en l'absence de LRP1 (Figure II-4B).

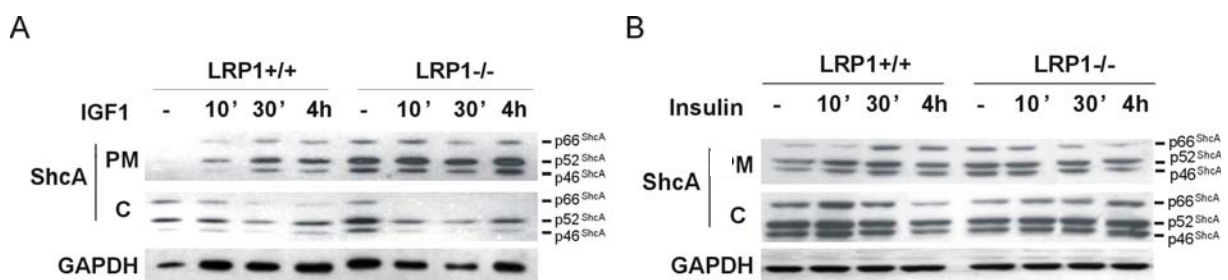


Figure II-4 : LRP1 contrôle le recrutement de ShcA à la membrane. (A) Fractionnement cellulaire par gradient de Percoll et analyse par western blot de l'expression de ShcA à la membrane plasmique (PM) et dans le cytosol (C) des MEF LRP1 +/+ et LRP1 -/- après une cinétique de stimulation à 20 nM d'IGF-1 (B) Fractionnement cellulaire par ultracentrifugation et analyse par western blot de l'expression de

ShcA dans la fraction membranaire totale (M) et dans le cytosol (C) des MEF LRP1 +/+ et LRP1-/- après une cinétique de stimulation à 100nM d'insuline (Blots représentatifs de n=2 (A) et 3 (B) expériences).

4.1.4. Phosphorylation de ShcA en présence de LRP1

La stimulation par l'IGF-1 va induire en présence de LRP1 le recrutement de ShcA à la membrane. Afin de déterminer comment LRP1 régule la voie de l'IGF-1, nous avons suivi l'étape d'activation de ShcA en présence et en l'absence de LRP1 après stimulation par l'IGF-1.

Nous avons déterminé si la présence de LRP1 est requise pour induire la phosphorylation en tyrosine de ShcA après traitement par l'IGF-1. L'immunoprécipitation de ShcA révèle une phosphorylation en tyrosine de l'isoforme p66ShcA après stimulation par l'IGF-1 uniquement en présence de LRP1 (Figure II-5). Cependant les isoformes de p42ShcA et p52ShcA sont masquées par la présence des immunoglobulines (IgG). On ne peut ainsi pas visualiser leur état de phosphorylation.

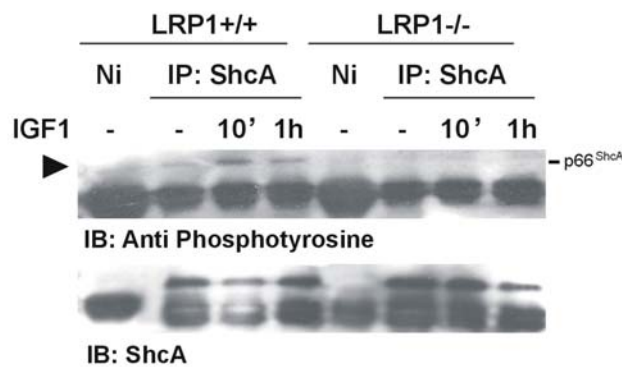


Figure II-5 : LRP1 est nécessaire pour induire la phosphorylation de ShcA par l'IGF-1. Immunoprécipitation de ShcA lysat total des MEF LRP1 +/+ et LRP1 -/- avant et après traitement par 20 nM d'IGF-1 au temps indiqué et analyse de l'état de phosphorylation en tyrosine de ShcA (Ni : non immun) (Blots représentatifs de n=4 expériences).

De plus la phosphorylation de ShcA est réduite dans les cellules déficientes en Src, Fyn et Yes, 3 principaux membres de la famille des protéines kinases Src (SYF -/-) (Figure II-6).

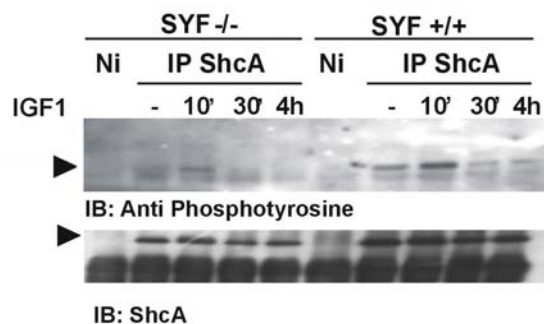


Figure II-6 : Les protéines kinase Src qui sont responsables de la phosphorylation de ShcA. Immunoprécipitation de ShcA du lysat total SYF +/+ et SYF -/- avant et après traitement par 20 nM

d'IGF-1 au temps indiqué et analyse de l'état de phosphorylation en tyrosine de ShcA (Ni : non immun) (Blots représentatifs de n=2 expériences).

Pour déterminer si LRP1 affecte le recrutement de Grb2 au niveau de ShcA après activation des récepteurs de l'IGF-1, nous analysons l'immunoprécipitation de ShcA après traitement à l'IGF-1 dans les MEF en présence et en l'absence de LRP1. L'analyse par western-blot des MEF sauvages (LRP1+/+) traités à l'IGF-1 montre un recrutement de Grb2 au niveau de ShcA avec une réponse maximale au bout de 30 minutes de traitement. La phosphorylation de l'isoforme p66ShcA est accompagnée du recrutement de Grb2 au niveau de ShcA dans les MEF LRP1+/+ (Figure II-7). Néanmoins, ce recrutement de Grb2 au niveau de ShcA est réduit dans les MEF déficientes en LRP1 (LRP1-/-) (Figure II-7).

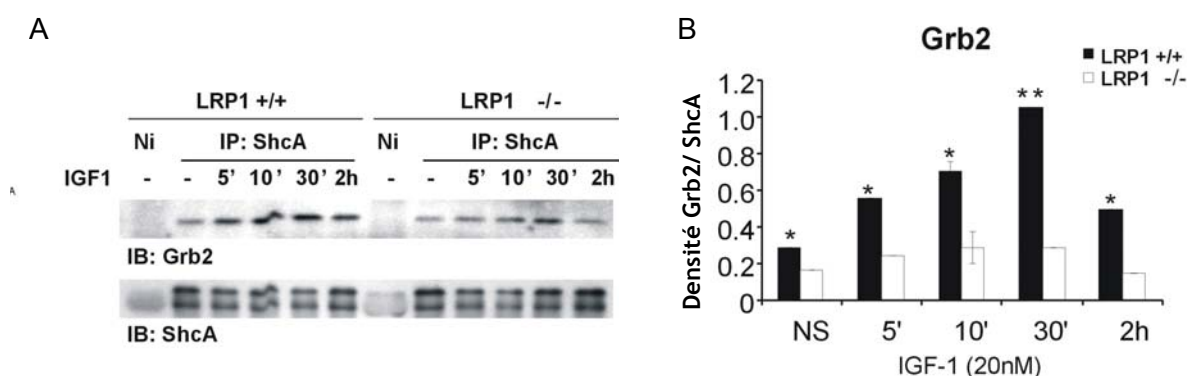


Figure II-7 : LRP1 est nécessaire pour induire par l'IGF-1 le recrutement de Grb2 au niveau ShcA. (A) Immunoprécipitation de ShcA du lysat total SYF +/+ et SYF -/- avant et après traitement par 20 nM d'IGF-1 aux temps indiqués et analyse du recrutement de Grb2 au niveau de ShcA (Ni : non immun). (B) Quantification densitométrique de l'expression de Grb2/ la quantité de ShcA immunoprécipitée (NS : non stimulé) (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, * $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$, LRP1+/+ versus au LRP1-/-)(Blots représentatifs de n=4 expériences).

Ces résultats indiquent que LRP1 est un acteur important de la voie de signalisation de l'IGF-1 et suggèrent que LRP1 sensibilise l'activation de ShcA à la stimulation par l'IGF-1. La présence de LRP1 est requise pour la phosphorylation de p66ShcA et pour la liaison de Grb2 au niveau de ShcA.

4.1.5. LRP1 et l'activation de la voie de Ras et Erk 1/2 après traitement par l'IGF-1

Afin de déterminer les conséquences de l'absence de LRP1 sur la voie de Ras/MAPK, nous étudions par western-blot la quantité de Ras-GTP en présence et en l'absence de LRP1 après traitement par l'IGF-1. Dans les MEF sauvages, le traitement à l'IGF-1 induit une augmentation de Ras-GTP en fonction du temps de stimulation, avec un effet maximal à 30 minutes (Figure II-8). En revanche, l'absence de LRP1 entraîne une activation maximale de

Ras en l'absence de l'IGF-1 puis une diminution de l'activation, après traitement par l'IGF-1 (Figure II-8).

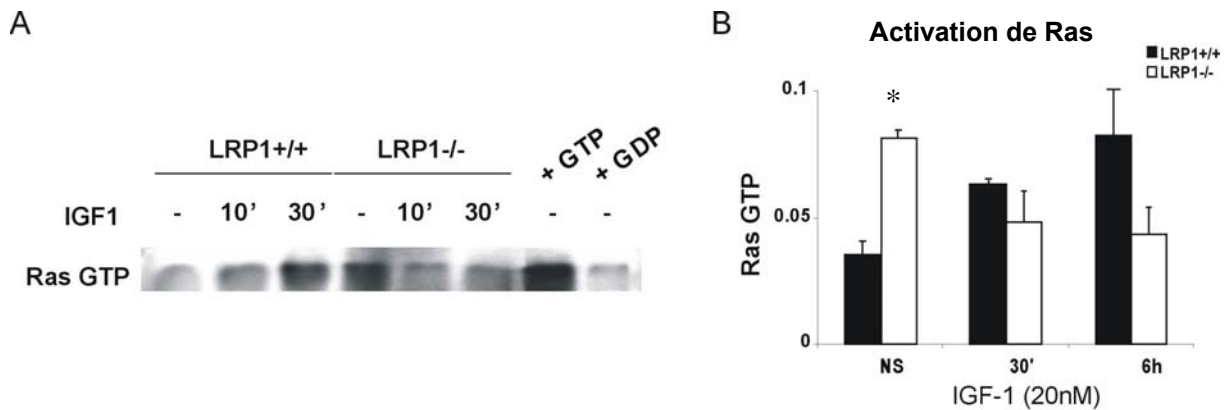
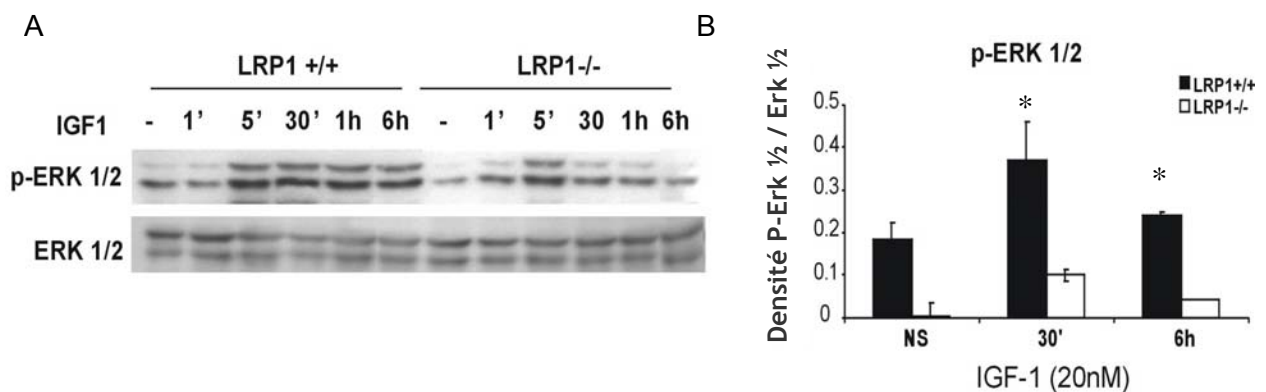


Figure II-8 : LRP1 est requis pour l'activation de Ras par l'IGF-1. (A) Le lysat cellulaire total est incubé avec des billes conjuguées avec RAF1 qui possède un domaine de liaison à Ras. Ras lié au GTP est immunoprécipité et analysé par western blot à l'aide d'un anticorps anti-Ras. (B) quantification (NS : non stimulé) (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, * $p < 0.05$ LRP1^{-/-} versus LRP1^{+/+}) (figure représentative de $n=3$ expériences).

La diminution de Ras-GTP dans les MEF LRP1^{-/-} est accompagnée d'une diminution de la phosphorylation en tyrosine 202 et en thréonine 204 des isoformes p44 et p42 de Erk 1/2 après 5 minutes de stimulation par l'IGF-1 (Figure II-9). En revanche le traitement par l'IGF-1 en présence de LRP1 déclenche une phosphorylation importante de Erk 1/2 avec un pic de stimulation à 30 minutes (Figure II-9). Ces résultats ont été confirmés dans les cellules LRP1^{-/-} re-transfectées par le LRP1 (-/-, LRP1) ou par le vecteur vide (-/-, Mock). Dans ces cellules re-transfectées par le LRP1, on retrouve une activation de Erk1/2 après dix minutes de stimulation à l'IGF-1 équivalente à celle des cellules LRP1^{+/+}. Cependant, en accord avec les observations précédentes, la phosphorylation de Erk1/2 est réduite dans les cellules re-transfectées par le vecteur vide (-/-, Mock) (Figure II-9C).



C

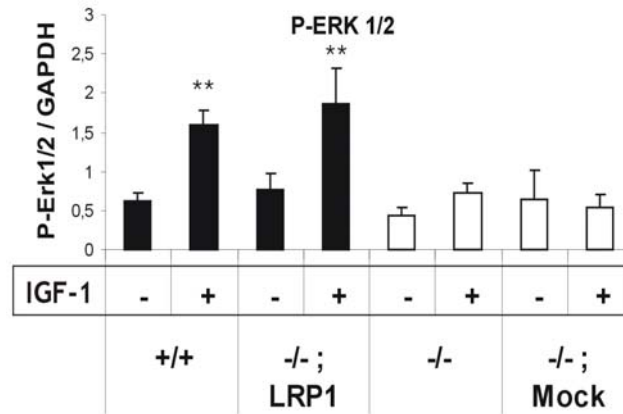


Figure II-9 : LRP1 est requis pour l'activation Erk 1/2 après traitement par l'IGF-1. (A) Analyse par western blot de phospho-Erk1/2 et de Erk 1/2 totale après une cinétique de stimulation à 20nM d'IGF-1. (B) quantification de la phosphorylation de Erk1/2 (NS : non stimulé) (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, * p <0.05 LRP+/+ versus LRP1-/-) (C) quantification de la phosphorylation de Erk 1/2 avant et après 10 minutes de stimulation par 20 nM d'IGF-1 dans les MEF LRP1+/+, LRP1-/- retransfectées par le LRP1 (-/-, LRP1), LRP1-/- et LRP1 -/- retransfectées avec le vecteur vide (-/-, Mock) (NS : non stimulé) (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, * p <0.05 et ** p <0.01 LRP1+/+ versus LRP1-/-) (Blots représentatifs de $n=5$ (A et B) 3 (C) expériences).

4.1.6. LRP1 est nécessaire à la progression dans le cycle cellulaire

ShcA et Ras-MAPK sont les principaux médiateurs de l'action mitogène de l'IGF-1 dans les fibroblastes [Biedi et al.,2003][Boney et al.,2000]. Afin d'évaluer si les altérations de la signalisation de ShcA et de la cascade d'activation de Ras, observées dans les cellules déficientes en LRP1, affectent la progression dans le cycle cellulaire induit par l'IGF-1, nous analysons par cytométrie en flux les différentes phases du cycle des MEF LRP1+/+ et MEF LRP1 -/- après arrêt de croissance (privation de sérum pendant 18h) et stimulation par l'IGF-1. Nos résultats ne montrent pas de différence dans la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire entre les MEF LRP1+/+ et LRP1-/- après privation de sérum, (G0/G1 : $72\pm 2.1\%$ versus $76\pm 2.1\%$; S : $22\pm 3.0\%$ versus $19\pm 2.3\%$; G2M : $5\pm 0.9\%$ versus $5\pm 0.7\%$, dans les MEF LRP+/+ versus LRP1-/- respectivement, $p>0.28$) (Figures II-10 A et B). Cependant, le traitement par l'IGF-1 augmente significativement le pourcentage de cellules en phase S et diminue le pourcentage en phase G0/G1 dans les MEF LRP1+/+ (G0/G1 : $72\pm 2.1\%$ versus $53\pm 4.7\%$; S $22\pm 3.0\%$ versus $44\pm 6.5\%$, sans traitement versus avec traitement à l'IGF-1 respectivement, $p<0.05$) (Figures II-10 A et B), la progression de la phase G0/G1 vers la phase S est bloquée en l'absence de LRP1 après stimulation par l'IGF-1 (G0/G1 : $76\pm 2.1\%$ versus $70\pm 1.1\%$; S : $19\pm 2.3\%$ versus $22\pm 2.6\%$, sans traitement versus avec traitement à l'IGF-1 respectivement, $p>0.18$) (Figures II-10 A et B). Ces résultats démontrent que l'absence de LRP1 inhibe la progression dans le cycle cellulaire après traitement par l'IGF-1.

De plus, les cellules sauvages (MEF LRP1+/+) dans un milieu DMEM contenant 10 % de sérum de veau fœtal prolifèrent plus vite que les MEF déficientes en LRP1 (Figure II-10C).

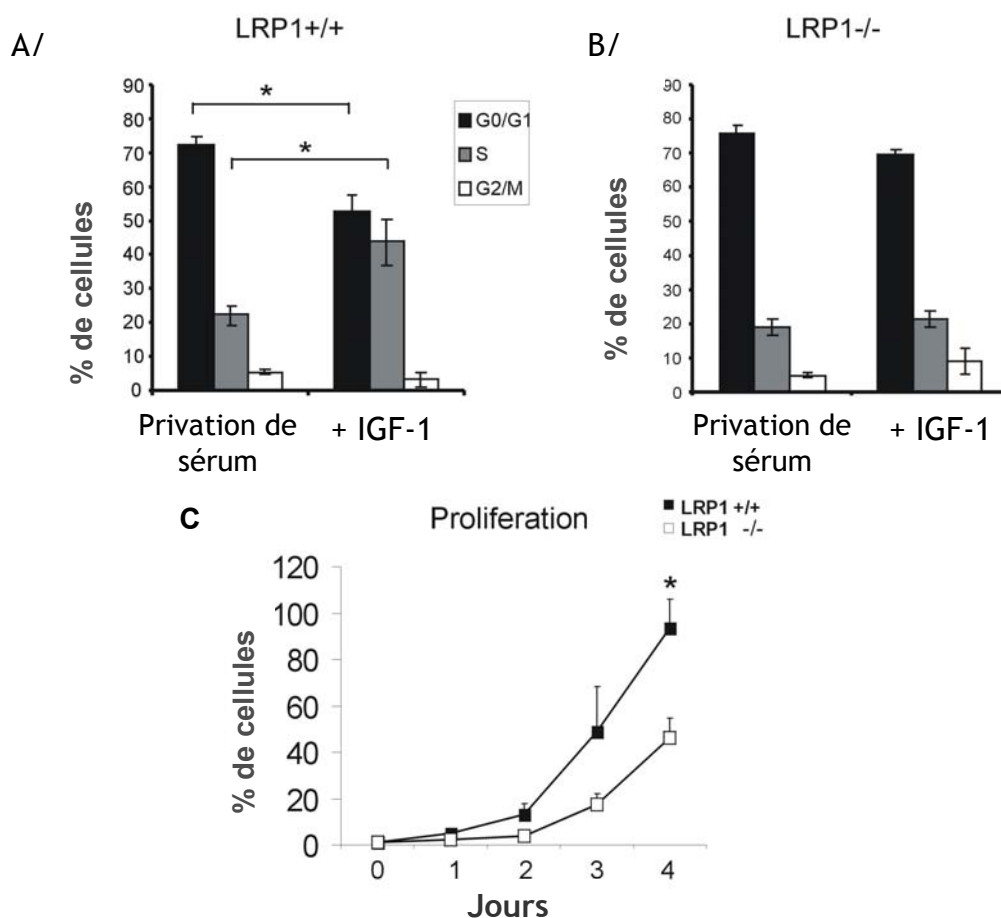
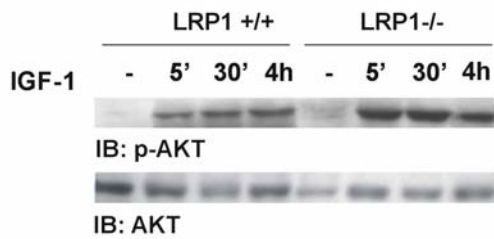


Figure II-10 : LRP1 est nécessaire à la progression dans le cycle cellulaire induite par l'IGF-1. Analyse par cytométrie en flux de (A) MEF LRP1+/+ et (B) MEF LRP1-/- traités ou non par 20nM d'IGF-1. Les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules en phase G0/G1, S et G2M (*p<0.05 +IGF-1 versus privation en sérum). (C) Test de prolifération cellulaire des MEF LRP1+/+ et LRP1-/- non traités (*p<0.05 LRP1+/+ versus LRP1 -/-)(graphes représentatif de n=4 expériences).

4.1.7. Contrôle de la voie de Akt-mTor par le complexe LRP1/ShcA

Le récepteur à l'IGF-1 active de multiples voies de signalisation incluant la voie des Pi3K/Akt [Kulik et al.,1997][Levine et al.,2006]. Afin de déterminer si le complexe LRP1/ShcA pourrait moduler la voie de Pi3K/Akt induite par l'IGF-1, nous examinons l'activation de Akt et de mTor en l'absence et en présence de LRP1 et de ShcA après stimulation par l'IGF-1. Nos résultats montrent qu'après une cinétique de stimulation par l'IGF-1, la quantité de Akt phosphorylé en sérine 473 est significativement augmentée dans les MEF LRP1 -/- par rapport celle dans les MEF LRP1 +/+ (Figure II-11A). Ces observations ont été confirmées dans les cellules déficientes en LRP1 soit re-transfectées par le LRP1 (-/-, LRP1) soit re-transfectées par le vecteur vide (-/-, Mock) après 10 minutes de stimulation par l'IGF-1 (Figure II-11B).

A



B

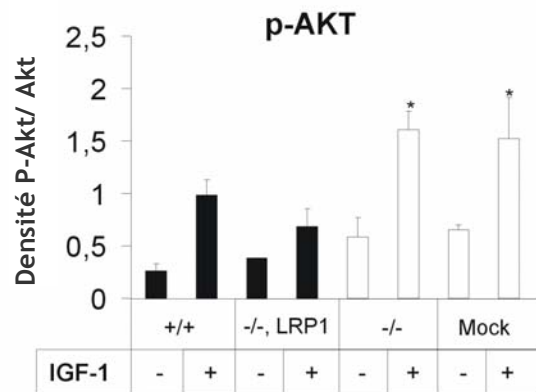


Figure II-11 : LRP1 réduit l'activation de la voie de Akt/mTor induite par l'IGF-1. Analyse par western blot de la phosphorylation de Akt dans le lysat total des MEF LRP1 +/+ et LRP1 -/- après une cinétique de stimulation par 20 nM d'IGF-1 (B) Quantification de P-Akt sur la quantité totale d'Akt dans les MEF LRP1 +/+, LRP1 -/- re-transfectées par LRP1 (-/-,LRP1), LRP1 -/- et LRP1 -/- re-transfectées par le vecteur vide (-/-, Mock) après 10 minutes de stimulation par (20nM) l'IGF-1 (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, * $p < 0.05$ LRP1 -/- versus LRP1 +/+)(Figures représentatives de $n=4$ expériences).

De façon similaire, l'inactivation partielle de ShcA par la technique d'ARN interférence (si RNA) (Figure II-12A) ou par la délétion complète de ShcA dans les MEF en utilisant le système cre/lox (Figure II-12B), conduit à une induction de la phosphorylation de Akt après traitement à l'IGF-1. Cette activation de Akt est plus marquée en l'absence de ShcA que dans les cellules contrôles. Ceci suggère que LRP1 et ShcA régulent la phosphorylation de Akt.

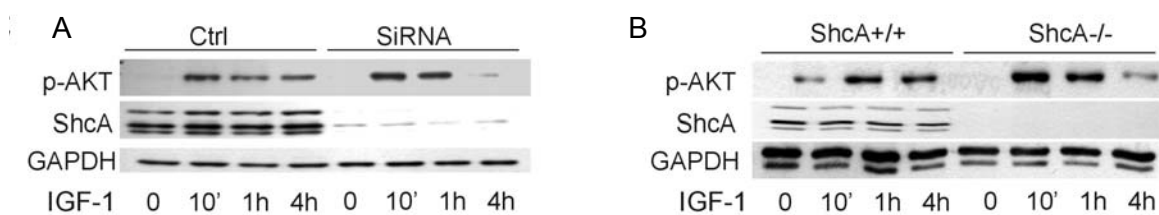


Figure II-12 : ShcA réduit l'activation de la voie de Akt/mTor induite par l'IGF-1. Analyse par western blot de la phosphorylation de Akt après une cinétique de stimulation par 20 nM d'IGF-1 dans les (A) MEF ShcA où l'expression de ShcA est réduite par siRNA et (B) dans les MEF ShcA ^{flox/flox} où l'expression de ShcA est réprimé par un adénovirus codant pour la CRE recombinase (Blots représentatifs de $n=3$ expériences).

Afin d'examiner les conséquences de l'activation de Akt en l'absence de LRP1 sur l'apoptose, nous quantifions les cellules en phase sub-G0/G1 par cytométrie en flux en présence et en l'absence de LRP1 après privation de sérum et stimulation par l'IGF-1. L'apoptose induite par la privation en sérum est significativement diminuée (57%) en l'absence de LRP1 comparé aux

cellules sauvages ($26 \pm 3.1\%$ versus $15 \pm 1.8\%$, les sauvages versus LRP1^{-/-}, $p=0.0166$) (Figure II-13). Le traitement par l'IGF-1 diminue significativement le pourcentage de MEF LRP1^{+/+} en phase sub-G0/G1 ($26 \pm 3.1\%$ versus $15 \pm 1.6\%$, sans IGF-1 versus avec IGF-1, $p=0.0030$). Dans les MEF LRP1^{-/-} nous n'observons qu'une faible réduction du nombre de cellules en phase sub-G0/G1 ($15 \pm 1.8\%$ versus $11 \pm 0.9\%$, sans IGF-1 versus avec IGF-1, $p=0.0399$) (Figure II-13).

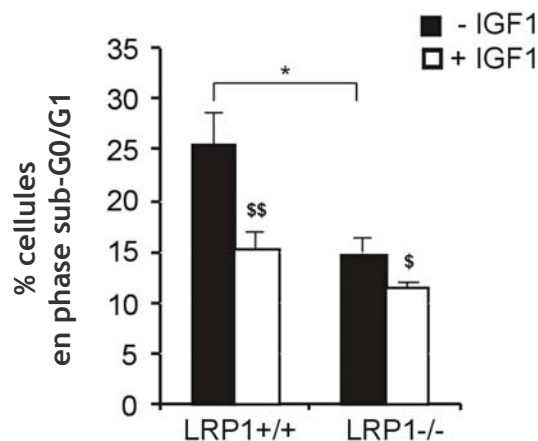
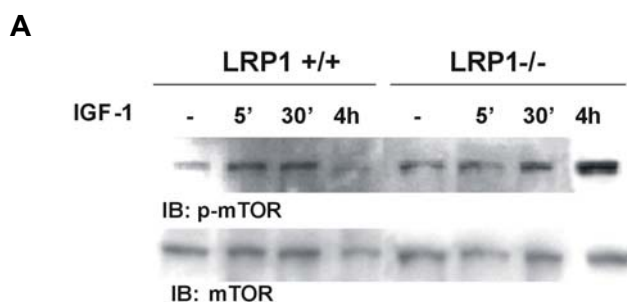


Figure II-13 : LRP1 est requis pour la protection de l'apoptose induite par l'IGF-1. Analyse par FACS des cellules en phase sub-G0/G1 après traitement à l'iodure de propidium (* $p < 0.05$ LRP1^{+/+} versus LRP1^{-/-}, $^{\$}p < 0.05$ et $^{$$}p < 0.01$ cellules traitées versus non traitées)

Akt possède de nombreux substrats et est capable d'activer mTor, une protéine kinase hautement conservée qui contrôle la croissance cellulaire et le métabolisme en réponse au nutriments et aux facteurs de croissance [Wullschleger et al.,2006]. Cette régulation passe par la phosphorylation en sérine 2448 de mTor [Mothe-Satney et al.,2004]. Pour déterminer si LRP1 peut moduler l'activation de mTor induit par l'IGF-1, nous analysons la phosphorylation en sérine 2448 de mTor après stimulation par l'IGF-1 en présence et en l'absence de LRP1. L'IGF-1 induit progressivement l'augmentation de Phospho-mTor qui diminue après 30 minutes de traitement dans les MEF LRP1^{+/+} (Figure II-14 A). En l'absence de LRP1 la phosphorylation de mTor augmente graduellement et est maintenue après 48 heures de stimulation par l'IGF-1 (Figures II-14 B et C). Ces résultats mettent en évidence une réduction par l'IGF-1 de l'activation de la voie mTor en présence de LRP1.



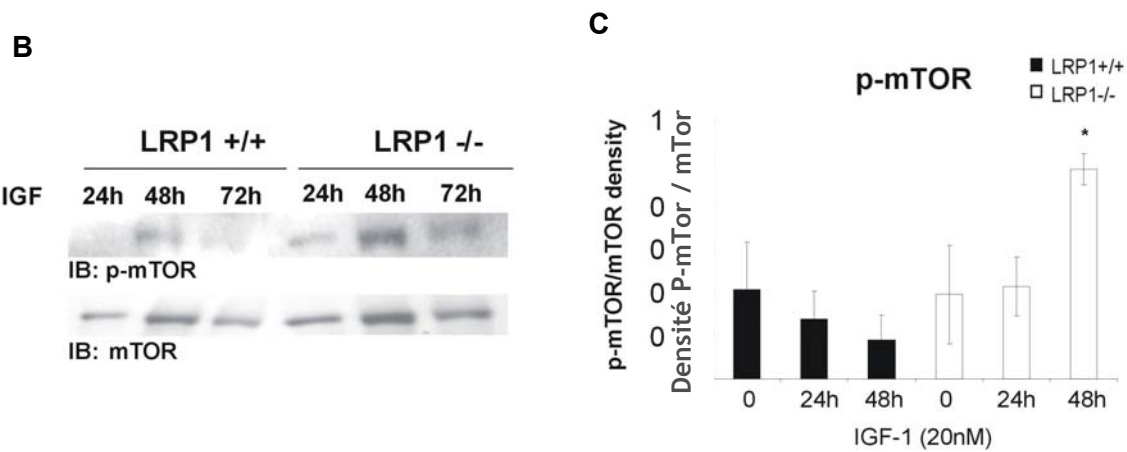


Figure II-14 : LRP1 réduit l'activation de mTor induite par l'IGF-1. (A)(B) Analyse par western blot de la phosphorylation de mTor avant et après une cinétique de stimulation par 20 nM d'IGF-1 dans les MEF LRP1 +/+ et LRP1 -/- (C) Quantification de la phosphorylation de mTor sur la quantité totale de mTor (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM, * $p < 0.05$ LRP1-/- versus LRP1+/+)(Figure représentatives de $n=3$ expériences).

4.1.8. LRP1 « switch » la voie de l'IGF-1.

A/ Nous avons montré après stimulation à l'IGF-I que LRP-1 co-immunoprécipite avec le récepteur de l'IGF. De plus la présence de LRP1 est nécessaire pour le recrutement de ShcA à la membrane plasmique, la phosphorylation de ShcA, le recrutement de Grb2, l'activation de Ras et la phosphorylation de Erk1/2. Par ailleurs, la présence du LRP-1 est indispensable à la progression dans le cycle cellulaire induite par l'IGF-I (Figure 15A).

Nous pensons que l'IGFBP-3, qui est connu pour lier avec une bonne affinité l'IGF-1 et être un ligand de LRP1 [Huang et al.,2005], est un bon candidat

B/ En absence de LRP-1, la cellule est préférentiellement orientée vers une autre voie de signalisation. Ainsi, après stimulation à l'IGF-I, nous observons une augmentation de la phosphorylation de Akt et mTOR, des protéines impliquées dans de nombreuses régulations physiologiques, tels que la différenciation, la survie et l'hypertrophie cellulaire.

Nos expériences menées sur des cellules déficientes en ShcA montrent qu'après stimulation à l'IGF-I, nous retrouvons une augmentation de la phosphorylation de Akt (Figure II-15A).

Ces résultats montrent pour la première fois que le LRP-1 est capable d'orienter le couplage du récepteur à l'IGF-I vers la voie de signalisation ShcA/Grb2/Ras/Erk1/2 et donc de détourner le récepteur à l'IGF-I de la voie de signalisation Akt/mTOR. Ce « switch » permettrait d'orienter la cellule vers la prolifération cellulaire et au détriment d'une autre voie de signalisation. De plus, la présence de ShcA est nécessaire pour que le LRP-1 puisse orienter la cellule vers les voies de signalisation impliquées dans la prolifération [Boney et al.,2000][Boney et al.,2001].

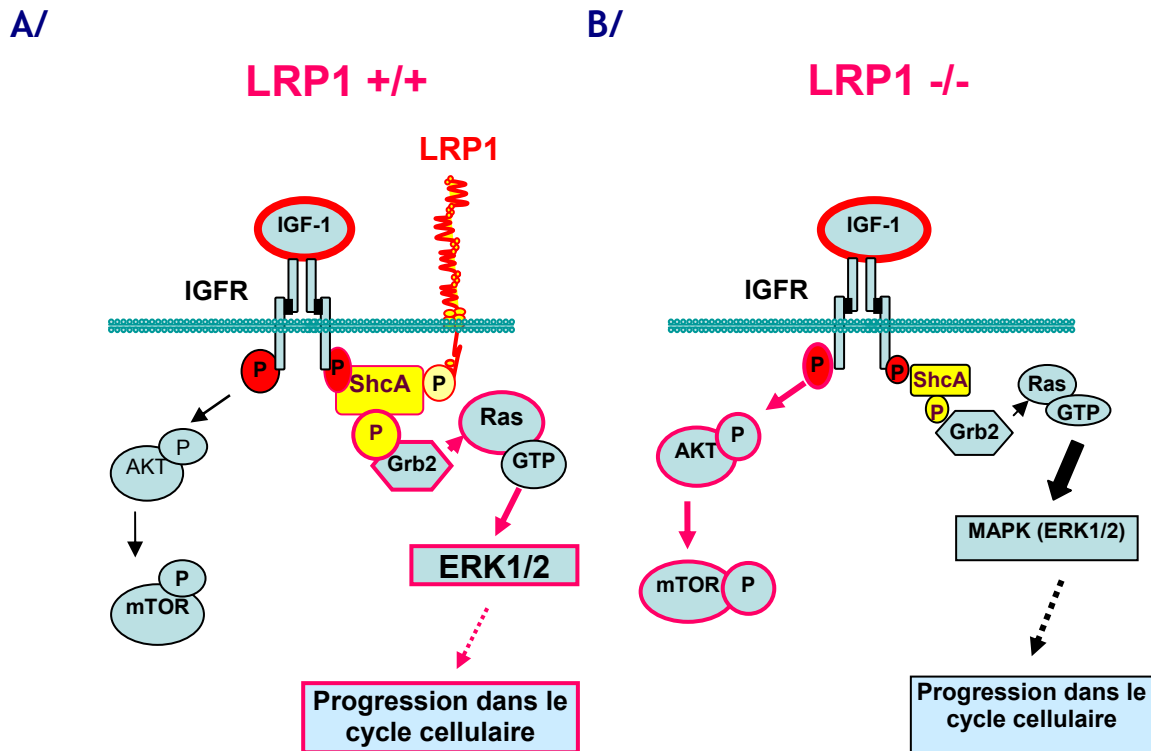


Figure II-15 : LRP1, un aiguilleur de la voie de l'IGF-1.

In vitro nous avons montré que LRP1 oriente la voie de l'IGF-1 en interagissant avec le récepteur à l'IGF-1 et en modulant l'activation de ShcA. De plus chez la souris l'inactivation de LRP1 dans les CML conduit à l'hyperplasie vasculaire accompagnée d'une susceptibilité accrue à développer des plaques d'athérome.

Si nous supposons que LRP1 utilise ShcA pour contrôler les différentes voies de signalisation impliquées dans l'évolution de l'athérosclérose, ShcA serait un acteur important, au même titre que LRP1, dans la protection contre l'athérosclérose.

Ainsi dans la suite de ce projet nous avons commencé à évaluer *in vivo* l'importance de ShcA dans le développement des lésions athéroscléreuses.

4.2. Caractérisation *in vivo* de l'importance de ShcA dans le développement de l'athérosclérose

4.2.1. Génération des souris ShcA^{flox/flox}

Les souris qui portent le gène ShcA, chez lequel les sites loxP (locus of X-over P1) de 34 paires de base (pb) ont été introduits, sont générées par la technique du « gene targeting ». Les sites loxP ont été insérés du côté 5' en amont de l'exon 2 et du côté 3' en aval de l'exon 8. Une cassette PGK-neo (neomycin-resistant marker) qui contient deux sites FRT (Flippase Recognition Target) a été introduite en aval de l'exon 8. L'excision après action de la CRE

recombinase supprime un fragment d'environ 2 kb contenant la séquence qui code pour la moitié NH2 terminale du domaine PTB. Ainsi, toute protéine produite par le locus ciblé sera déficiente en un domaine PTB complet (Figure II-16).

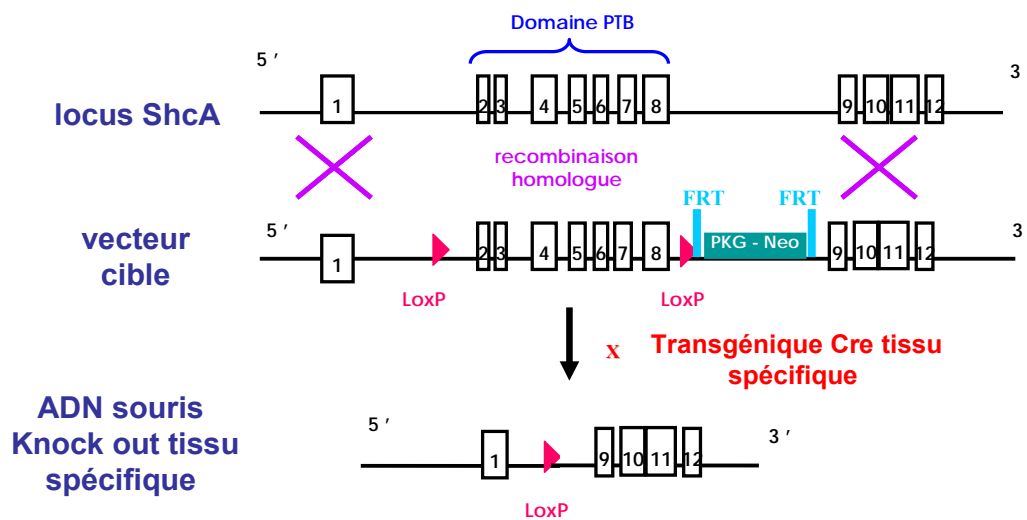


Figure II-16 : Stratégie utilisée pour générer les souris *ShcA*^{flox/flox}.

4.2.2. Caractérisation phénotypique des souris déficientes en *ShcA* au niveau des CML

4.2.2.1. Inactivation de *ShcA* dans les CML

L'inactivation de *ShcA* dans les CMLV a été réalisée en croisant les souris transgéniques SM22 Cre spécifique des CML vasculaires (don de Dr Joachim Herz, UT Southwestern Medical Center, Dallas, Texas) avec les souris *ShcA*^{flox/flox} décrites dans le paragraphe précédent. Dans le but d'augmenter la susceptibilité de ces souris à développer des lésions athéroscléroseuses, nous les avons croisées avec des souris déficientes en récepteur aux lipoprotéines LDL (*LDLr*^{-/-}). Des animaux de 3-6 mois sont nourris avec un régime riche en cholestérol et en acide cholique pendant 11 semaines à 6 mois et analysés pour observer la formation des lésions athéroscléroseuses. Ces souris sont génotypée grâce à des protocoles PCR afin de vérifier (Figure II-17):

- ◇ La présence des sites loxP sur les deux allèles du gène de *ShcA* (PCR ; *ShcA*)
- ◇ L'expression de la CRE recombinase sous la dépendance du promoteur SM22 (PCR ; SM22 CRE)
- ◇ L'inactivation de l'expression du récepteur aux LDL (PCR ; *LDLr*)
- ◇ L'excision de *ShcA* (PCR ; *ShcA*/Cre)



Figure II-17 : Génotypage des souris après croisement des lignées. Analyse par PCR de l'excision de *ShcA* (*ShcA/Cre*), de l'expression des gènes ; *ShcA* (*ShcA*), du récepteur des LDL (*LDLr*), de la CRE recombinase sous la dépendance du promoteur *Tie2* (*Tie2 Cre*) ou *SM22* (*SM22Cre*) à partir d'extrait d'ADN génomique prélevé à la queue après croisement des différentes lignées murines.

4.2.2.2. Caractérisation phénotypique

Pour connaître la durée de régime nécessaire à former des lésions athéroscléreuses nous avons suivie la formation des lésions athéroscléreuses après différentes durée de régime. Les premiers animaux obtenus ont été disséqués sans régime et après 11 semaines et 6 mois de régime. Nous sommes au début de la caractérisation phénotypique et pour l'instant nous avons analysé l'histologie des animaux sans régime et après 11 semaines de régime.

◇ Analyse de l'évolution des poids des souris au cours du régime

Lors du régime les animaux sont pesés toutes les semaines. Sur 3 groupes d'animaux, nous n'avons pas vu de différence significative du poids des souris contrôles et déficientes en *ShcA* (Figure II-18).

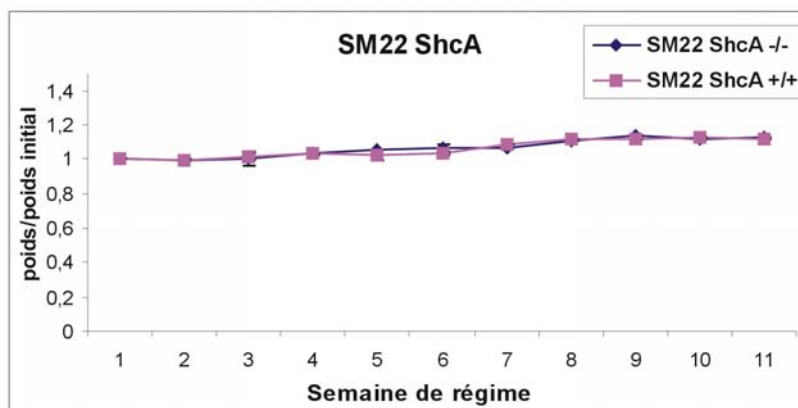


Figure II-18 : Evolution du poids des souris sous régime de type « Paigen ». Pesée hebdomadaire des souris contrôles *LDLr*^{-/-} comparée aux souris déficientes en *ShcA* dans les CML (*SM22 ShcA*^{-/-} ; *LDLr*^{-/-}) au cours du régime (les résultats sont exprimés par la moyenne ± SEM) (Blots représentatifs de n=10 animaux).

◇ Analyse de la formation des lésions athéroscléreuses et des coupes transversales d'aortes

Les animaux sous régime ou non sont analysés afin d'observer si ces animaux ne présentent pas d'anomalies morphologiques visibles. Les animaux n'ayant pas eu de régime de même que ceux ayant eu 11 semaines de régime ne présentent pas d'anomalies de motricité et de comportement anormal. Les organes des souris déficientes en ShcA au niveau des CML sont prélevés (foie, poumon, cœur, rein) et analysés. Ils ne présentent pas de malformations histologiques comparées aux animaux contrôles.

les animaux déficients en ShcA dans les CML et sans régime ne présentent pas de modifications vasculaires comparées aux animaux contrôles.

En revanche l'absence de ShcA au niveau des CML (-/-) chez la souris, ayant eu 11 semaines de régime athérogène, se traduit par un développement de lésions athéroscléreuses principalement localisées au niveau de la crosse aortique et de la bifurcation rénale (visualisable sur la photo par des points rouges) (Figure II-20).

L'analyse histologique des lésions formées après 11 semaines de régime est en cours et permettra de déterminer la composition cellulaire des plaques d'athérome formées.

SM22 ShcA

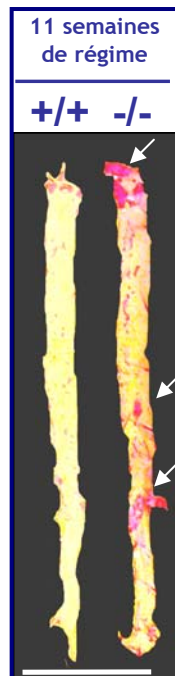


Figure II-20 : Coloration au rouge Sudan IV des aortes entières de souris contrôles LDLr-/- (+/+) et des souris déficientes en ShcA (-/-) dans les CML (LDLr-/-) ayant subi aucun régime (flèches blanche : lésions athéroscléreuses) (Photos représentatives de n=1 animal)(Echelle 1cm).

4.2.3. Caractérisation phénotypique des souris déficientes en ShcA au niveau des cellules endothéliales (CE)

Pour inactiver l'expression de ShcA spécifiquement au niveau des CE nous avons utilisé le système cre-lox. La CRE recombinase est mise sous la dépendance du promoteur Tie2. Tie2 est un récepteur à activité tyrosine kinase spécifique des CE et qui est exprimé très tôt au cours de l'embryogenèse vers 8.0-8.5 dpc (days post coitum) [Takakura et al.,1998]. L'inactivation de ShcA dans les CE très tôt au cours de l'embryogenèse nous permettra de mettre en évidence si ShcA, présent dans les CE, est impliquée dans le développement vasculaire au cours de l'embryogenèse.

Les cellules endothéliales sont également fortement impliquées dans la néo-angiogenèse par l'intermédiaire de nombreux facteurs de croissance tels que le VEGF. Ainsi l'inactivation de l'expression de ShcA dans les CE nous permettra de déterminer l'implication de ShcA dans la formation de nouveaux vaisseaux.

Enfin les CE sont fortement impliquées dans l'initiation et la l'évolution de la plaque d'athérome ainsi nous étudierons l'implication directe de ShcA des CE dans la formation des lésions athéroscléroses. Ceci permettra de déterminer si les mécanismes mis en évidence pour le contrôle de la prolifération cellulaire *in vitro* sont également mis en jeu *in vivo*.

4.2.3.1. Excision de ShcA dans les CE

L'inactivation de ShcA dans les CE a été réalisée en croisant les souris transgéniques Tie2-Cre (Tie2 : récepteur tyrosine kinase exprimé principalement dans les cellules endothéliales) qui exprime la CRE recombinase spécifiquement dans les CE (don de Dr M. Yanagisawa, UT Southwestern Medical Center, Dallas, Texas), avec les souris ShcA flox/flox décrites dans le paragraphe précédent. Pour étudier l'implication de ShcA des CE dans le développement des lésions athéroscléroses, nous avons également croisé ces souris avec des souris LDLr -/- qui augmente la susceptibilité des souris à former des plaques d'athérome. De plus les animaux de 3 mois sont nourris par un régime riche en cholestérol et en acide cholique pendant 11 ou 24 semaines et analysés pour observer la formation des lésions athéroscléroses.

La vérification du génotype est effectuée sur chaque portée afin d'établir un groupe homogène (Figure II-17).

4.2.3.2. Caractérisation phénotypique

Les souris obtenues après croisement sont viables et ne présentent pas d'anomalies physiologiques visibles (bonne motricité, poids normal). Ainsi l'inactivation de ShcA dans les CE n'est pas suffisante pour induire une létalité embryonnaire.

◇ Analyse de l'évolution des poids des souris au cours du régime

La pesée hebdomadaire des souris sous régime de type « Paigen » ne révèle aucune différence significative de poids entre le groupe de souris contrôles LDLr +/+ et le groupe de souris déficientes en ShcA au niveau des CE (Figure II-21).

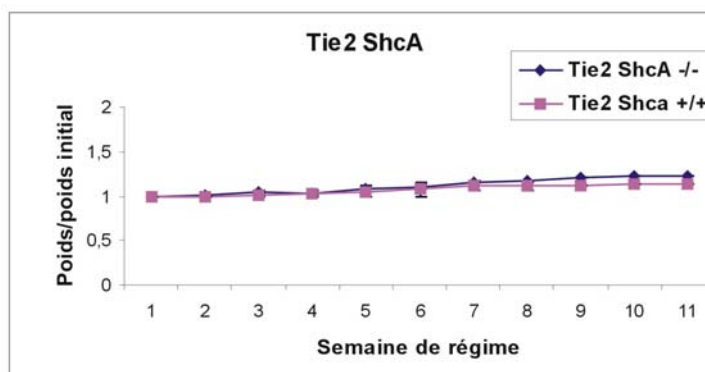


Figure II-21 : Evolution du poids des souris sous régime riche en cholestérol. Pesée hebdomadaire des souris contrôles LDLr +/+ comparée aux souris déficientes en ShcA dans les CML (Tie2 ShcA -/- ; LDLr-/-) au cours du régime (les résultats sont exprimés par la moyenne \pm SEM)(graphique représentatif de n=10 animaux).

◇ Analyse de la formation des lésions athéroscléreuses

Les premières aortes de souris Tie2 ShcA -/-, LDLr+/+ disséquées après 11 semaines de régime et après coloration au rouge Sudan IV, ne présentent pas de lésions athéroscléreuses par rapport aux souris contrôles (Figure II-22). Les colorations rouges observables sur la photo ne représentent pas de lésions athéroscléreuses mais la coloration de la graisse résiduelle présente autour de l'aorte. Ces résultats montrent que l'aorte des souris déficientes en ShcA au niveau des CE est normale et ne présente pas de lésions athéroscléreuses. Cependant l'analyse des souris déficientes en ShcA dans les CE et en récepteur au LDL reste à être analysé et permettra de mieux comprendre l'implication de ShcA dans la formation des lésions athéroscléreuses.



Figure II-22 : Pas de lésions athéroscléreuses observées en présence et en l'absence de ShcA dans les cellules endothéliales. (La coloration rouge observée sur les aortes ne représente pas de lésions athéroscléreuses mais la présence de graisse résiduelle autour de l'aorte) Coloration au rouge sudan IV des aortes entières de souris contrôles LDLr^{-/-} (+/+) et des souris déficientes en ShcA (-/-) dans les CML (LDLr^{-/-}) ayant subi 11 semaines de régime de type « Paigen diet » (Photos représentatives de n=1 animal)(Echelle 1cm).

◇ Analyse histologique des coupes transversales d'aortes

L'analyse histologique de la paroi vasculaire des souris déficientes en ShcA au niveau des CE ne révèle pas d'hyperplasie vasculaire (Figure II-23). La coloration des fibres élastiques par l'orcéine ne montre pas de modification dans les aortes en l'absence de ShcA dans les CE par rapport aux contrôles (Figure II-23). La coloration au trichrome ne révèle pas de différences morphologiques des fibres de collagène dans les aortes (Figure II-23). Ces résultats ne montrent pas d'anomalie de l'aorte chez les souris déficientes en ShcA dans les CE.

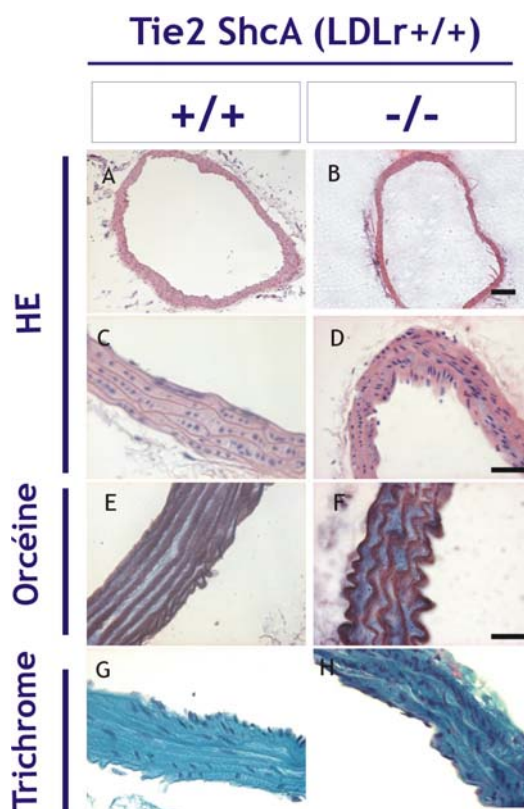


Figure II-23 : Colorations à l'hématoxyline/éosine (HE), à l'orcéine et au trichrome de coupes transversales d'aortes de souris contrôles (+/+) et des souris déficientes en ShcA au niveau des CE sans régime athérogène. (Photos représentatives de n=2 animaux)(Echelle (A,B); 150µm, (C,D); 50µm, (E à H); 30µm).

Partie 2:

Conclusion

5. Conclusion

En conclusion, nous avons montré dans cette étude que *in vitro* le complexe membranaire LRP1/IGF-1/ShcA agit comme un aiguilleur moléculaire qui est requis pour orienter la voie de signalisation vers celle de Ras/Erk $\frac{1}{2}$ et permettre à la cellule de progresser dans le cycle cellulaire. En l'absence de LRP1, l'IGF-1 active la voie de Akt/mTor. L'effet de l'activation de cette voie reste à être élucidé dans notre modèle. Néanmoins l'activation de la voie de Akt-mTor par l'IGF-1 ne modifie pas les phénomènes d'apoptose. Nous pensons qu'elle permet l'entrée dans un programme de différenciation cellulaire ou d'hypertrophie, hypothèse que je développerai dans la partie discussion.

Ainsi, LRP1 est un corécepteur du récepteur à l'IGF et sa présence semble être nécessaire pour induire une activation optimale de la voie ShcA :Ras :ERK en réponse à l'IGF-1.

De plus, cette étude *in vitro* nous permet de montrer que la présence de LRP1 après stimulation par l'IGF-1 est nécessaire pour activer ShcA et induire la prolifération cellulaire. L'absence de ShcA comme de LRP1 entraîne l'activation de Akt après traitement par l'IGF-1. ShcA semble être indispensable pour orienter la voie de l'IGF-1.

La partie, *in vivo*, ne nous a pas encore permis d'émettre de conclusion. Cependant, contre toute attente, nous avons observé que l'inactivation de ShcA dans les CE n'est pas létale au cours de l'embryogenèse.

De plus la présence de ShcA dans les CML semble en revanche protéger contre l'athérosclérose mais les résultats nécessitent d'être confirmés.

Partie 2:

Discussion
&
Perspectives

6. Discussion et Perspectives

6.1. LRP1 « switch » la voie de l'IGF-1 : Hypothèse mécanistique supplémentaire

Le LRP1 est associé à de multiples voies de signalisation. Il a été montré comme étant impliqué dans des complexes membranaires avec des récepteurs comme le récepteur-β au PDGF [Takayama et al.,2005][Boucher et al.,2003], le récepteur activateur de plasminogène de type urokinase (uPAR) [Conese et al.,et al 1995][Webb et al.,2000] et le récepteur au TGF-β [Huang et al.,2004a]. Dans la majeure partie des cas, LRP1 contrôle les voies de signalisation en contrôlant l'endocytose et l'ubiquitination des récepteurs [Takayama et al.,2005]. Nos résultats montrent pour la première fois que le LRP1 interagit également avec le récepteur à l'IGF-1 pour contrôler sa voie de signalisation (Figure II-1). En effet, nous avons montré que LRP-1 co-immunoprécipite avec le récepteur à l'IGF-1. Néanmoins l'IGF-1 n'a pas d'affinités pour le domaine extracellulaire de LRP1 [Loukinova et al.,2002]. l'IGFBP-3 se lie à la fois à l'IGF-1 [Clemmons ,2007b][Oh et al.,2006] et au domaine extracellulaire dans la région II et IV de LRP1 [Tseng et al.,2004]. Ainsi, nous proposons que LRP1 forme un complexe membranaire avec le récepteur à l'IGF-1 grâce à l'interaction de l'IGF-1 au niveau de son récepteur et à l'IGFBP-3 au niveau de LRP1 (Figure II-24).

Nous montrons ensuite que la présence de LRP1 régule la localisation de ShcA à la membrane. Lorsque LRP1 est absent les 3 isoformes de ShcA se retrouve déjà à la membrane plasmique ce qui altère le recrutement de ShcA du cytoplasme à la membrane après traitement par l'IGF-1 (Figure II-4). La délétion de LRP1 dérégule ce processus dynamique et ainsi perturbe la voie de signalisation de l'IGF-1. Ceci pourrait être expliqué par le fait que LRP1 soit un récepteur d'endocytose et permet le recyclage et la dégradation, par le protéasome, d'un grand nombre de ligands et de récepteurs. En son absence la phase de recyclage des récepteurs membranaires serait perturbée ce qui pourrait expliquer la présence prolongée de ShcA à la membrane à l'état non stimulé. Ainsi, après stimulation par l'IGF-1, en l'absence de LRP1 la cinétique de recrutement de ShcA à la membrane serait complètement modifiée.

Après stimulation par l'IGF-1 et en présence de LRP1, ShcA va pouvoir se fixer au domaine cytoplasmique du récepteur à l'IGF-1 où elle sera activée [Ravichandran et al.,2001][Ling et al.,2005]. LRP1 constitue également un point d'ancrage pour ShcA. Cependant pour que ShcA soit recruté au niveau de LRP1, le domaine cytoplasmique de LRP1 doit être phosphorylé en tyrosine [Barnes et al.2001][Loukinova et al.,2002]. La présence d'IGF-1 à son récepteur permet d'activer et de recruter la protéine kinase Src à proximité de ShcA et de LRP1 [Lieskovska et al.,2006]. De plus, il a été montré que LRP1 peut être phosphorylé en tyrosine par v-Src au niveau du second motif NPXY situé sur sa partie cytoplasmique [Barnes et al.,2001]]. Par conséquent l'IGF-1, en activant les protéines kinases Src, induit la

phosphorylation du domaine cytoplasmique de LRP1 et constitue un point d'ancrage pour le domaine PTB de ShcA qui pourra être à son tour phosphorylé (Figure II-24). En revanche nous n'avons pas déterminé si v-Src induisait la phosphorylation de ShcA ou si la phosphorylation de LRP1 par v-Src permettait le recrutement et l'activation de ShcA par une autre kinase.

D'autre part, l'interaction directe entre LRP1 et ShcA n'a pas été révélée dans nos expériences mais montrée par plusieurs équipes [Barnes et al.,2001][Loukinova et al.,2002]. Cependant, l'étude de Ling et al. nous laisse penser qu'il existe un intermédiaire entre ShcA et LRP1 [Ling et al.,2005]. Cet intermédiaire pourrait être la protéine SHP-2, une tyrosine phosphatase qui a été mise en avant dans les études de Ling et al. comme étant importante pour le recrutement des ShcA, la phosphorylation de ShcA et l'activation de la voie de Erk 1/2 par l'IGF-1 [Ling et al., 2005]. De plus, récemment, il a été montré que SHP-2 est capable par son domaine SH2 de se lier au domaine cytoplasmique de LRP1 lorsque la tyrosine 4507, présente dans le motif NPXY, est phosphorylée [Betts et al.,2008]. Nous pensons que LRP1 fonctionnerait comme SHPS-1 et servirait de point d'ancrage à SHP-2 après stimulation par l'IGF-1. LRP1 et le récepteur de l'IGF-1 pourrait alors recruter ShcA et induire sa phosphorylation. ShcA phosphorylée activerait la cascade de signalisation de Ras/MAPK. En revanche en l'absence de LRP1, SHP-2 serait recrutée rapidement au niveau du récepteur à l'IGF-1 et par son activité phosphatase viendrait déphosphoryler ShcA. Ceci atténue l'activation de la voie de Erk 1/2 et réduit la progression des cellules dans le cycle cellulaire après stimulation par l'IGF-1. Ainsi la présence de LRP1 semble être nécessaire à limiter la quantité de SHP-2 venant se fixer au niveau du récepteur à l'IGF-1 et à induire une réponse mitogène optimale (Figure II-24).

Par ailleurs, le recrutement de ShcA au niveau des cavéoles a été montré comme étant requis pour sa phosphorylation par l'IGF-1 [Ling et al.,2005]. Nos résultats montrent que LRP1, qui est enrichi dans les cavéoles [Boucher et al.,2002], est nécessaire pour induire la phosphorylation en tyrosine de l'isoforme ShcA après stimulation par l'IGF-1 (Figure II-5). En l'absence de LRP1 la phosphorylation de p66ShcA induite par l'IGF-1 est complètement abolie. Cette phosphorylation de ShcA permet de recruter Grb2 [Ravichandran et al.,2001]. Par conséquent nos résultats mettent en évidence que la présence de LRP1 est nécessaire pour une activation optimale de ShcA par l'IGF-1.

Le recrutement de Grb2-Sos au niveau de ShcA entraîne l'activation de la cascade de signalisation Ras/Raf/MEK/Erk1/2 [Cobb et al.,1995]. En accord avec d'autres études, nous montrons une cinétique d'activation de Ras après stimulation par l'IGF-1. Cependant cette cinétique d'activation n'est observée qu'en présence de LRP1. En effet, l'absence de LRP1 réduit l'activation de Ras induite par l'IGF-1 (Figure II-8). Cet effet après traitement par l'IGF-1 et en l'absence de LRP1 se répercute sur toute la voie de signalisation aboutissant à une diminution considérable de la phosphorylation de Erk1/2 (Figure II-9) et un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 (Figure II-10).

A défaut d'activer la voie de Ras-Erk1/2, l'IGF-1 est capable d'activer la voie de Pi3K/Akt et ainsi de protéger les fibroblastes contre l'apoptose [Kulik et al., 1997]. Nous observons que la phosphorylation de Akt après stimulation par l'IGF-1 est augmentée en l'absence de LRP1 (Figure II-11). Néanmoins l'activation de la voie de Akt induite par l'IGF-1 dans les MEF déficients en LRP1 n'est pas corrélée à la survie cellulaire (Figure II-13) comme décrit par l'étude de Kulik et al. [Kulik et al., 1997]. En revanche il existe de nombreux substrats de Akt comme mTor [Levine et al., 2006]. Nos résultats montrent que l'hyper-activation de Akt induite par l'IGF-1 en l'absence de LRP1 est corrélée à une phosphorylation de mTor (Figure II-14). En conclusion LRP1 oriente la signalisation de l'IGF-1 vers l'activation de Ras-Erk1/2 et vers la multiplication cellulaire. En revanche l'absence de LRP1 conduit à l'activation de Akt-mTor (Figure II-24). L'effet sur le phénotype de cette voie en l'absence de LRP1 n'est pas encore caractérisé.

Il a été montré que l'IGF-1, par l'activation de Pi3K/Akt, est impliquée dans le programme de différenciation adipocytaire [Sakaue et al., 1998][Tomiya et al., 1995][Xia et al., 1999]. En effet l'activation de la voie de Akt par l'IGF-1 induit la différenciation des pré-adipocyte 3T3-L1 en adipocytes [Xu et al., 2004]. L'inhibition de cette voie, par LY294002, inhibent l'adipogenèse [Yu et al., 2008].

Par ailleurs il a été montré que, mTor et sa protéine cible p70S6 kinase (p70S6K) sont activées dans les cellules mésenchymateuses humaines après induction de l'adipogenèse et régulent la différenciation adipocytaire en contrôlant l'activation de PPAR γ [Kim et al., 2004]. L'inhibition de la voie de mTor/p70S6 par la rapamycine inhibe l'adipogenèse [Yu et al., 2008]. Par conséquent, l'IGF-1 en induisant l'activation de Akt-mTor pourrait induire le programme de différenciation adipocytaire.

Par ailleurs, Hosooka et al. démontrent que l'insuline inhibe l'activation de la voie de Ras-Erk par le recrutement de Dok1 (Downstream of tyrosine Kinases-1) et de la molécule rasGAP (p120 Ras GTPase-activating protein) et permet aux MEF, dans un cocktail adipogénique, de se différencier en adipocytes [Shao et al., 1998][Hosooka et al., 2008]. De plus, l'IGF-1, dans les pré-adipocytes, peut orienter la signalisation cellulaire de la prolifération vers la différenciation cellulaire. Ce « switch » est corrélé à une perte de la phosphorylation de ShcA sans modifier la phosphorylation de IRS-1 [Boney et al., 2000].

Ainsi, nous suggérons, qu'en absence de LRP1, l'activation de la voie de Akt/mTor et la diminution de l'activation de Ras-Erk1/2 induites par l'IGF-1 conduiraient les MEF vers un programme de différenciation cellulaire.

Nous avons récemment démontré chez les souris que l'absence de LRP1 dans les adipocytes entraînait une lipodystrophie accompagnée d'une stéatose hépatique [Terrand et al., 2009].

Cependant *in vitro*, les MEF déficients en LRP1 après 10 jours de croissance dans un cocktail de différenciation adipocytaire ne se différencient pas en adipocytes mais accumulent du cholestérol et des esters de cholestérol dans leur cytoplasme [Terrand et al., 2009]. Ceci

suggère, que l'activation de Akt-mTor induite par l'IGF-1 en l'absence de LRP1 dans les MEF ne conduit pas à la formation d'adipocytes. Par conséquent l'absence de LRP1 après stimulation par l'IGF-1 active un autre processus cellulaire impliquant la phosphorylation de Akt-mTor.

Il a été montré que la voie de Pi3K/Akt/mTor induite par l'IGF-1 est capable d'activer les phénomènes d'hypertrophie musculaire [Bodine et al.,2001][Barton et al., 2002] et d'hypertrophie cardiaque [Latronico et al.,2004][McMullen et al.,2004]. L'hypertrophie des CML est induite par l'angiotensine II et par activation de la voie des Pi3K entrainant l'épaississement de la paroi vasculaire [Yamakawa et al.,2003]. Cet épaississement vasculaire peut entrainer de nombreuses complications, telles qu'une réduction de la compliance et du diamètre de la lumière vasculaire, pouvant induire de nombreuses pathologies cardiovasculaires (hypertension, athérosclérose). Par ailleurs, nous avons montré que l'inactivation de LRP1 dans les CML chez la souris associée à un régime riche en cholestérol et en acide cholique conduit à l'épaississement de la paroi vasculaire et à l'athérosclérose [Boucher et al.,2003]. Ainsi LRP1 contrôlerait la voie de l'IGF-1 et préviendrait les cellules de l'hypertrophie (Figure II-24).

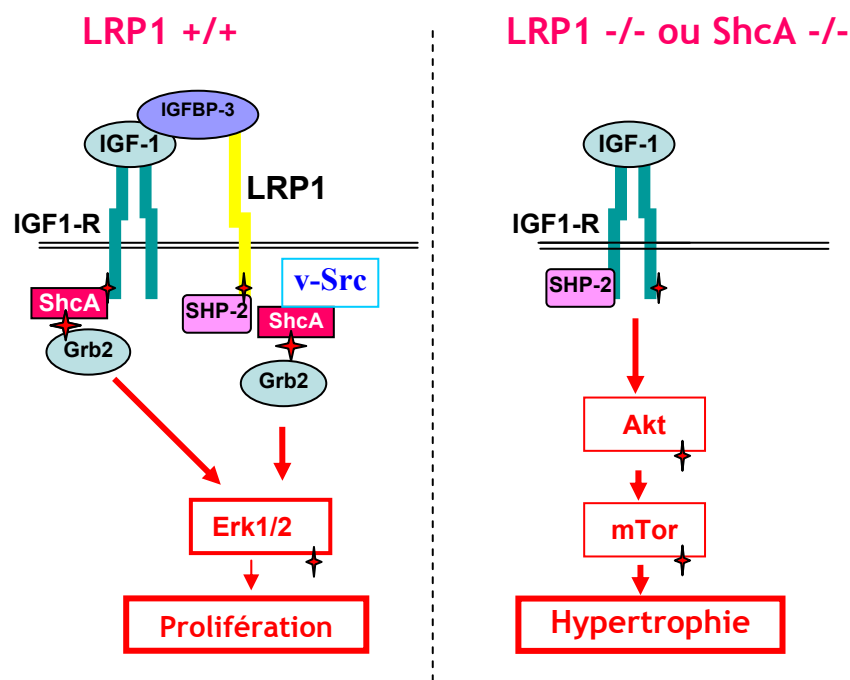


Figure II-24 : Hypothèse du mécanisme de régulation de la voie de l'IGF-1 par LRP1 (✦; sites phosphorylés en tyrosine) : la liaison de l'IGF-1 à son récepteur permet grâce à l'IGFBP-3 la formation du complexe membranaire entre l'IGF-R et le LRP1, l'activation de Src permet la phosphorylation du motif NPXY de LRP1 et le recrutement de SHP-2 puis de ShcA. La phosphorylation de ShcA pourra alors activer la voie des MAPK/Erk1/2 et induire la prolifération cellulaire. En l'absence de LRP1, la protéine SHP-2 est absente et ne peut recruter ShcA au niveau du récepteur. L'IGF-1 active la voie de Akt/mTor et entraine l'hypertrophie cellulaire.

6.2. Caractérisation phénotypique des cellules et des souris déficientes en ShcA

Nous avons mis en évidence *in vitro* le rôle de LRP1 dans le contrôle de la signalisation de l'IGF-1 via ShcA. En effet nous avons montré que la présence de LRP1 est nécessaire pour activer ShcA et la prolifération cellulaire, en réponse à l'IGF-1. En l'absence de LRP1 comme en absence de ShcA, l'IGF-1 entraîne dans les MEF l'activation de la voie de Akt-mTor.

Actuellement nous évaluons, *in vitro*, l'importance de ShcA dans la progression du cycle cellulaire et dans la différenciation adipocytaire après traitement par l'IGF-1. Nous avons déjà pu démontrer qu'en l'absence de ShcA dans les fibroblastes, la stimulation par l'IGF-1 est détournée de l'activation de la voie de Ras-Erk [Kim et al.,1998] pour une activation de la voie de Pi3K/Akt (Figure II-12). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en l'absence de LRP1. Afin de conforter cette observation nous souhaitons tester l'importance de ShcA dans le programme de différenciation des pré-adipocytes 3T3-L1. L'équipe de Frackelton a montré que l'inactivation transitoire de Shc atténue l'activation de MAPK induite par l'IGF-1, inhibe la synthèse d'ADN et accélère l'expression des marqueurs de la différenciation adipocytaire tels que ap2, PPAR γ et LPL (lipoprotéine lipase) [Boney et al.,2000]. Les auteurs ont suggéré que l'incapacité de l'IGF-1 à activer la signalisation de ShcA vers les MAPK contribue à la différenciation des 3T3-L1 en adipocytes [Boney et al.,2000].

Nous testerons également l'influence de l'IGF-1 en présence et en l'absence de ShcA sur la progression dans le cycle cellulaire.

Enfin l'importance de ShcA dans le développement des lésions athéroscléreuses sera directement évaluée par la génération des souris déficientes en ShcA spécifiquement au niveau des cellules endothéliales ou au niveau des CML. Cette partie du projet a pour but de mieux comprendre les mécanismes de signalisation impliqués dans la formation des lésions athéroscléreuses et développer une nouvelle approche thérapeutique pour la prévention et/ou le traitement de l'athérosclérose. En effet si LRP1 utilise ShcA pour réguler les voies de signalisation intracellulaires et protéger contre l'athérosclérose, l'inactivation de ShcA dans les CML devrait induire une susceptibilité accrue à développer l'athérosclérose.

ShcA est également impliqué au cours de l'embryogenèse dans la formation du système vasculaire, nous évaluerons l'importance de ShcA dans la formation de nouveaux vaisseaux chez la souris.

6.3. Protection contre l'athérosclérose par la voie de l'IGF-1

LRP1 est capable d'orienter la voie de l'IGF-1 soit vers la prolifération cellulaire soit vers la voie de Akt-mTor.

In vivo l'analyse phénotypique des souris déficientes en LRP1 au niveau des CML conduit à l'athérosclérose [Boucher et al.,2003]. Ces souris présentent de nombreuses lésions

athéroscléreuses associées à une accumulation importante de cellules spumeuses et une migration/prolifération accrue de CML.

Les CML de la paroi ont la capacité de se différencier en cellules accumulant des lipides [Faggiotto et al.,1984][Wolfbauer et al., 1986][Klouche et al.,2000][Rong et al.,2003] et ainsi participer, avec les macrophages, à la formation du cœur lipidique de la plaque d'athérome. De plus il a été montré que l'IGF-1 est capable d'induire la formation de cellules accumulant des lipides lors de processus de différenciation cellulaire, et ce via l'activation de la voie de Akt/mTor [Sakaue et al., 1998][Tomiyama et al.,1995][Xia et al.,1999]. Ceci suggère que l'augmentation de l'IGF-1 dans la plaque d'athérome après lésion vasculaire pourrait, en l'absence de LRP1 et par l'activation de Akt-mTor, induire l'accumulation de lipides dans le cytoplasme des CML et ainsi contribuer à la croissance du centre lipidique de la plaque d'athérome.

Donc LRP1, au cours du développement de l'athérosclérose, inhibe la prolifération des CML en contrôlant la voie du PDGFBB et du TGF- β et inhibe la formation de cellules spumeuses à partir des CML en contrôlant la voie de l'IGF-1. Ainsi LRP1 prévient la formation et le développement de la plaque d'athérome.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Ce travail a permis de mieux comprendre le mécanisme d'action de LRP1 pour réguler la différenciation cellulaire et la formation de cellule de type chondrocyte mais également pour contrôler la voie de l'IGF-1.

1. LRP1 : un aiguilleur dans le devenir cellulaire

La détermination cellulaire est un processus physiologique important mais également pathologique. La compréhension des mécanismes de régulation de la différenciation cellulaire permettra de développer de nouvelles thérapies ciblées pour chaque pathologie.

L'objectif de cette partie de ma thèse était de mettre LRP1 au centre des processus de différenciation cellulaire, lui conférant ainsi un rôle d'aiguilleur entre la formation de cellules accumulant du cholestérol et des esters de cholestérol et la chondrogenèse.

En effet nous avons montré que LRP1 est capable de réduire l'accumulation de cholestérol et d'ester de cholestérol dans le cytoplasme des MEF lors de l'engagement vers un programme de différenciation adipocytaire et induire la formation de cellules de type chondrocyte au cours de la différenciation chondrocytaire.

Pour cela LRP1 contrôle l'expression de plusieurs protéines régulatrices qui modulent la balance entre cellules accumulant des lipides et chondrocytes.

La protéine Wnt5a dont l'expression est induite par la présence de LRP1 est capable d'activer l'expression de Cart1 et de Sox9 et ainsi d'activer le programme de différenciation chondrocytaire. De plus, Wnt5a bloque l'activation du programme adipocytaire et prévient la formation d'adipocytes. Ainsi LRP1 en participant à l'activation de l'expression de Wnt5a contrôle la formation de chondrocytes.

La protéine SPARC, en se liant, peut migrer dans le noyau et activer l'expression de Sox9 et Cart1, pro-chondrogénique. Par ailleurs SPARC a été décrite comme répresseur de l'adipogenèse en inhibant l'expression de PPAR γ et de C/EBP [Nie et al.,2009]. Ainsi LRP1 en permettant à SPARC d'entrer dans la cellule permet d'activer le programme de différenciation chondrocytaire.

In vivo la régulation est beaucoup plus fine et implique PPAR γ . En effet PPAR γ contrôle cette balance adipocytes/chondrocytes en exprimant un inhibiteur de Wnt5a, SFRP2.

Il reste à approfondir le mécanisme d'action utilisé par LRP1 et à confirmer l'implication de LRP1 comme régulateur de la différenciation chondrocytaire *in vivo*. L'étude de LRP1 dans un modèle d'arthrose permettrait de confirmer son rôle dans les phénomènes de reconstruction cartilagineuse.

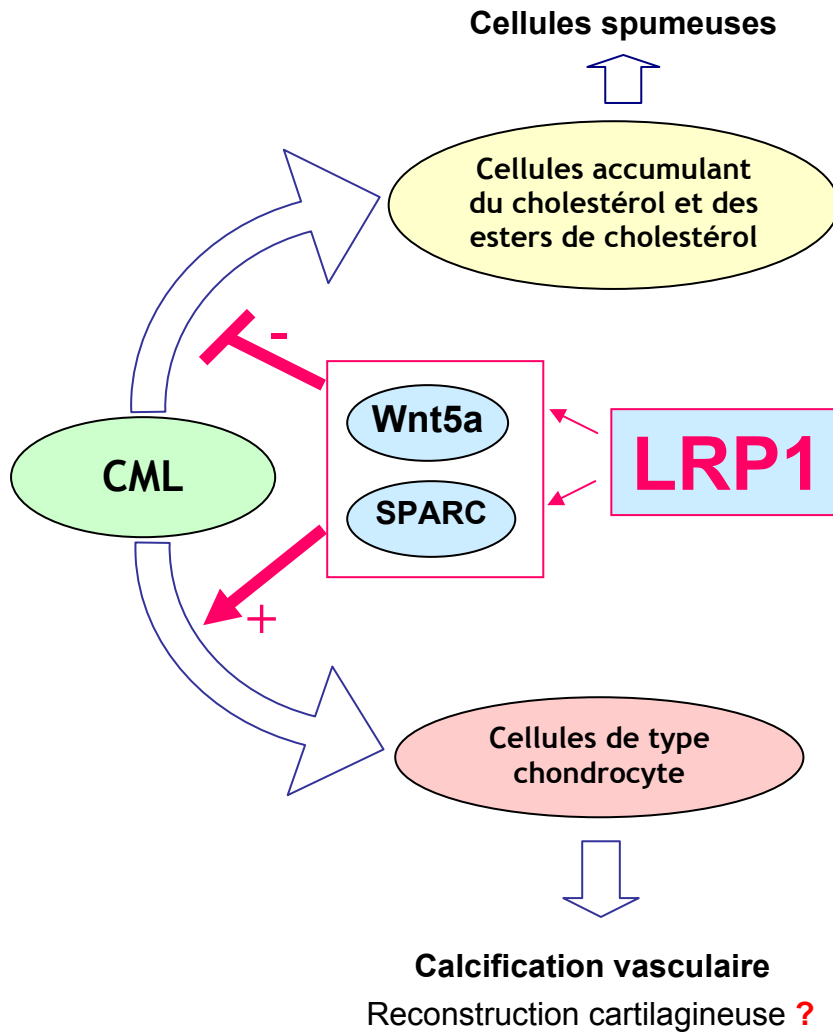


Figure C-1 : LRP1 un aiguilleur dans la différenciation cellulaire

2. LRP1 : un régulateur de la voie de l'IGF-1

La voie de l'IGF-1 est impliquée dans de nombreuses régulations physiologiques entraînant la prolifération cellulaire, la survie, l'hypertrophie et la différenciation cellulaire. Elle a également été impliquée dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

LRP1 contrôle la prolifération cellulaire induite par le PDGFBB et le TGF- β et protège contre l'athérosclérose.

L'objectif de cette partie de ma thèse était de déterminer si LRP1 contrôlait la prolifération cellulaire induite par l'IGF-1 et par quels mécanismes d'action.

Nous avons montré que LRP1 est capable de réguler la voie de l'IGF-1 en orientant le couplage du récepteur à l'IGF-1 vers la voie de ShcA :Grb2 :Ras :ERK en le détournant de la voie de Akt :mTor. La présence de LRP1 conduit à l'activation de ShcA et de la prolifération par l'IGF-1. En revanche, en l'absence de LRP1 ou de ShcA, l'IGF-1 active la voie de Akt.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence une nouvelle voie de signalisation et un nouveau mécanisme d'action utilisé par LRP1 pour réguler la prolifération cellulaire. De plus

elle nous a permis de mettre en évidence une nouvelle protéine, ShcA, qui pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique pour contrôler la prolifération cellulaire et protéger contre l'athérosclérose.

Pour tester cette hypothèse nous avons inactivé l'expression de ShcA dans des tissus spécifiques (CML et CE) chez la souris. L'analyse phénotypique de ces souris n'est pas encore achevée. Cependant l'inactivation de ShcA dans les CML nous laisse présager un rôle protecteur de ShcA contre l'athérosclérose.

3. Perspectives d'une thérapie anti-athéroscléreuse

La présence de LRP1 dans les CML protège contre l'athérosclérose en contrôlant différentes voies de signalisation cellulaire (celles du PDGFBB, du TGF- β et de l'IGF-1). En effet il inhibe la prolifération des CML induite par le PDGFBB ou par le TGF- β . Il bloque l'activation de la voie de Akt/mTor induite par l'IGF-1 ce qui pourrait inhiber l'hypertrophie des CML. Enfin il réduit l'accumulation de cholestérol dans le cytoplasme des CML qui conduit à la formation de cellules spumeuses (Figure C-2).

Cependant LRP1 est exprimé de manière ubiquitaire et les CML sont présentes dans la paroi interne de la plupart des organes creux (utérus, appareil digestif par exemple), de presque tous les vaisseaux sanguins, des canaux excréteurs des glandes, des conduits uro-génitaux et des voies respiratoires.

En activant les processus de régulation de LRP1, par induction de son expression dans les CML, risque de bloquer la prolifération des CML dans tous les organes exprimant des CML. Donc LRP1 ne constituerait pas une bonne cible thérapeutique pour le traitement de l'athérosclérose.

En revanche si ShcA présent dans les CML, au même titre que LRP1, protège contre l'athérosclérose il constituerait une meilleure cible thérapeutique que LRP1. En effet la présence du couple LRP1/ShcA malgré son expression ubiquitaire va permettre d'induire la prolifération des CML par les facteurs de croissance tels que l'IGF-1. Cependant elle bloquerait la voie de Akt : mTor qui semble conduire vers l'hypertrophie cellulaire. Ainsi l'activation de ShcA protégerait contre l'athérosclérose en inhibant l'hypertrophie des CML et donc l'hyperplasie de la paroi vasculaire sans inhiber la prolifération des CML nécessaire à la croissance des autres organes.

Protège contre l'athérosclérose

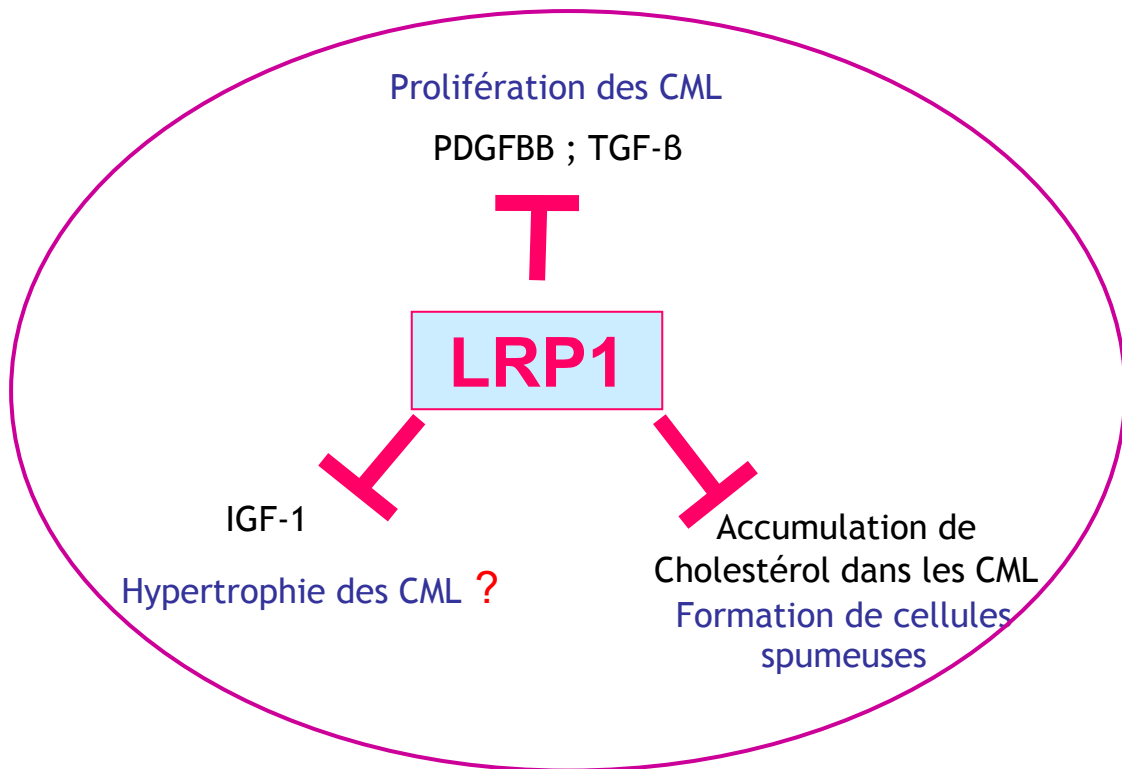


Figure C-2 : LRP1 protège contre l'athérosclérose. Ensemble des voies contrôlées par LRP1 et qui sont impliquées dans l'évolution de l'athérosclérose.

LRP1 est un puissant régulateur de nombreux processus physiologiques. Il régule le métabolisme lipidique, la prolifération cellulaire et la différenciation cellulaire. Le contrôle de LRP1 sur ces métabolismes évite de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose, l'obésité et l'arthrose. La compréhension des mécanismes de régulation utilisés par LRP1 permet de mettre en évidence de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement et/ou la prévention contre les diverses pathologies qui l'impliquent.

Bibliographie

Bibliographies

- Abbas A, Lichtman A., 2001 "Basic Immunology : Function and disorders of the immune system" by W.B Saunders Compagny
- Abe J, Deguchi J, Matsumoto T, Takuwa N, Noda M, Ohno M, Makuuchi M, Kurokawa K, Takuwa Y. 1997 Sep. "Stimulated activation of platelet-derived growth factor receptor in vivo in balloon-injured arteries: a link between angiotensin II and intimal thickening". *Circulation*. 16; 96(6): 1906-13
- Abedin, M., Tintut, Y., and Demer, L.L. 2004. "Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1161-1170
- Abella A, Dubus P, Malumbres M, Rane SG, Kiyokawa H, Sicard A, Vignon F, Langin D, Barbacid M, Fajas L., 2005 "Cdk4 promotes adipogenesis through PPAR γ activation" *Cell Metab*. 2; 239-249
- Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. 1997 "beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." *EMBO J*. 16(13):3797-804
- Ahumada A, Slusarski DC, Liu X, Moon RT, Malbon CC, Wang HY. 2002 "Signaling of rat Frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP" *Science*. 298(5600):2006-10
- Akiyama H, Lyons JP, Mori-Akiyama Y, Yang X, Zhang R, Zhang Z, Deng JM, Taketo MM, Nakamura T, Behringer RR, McCrea PD, de Crombrughe B. 2004 May 1 "Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation" *Genes Dev*.;18 (9):1072-87
- Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. 2002 Nov 1 "The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6." *Genes Dev*.;16 (21):2813-28
- Al-Aly Z, Shao JS, Lai CF, Huang E, Cai J, Behrmann A, Cheng SL, Towler DA. 2007 Dec "Aortic Mx2-Wnt calcification cascade is regulated by TNF-alpha-dependent signals in diabetic Ldlr $^{-/-}$ mice" *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27(12):2589-96
- Allen BG, Walsh MP. 1994 "The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction" *Trends Biochem Sci*. 19(9):362-8
- Ambrosi P, Rolland P, Garçon D 1996 "Homocysteine, a risk factor of atherosclerosis" *Arch Mal Coeur Vaiss*. 89(12):1667-71
- Amizuka N., Warshawsky H., Henderson J. E., Goltzman D. and Karaplis A. C. 1994. "Parathyroid hormone-related peptide-depleted mice show abnormal epiphyseal cartilage development and altered endochondral bone formation." *J. Cell Biol*. 126, 1611-1623
- Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M. 1999 "Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease" *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 19(8):1819-24

- Aslan H, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D, Gazit Z. 2006** "Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow-derived CD105+ cells" *Stem Cells* 24(7):1728-37
- Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. 1997 Aug** "Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients" *Diabetes* 46(8):1319-27
- Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. 1999 Oct** "PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development" *Mol Cell.* 4(4):585-95.
- Barker TH, Baneyx G, Cardó-Vila M, Workman GA, Weaver M, Menon PM, Dedhar S, Rempel SA, Arap W, Pasqualini R, Vogel V, Sage EH. 2005 Oct 28;** "SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity" *J Biol Chem.* 280(43):36483-93
- Barnes H, Ackermann EJ, van der Geer P. 2003 Jun** "v-Src induces Shc binding to tyrosine 63 in the cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein 1" *Oncogene.* 22(23):3589-97
- Barnes H, Larsen B, Tyers M, van Der Geer P. 2001 Jun 1** "Tyrosine-phosphorylated low density lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1) associates with the adaptor protein SHC in SRC-transformed cells" *J Biol Chem.* 276(22):19119-25
- Barrow JR 2006 Apr.** "Wnt/PCP signaling: a veritable polar star in establishing patterns of polarity in embryonic tissues." *Semin Cell Dev Biol.*;17(2):185-93. Epub 2006 Apr 18.
- Barton ER, Morris L, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL 2002** "Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice" *J Cell Biol* 157:137-148
- Bastie C, Luquet S, Holst D, Jehl-Pietri C, Grimaldi PA 2000** "Alterations of peroxisome proliferator-activated receptor delta activity affect fatty acid-controlled adipose differentiation". *J Biol Chem* 275:38768±38773
- Basu-Modak S, Braissant O, Escher P, Desvergne B, Honegger P, Wahli W. 1999** "Peroxisome proliferator-activated receptor beta regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures" *J Biol Chem.* 274(50):35881-8
- Battegay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R 1990** "TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop" *Cell* 63: 515-524
- Bayes-Genis A., C. A. Conover, et al. 2000.** "The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis." *Circ Res*; 86(2): 125-30
- Beisiegel U. 1998** "Lipoprotein metabolism" *Eur Heart J.* 19 Suppl A:A20-3.
- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, et al.: 1997** "The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein" *Nature* 341:162- 164
- Beisiegel U, Weber W, Ihrke G, Herz J, Stanley KK. 1989** "The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein" *Nature.* 341(6238):162-4

- Bennett SM, Agrawal A, Elasha H, Heise M, Jones NP, Walker M, Wilding JP. 2004** “Rosiglitazone improves insulin sensitivity, glucose tolerance and ambulatory blood pressure in subjects with impaired glucose tolerance” *Diabet Med* 21:415-422
- Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. 1995 May** “Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques” *J Clin Invest.* 95(5):2266-74
- Betts GN, van der Geer P, Komives EA. 2008** “Structural and functional consequences of tyrosine phosphorylation in the LRP1 cytoplasmic domain” *J Biol Chem.* 283(23):15656-64
- Bi W, Huang W, Whitworth DJ, Deng JM, Zhang Z, Behringer RR, de Crombrughe B. 2001 Jun 5** “Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization” *Proc Natl Acad Sci U S A.*;98 (12):6698-703
- Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. 1999.** “Sox9 is required for cartilage formation.” *Nat Genet* 22:85-89
- Bickel PE, Freeman MW. 1992** “Rabbit aortic smooth muscle cells express inducible macrophage scavenger receptor messenger RNA that is absent from endothelial cells” *J Clin Invest.* 90:1450 -1457
- Biedi C, Panetta D, Segat D, Cordera R, Maggi D. 2003 Dec** “Specificity of insulin-like growth factor I and insulin on Shc phosphorylation and Grb2 recruitment in caveolae” *Endocrinology.* 144(12):5497-503
- Birsoy K., Chen Z, Friedman J 2008** “Transcriptional regulation of adipogenesis by KLF4”, *Cell Metab.* 7; 339-347
- Biwa T, Hakamata H, Sakai M, et al. 1998** “Induction of murine macrophage growth by oxidized low density lipoprotein is mediated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor” *J Biol Chem* 273:28305±28313
- Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. 2003** “Adhesion molecules and atherosclerosis” *Atherosclerosis* 170(2):191-203
- Bobryshev YV. 2005 Apr** “Transdifferentiation of smooth muscle cells into chondrocytes in atherosclerotic arteries in situ: implications for diffuse intimal calcification.” *J Pathol.*; 205(5):641-50
- Bobryshev, Y.V., 2005b** “Dendritic cells in atherosclerosis: current status of the problem and clinical relevance” *European Heart Journal* 26 (17), 1700-1704
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, Zlotchenko E, Scrimgeour A, Lawrence JC, Glass DJ, Yancopoulos GD 2001** “Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo” *Nat Cell Biol* 11:1014-1019
- Boney CM, Sekimoto H, Gruppuso PA, Frackelton AR Jr. 2001 Jul** “Src family tyrosine kinases participate in insulin-like growth factor I mitogenic signaling in 3T3-L1 cells” *Cell Growth Differ.* 12(7):379-86

- Boney CM, Gruppuso PA, Faris RA, Frackelton AR Jr. 2000 Jun** "The critical role of Shc in insulin-like growth factor-I-mediated mitogenesis and differentiation in 3T3-L1 preadipocytes" *Mol Endocrinol.* 14(6):805-13
- Bonfini L., Migliaccio E., Pelicci G., Lanfrancone L., Pelicci P. 1996.** "Not all shc's roads lead to ras. *Trends Biochem". Sci.* 21: 257-261
- Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. 1993** "Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions." *J Clin Invest* 91:1800-9
- Botham KM, Bravo E, Elliott J, Wheeler-Jones CP. 2005** "Direct interaction of dietary lipids carried in chylomicron remnants with cells of the artery wall: implications for atherosclerosis development" *Curr Pharm Des.*;11:3681-3695
- Boucher P, Li WP, Matz RL, Takayama Y, Auwerx J, Anderson RG, Herz J. 2007** "LRP1 functions as an atheroprotective integrator of TGFbeta and PDGF signals in the vascular wall: implications for Marfan syndrome". *PLoS ONE.* 16;2(5):e448
- Boucher P, Gotthardt M. 2004** "LRP and PDGF signaling: a pathway to atherosclerosis" *Trends Cardiovasc Med.* 14(2):55-60
- Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J. 2003** "LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis". *Science.* 11; 300 (5617): 329-32
- Boucher P, Liu P, Gotthardt M, Hiesberger T, Anderson RG, Herz J. 2002** "Platelet-derived growth factor mediates tyrosine phosphorylation of the cytoplasmic domain of the low Density lipoprotein receptor-related protein in caveolae". *J Biol Chem.* 3; 277(18): 15507-13
- Boutros M, Paricio N, Strutt DI, Mlodzik M. 1998** "Dishevelled activates JNK and discriminates between JNK pathways in planar polarity and wingless signaling." *Cell.*;94(1):109-18.
- Bradshaw AD, Graves DC, Motamed K, Sage EH 2003** "SPARC-null mice exhibit increased adiposity without significant differences in overall body weight" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(10):6045-50
- Bradshaw AD, Puolakkainen P, Dasgupta J, Davidson JM, Wight TN, Helene Sage E. 2003b** "SPARC-null mice display abnormalities in the dermis characterized by decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength" *J Invest Dermatol.* 120(6):949-55
- Bradshaw A.D., Bassuk J.A., Francki A. and Sage E.H. 2000.** "Expression and purification of recombinant human SPARC produced by baculovirus." *Mol Cell Biol Res Commun* ; 3:345-351
- Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL 2000** "Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans" *Cell* 100:391- 398
- Brown AJ, Mander EL, Gelissen IC, Kritharides L, Dean RT, Jessup W. 2000b.** "Cholesterol and oxysterol metabolism and subcellular distribution in macrophage foam cells. Accumulation of oxidized esters in lysosomes" *J Lipid Res.* 41(2):226-37
- Brown MS, Goldstein JL 1986** "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis" *Science* 232:34- 47

- Bruemmer D., Berger J. P., Liu J., et al., 2003.** "A non-thiazolidinedione partial peroxisome proliferator-activated receptor γ ligand inhibits vascular smooth muscle cell growth," *European Journal of Pharmacology*, vol. 466, no. 3, pp. 225-234
- Bruemmer D., Yin F., Liu J., et al., 2003b** "Peroxisome proliferator-activated receptor γ inhibits expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells," *Molecular Endocrinology*, vol. 17, no. 6, pp. 1005-1018
- Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. 1998** "Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification" *Genes Dev.*;12:1260-1268
- Burger L, Oppenheimer A. 1908** "Bone formation in sclerotic arteries". *J Exp Med.*10:354-367
- Bunting CH. 1906** "The formation of true bone with cellular (red) marrow in a sclerotic aorta" *Journal of Experimental Medicine.* 8:365-376
- Bura-Rivière A. 2006** "Artériopathie calcifiante urémique ou calciphylaxie : un facteur de risque vasculaire indépendant ? " *La Revue de Médecine Interne*, 27(3)181-183
- Byfield SD, Roberts AB. 2004** "Lateral signaling enhances TGF- β response complexity". *Trends Cell Biol.*14 (3): 107-111
- Cabello-Verrugio C, Brandan E. 2007** "A novel modulatory mechanism of transforming growth factor- β signaling through decorin and LRP-1" *J Biol Chem.* 282(26):18842-50
- Caira FC, Stock SR, Gleason TG, McGee EC, Huang J, Bonow RO, Spelsberg TC, McCarthy PM, Rahimtoola SH, Rajamannan NM. 2006** "Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation" *J Am Coll Cardiol.* 47(8):1707-12.
- Campbell JH, Campbell GR. 1994** "The role of smooth muscle cells in atherosclerosis" *Curr Opin Lipidol.*;5:323-330
- Cannon B. and Nedergaard J. 2004** "Brown adipose tissue: Function and physiological significance" *Physiol. Rev.* 84: 277-359.
- Caplan A.I. 2007.** "Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine" *J Cell Physiol.* 213:341-347
- Caplan AI. 1991 Sep** "Mesenchymal stem cells" *J Orthop Res.* 9(5):641-50
- Chappell DA, Inoue I, Fry GL, Pladet MW, Bowen SL, Iverius PH, Lalouel JM, Strickland DK. 1994** "Cellular catabolism of normal very low density lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/ α_2 -macroglobulin receptor is induced by the C-terminal domain of lipoprotein lipase" *J Biol Chem* 269: 18001-18006
- Chappell DA, Fry GL, Waknitz MA, Muhonen LE, Pladet MW, Iverius PH, Strickland DK. 1993** "Lipoprotein lipase induces catabolism of normal triglyceride-rich lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/ α_2 -macroglobulin receptor in vitro. A process facilitated by cell-surface proteoglycans". *J Biol Chem* 268: 14168-14175

- Chen BD-M, Clark CR, Chou DL. 1988** "Granulocyte/macrophage colony stimulating factor stimulates monocyte and tissue macrophage proliferation and enhances their responsiveness to macrophage colony stimulating factor" *Blood* 71:997±1002
- Chen BD-M, Clark CR. 1986** "Interleukin 3 regulates the in vivo proliferation of both blood monocytes and peripheral exudate macrophages: synergism between a macrophage-specific colony-stimulating factor". *J Immunol* 137:563± 570
- Chodakewitz JA, Kupper TS, Coleman DL. 1988** "Keratinocyte-derived granulocyte/macrophage colony-stimulating factor induces DNA synthesis by peritoneal macrophages". *J Immunol* 140:832±836
- Choi HY, Rahmani M, Wong BW, Allahverdian S, McManus BM, Pickering JG, Chan T, Francis GA. 2009** "ATP-binding cassette transporter A1 expression and apolipoprotein A-I binding are impaired in intima-type arterial smooth muscle cells" *Circulation*.119(25):3223-31
- Chun JS, Oh H, Yang S, Park M. 2008** "Wnt signaling in cartilage development and degeneration" *BMB Rep.* 41(7):485-94
- Chung N. S. and Wasan K. M., 2004.** "Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake". *Adv. Drug Deliv.* 56:1315-1334
- Church V., Nohno T., Linker C., Marcelle C. and Francis- West P. 2002** "Wnt regulation of chondrocyte differentiation." *J. Cell. Sci.* 115, 4809-4818
- Clarke M, Bennett M. 2006** "The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability" *Am J Nephrol.* 26(6):531-5
- Clarke SL, Robinson CE, Gimble JM. 1997** "CAAT/enhancer binding proteins directly modulate transcription from the peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter" *Biochem Biophys Res Commun.*;240(1):99-103
- Claus R, Fyrnys B, Deigner HP, Wolf G. 1996** "Oxidized low-density lipoprotein stimulates protein kinase C (PKC) and induces expression of PKC-isotypes via prostaglandin-H-synthase in P388D1 macrophage-like cells" *Biochemistry* 35:4911±4922.
- Clemmons D. R. 2007** "Value of insulin-like growth factor system markers in the assessment of growth hormone status" *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 36, 109-120
- Clemmons DR. 2007b** "Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer" *Nat Rev Drug Discov.* 6:821-833
- Clemmons, D. R. and L. A. Maile 2005** "Interaction between insulin-like growth factor-I receptor and alphaVbeta3 integrin linked signaling pathways: cellular responses to changes in multiple signaling inputs" *Mol Endocrinol* 19(1): 1-11
- Clemmons DR, Horvitz G, Engleman W, Nichols T, Moralez A, Nickols GA. 1999** "Synthetic a'Va^3 antagonists inhibit insulin-like growth factor-I-stimulated smooth muscle cell migration and replication". *Endocrinology*.140:4616-4621
- Clezardin P, Malaval L, Ehrensperger AS, Delmas PD, Dechavanne M, McGregor JL. 1988** "Complex formation of human thrombospondin with osteonectin" *Eur J Biochem.* 175(2):275-84

- Clinton, S.K., Underwood, R., Hayes, L., Sherman, M.L., Kufe, D.W., Libby, P., 1992. "Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis" *American Journal of Pathology* 140 (2), 301-316
- Cobb MH, Goldsmith EJ. 1995 "How MAP kinases are regulated" *J Biol Chem.* 270(25):14843-6
- Collett GDM, Canfield AE. 2005 "Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification". *Circ Res.* 96: 930-938
- Conese M, Nykjaer A, Petersen CM, Cremona O, Pardi R, Andreasen PA, Gliemann J, Christensen EI, Blasi F. 1995 "alpha-2 Macroglobulin receptor/Ldl receptor-related protein(Lrp)-dependent internalization of the urokinase receptor" *J Cell Biol.* 131(6 Pt 1):1609-22
- Corjay MH, Thompson MM, Lynch KR, Owens GK. 1989 "Differential effect of platelet-derived growth factor- versus serum-induced growth on smooth muscle alpha-actin and nonmuscle beta-actin mRNA expression in cultured rat aortic smooth muscle cells". *J Biol Chem.* 264: 10501-10506
- Corvilain B. 1997 "Lipoprotein metabolism" *Rev Med Brux.* 18(1):3-9
- Cosentino F, LuscherTF. 1995 "Maintenance of vascular integrity : role of nitric oxide and other bradykinin mediators" *Eur Heart J* 16 (K): 4-12
- Cowdry EV, Blumenthal HT. *Cowdry's Arteriosclerosis: A Survey of the Problem.* 2nd ed. Springfield, IL: Thomas; 1967
- Craparo A, O'Neill TJ, Gustafson TA. 1995 "Non-SH2 domains within insulin receptor substrate-1 and SHC mediate their phosphotyrosine-dependent interaction with the NPEY motif of the insulin-like growth factor I receptor" *J Biol Chem.* 270(26):15639-43
- Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. 1991 "Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis" *Science.* 251(4995):788-91
- Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, Tangirala R, Fazio S, Linton MF, Funk CD. . 1999 Jun. "Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice". *J Clin Invest* 103(11):1597-604
- Daugherty, A., Webb, N.R., Rateri, D.L., King, V.L., 2005. "Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Cytokine regulation of macrophage functions in atherogenesis" *Journal of Lipid Research* 46 (9), 1812-1822
- Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE. 1998 "Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo" *J Bone Miner Res.* 13: 828-838
- Daumer K. M., Tufan A. C. and Tuan R. S. 2004 "Long-term *in vitro* analysis of limb cartilage development: involvement of Wnt signaling." *J. Cell. Biochem.* 93, 526-541
- Davies JD, Carpenter KLH, Challis IR, Figg NL, McNair R, Proudfoot D, Weissberg PL, Shanahan CM. 2005 "Adipocyte differentiation and liver X receptor pathways regulate the accumulation of triacylglycerols in human vascular smooth muscle cell" *J Biol Chem.* 280: 3911-3919

- Davies M. J., Richardson P. D. and Woolf N., 1993. "Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content". *Br. Heart J.* 69:377-381
- de Blaquièrre GE, May FE, Westley BR. 2009 "Increased expression of both insulin receptor substrates 1 and 2 confers increased sensitivity to IGF-1 stimulated cell migration" *Endocr Relat Cancer.* 16(2):635-47
- DeFail AJ, Chu CR, Izzo N, Marra KG, 2006 Mar "Controlled release of bioactive TGF-beta 1 from microspheres embedded within biodegradable hydrogels." *Biomaterials.* 27(8):1579-85
- Delafontaine P. 1998 "Growth factors and vascular smooth muscle cell growth responses" *Eur Heart J.* 19 Suppl G:G18-22
- Delafontaine P, Ku L. 1997b "Reactive oxygen species stimulate insulin-like growth factor I synthesis in vascular smooth muscle cells" *Cardiovasc Res.* 33:216-222
- Delafontaine P. 1995 "Insulin-like growth factor I and its binding proteins in the cardiovascular system" *Cardiovasc Res.* 30:825-834
- Delafontaine P, Lou H, Alexander RW. 1992 "Regulation of insulin-like growth factor I messenger RNA levels in vascular smooth muscle cells" *Hypertension.* 1991;18:742-747. *Invest.* 90, 439-446
- Delany AM, Kalajzic I, Bradshaw AD, Sage EH, Canalis E. 2003 "Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival" *Endocrinology.* 144(6):2588-96
- Delerive P, Fruchart JC, Staels B. 2001 "Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control" *J Endocrinol.* 169(3):453-9
- Descamps O, Bilheimer D, Herz J. 1993 "Insulin stimulates receptor-mediated uptake of ApoE-enriched lipoproteins and activated α_2 -macroglobulin in adipocytes" *J Biol Chem* 268: 974-981
- Desvergne B., Wahli W. 1999 "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism" *Endocrine Reviews* 20: 649-688
- Dhaliwal B.S., Steinbrecher U.P.- 1999 "Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins". *Clin Chim Acta,* ;286:191-205
- De Dios S. T., Bruemmer D., Dillely R. J., et al., 2003 "Inhibitory activity of clinical thiazolidinedione peroxisome proliferator activating receptor- γ ligands toward internal mammary artery, radial artery, and saphenous vein smooth muscle cell proliferation," *Circulation,* vol. 107, no. 20, pp. 2548-2550
- Doherty TM, Detrano RC. 1994 "Coronary arterial calcification as an active process: A new perspective on an old problem" *Calcif Tissue Int* 54: 224-30
- Dong Y. F., Song do Y., Schwarz E. M., O'Keefe R. J. and Drissi H. 2006 "Wnt induction of chondrocyte hypertrophy through the Runx2 transcription factor." *J. Cell. Physiol.* 208, 77-86

- Dong Y., Drissi H., Chen M., Chen D., Zuscik M. J., Schwarz E. M. and O'Keefe R. J. **2005** "Wnt-mediated regulation of chondrocyte maturation: modulation by TGF-beta." *J. Cell. Biochem.* 95, 1057-1068
- Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJ, Erdmann E, Massi-Benedetti M, Moules IK, Skene AM, Tan MH, Lefebvre PJ, Murray GD, Standl E, Wilcox RG, Wilhelmsen L, Betteridge J, Birkeland K, Golay A, Heine RJ, Koranyi L, Laakso M, Mokan M, Norkus A, Pirags V, Podar T, Scheen A, Scherbaum W, Schernthaner G, Schmitz O, Skrha J, Smith U, Taton J. **2005** "Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitazone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial" *Lancet* 366:1279-1289
- Du J, Brink M, Peng T, Mottironi B, Delafontaine P. **2001** "Thrombin regulates insulin-like growth factor-1 receptor transcription in vascular smooth muscle: characterization of the signaling pathway" *Circ Res.* 88: 1044-1052
- Du, J., Peng, T., Scheidegger, K. J. & Delafontaine, P. **1999** "Angiotensin II activation of insulin-like growth factor 1 receptor transcription is mediated by a tyrosine kinase-dependent redox-sensitive mechanism" *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 2119-2126
- Ducimetière P., Claude J-R., Richard J.-L. **1977** "Contribution relative du cholestérol et des triglycérides sériques dans la prédiction des maladies par athérosclérose coronarienne. Nouvelles données épidémiologiques" *Paroi Artérielle* 4 : 71-80
- Duez H, Staels B. **2008** "Rev-erb alpha gives a time cue to metabolism" *FEBS Lett.* 582(1):19-25
- Dzau V.J., Braun-Dullaeus R.C., **2002**. "Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies." *Nat Med*; 8(11): 1249-56
- Enomoto H., Enomoto-Iwamoto M., Iwamoto M., Nomura S., Himeno M., Kitamura Y., Kishimoto T. and Komori T. **2000** "Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation". *J. Biol. Chem.* 275, 8695-8702
- Espirito Santo SM, Pires NM, Boesten LS, Gerritsen G, Bovenschen N, van Dijk KW, Jukema JW, Princen HM, Bensadoun A, Li WP, Herz J, Havekes LM, van Vlijmen BJ. **2004** May. "Hepatic low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency in mice increases atherosclerosis independent of plasma cholesterol". *Blood.* 15; 103(10):3777-82
- A. **Ettensohn CA, Illies MR, Oliveri P, De Jong DL. 2003** "Alx1, a member of the Cart1/Alx3/Alx4 subfamily of Paired-class homeodomain proteins, is an essential component of the gene network controlling skeletogenic fate specification in the sea urchin embryo". *Development.* 130(13):2917-28
- Etude 4S: 1994** "Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4,444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S)" *Lancet* 344 : 1383-1389
- Ezan J, Leroux L, Barandon L, Dufourcq P, Jaspard B, Moreau C, Allières C, Daret D, Couffignal T, Duplâa C. **2004** Sep 1 "FrzA/sFRP-1, a secreted antagonist of the Wnt-Frizzled pathway, controls vascular cell proliferation in vitro and in vivo" *Cardiovasc Res.* 63(4):731-8
- Faggiotto, Ross R. and Harker L., **1984** "Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation" *Arteriosclerosis* 4 , p. 323

- Faisal A**, el-Shemerly M, Hess D, Nagamine Y **2002** "Serine/threonine phosphorylation of ShcA. Regulation of protein-tyrosine phosphatase-pest binding and involvement in insulin signaling" *J Biol Chem.* 277(33):30144-52
- Fajas L**, Landsberg RL, Huss-Garcia Y, Sardet C, Lees JA, Auwerx J. **2002** "E2Fs regulate adipocyte differentiation" *Dev. Cell* 3; 39-49
- Fanto M**, McNeill H. **2004**. "Planar polarity from flies to vertebrates" *J. Cell Sci.* 117:527-33
- Farb A**, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, Virmani R. **1996** "Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core: A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death" *Circulation* 93:1354-63
- Farrington Rock C**, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE. **2004** "Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes" *Circulation.* 110: 2226-2232
- Farmer SR.** **2008** "Molecular determinants of brown adipocyte formation and function" *Genes Dev.* 22(10):1269-75
- Fath KA**, Alexander RW, Delafontaine P. **1993** "Abdominal coarctation increases insulin-like growth factor-1 mRNA levels in rat aorta" *Circ Res.* 72:271-277
- Febbraio M.**, Hajjar D.P., Silverstein R.L. **2001** "CD36 : a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation and lipid metabolism." *J Clin Invest.* 108:785-791
- Fehérvári Z**, Sakaguchi S. **2004** "CD4+ Tregs and immune control" *J Clin Invest.* 114(9):1209-17
- Ferns GA**, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R **1991** Sep. "Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF". *Science.* 6; 253 (5024): 1129-32
- Floren CH**, Albers JJ, Bierman EL. **1981** "Uptake of chylomicron remnants causes cholesterol accumulation in cultured human arterial smooth muscle cells" *Biochim Biophys Acta.* 663:336 -349
- Fontaine C.**, Dubois G., Duguay Y., Helledie T., Vu-Dac N., Gervois P., Soncin F., Mandrup S., Fruchart J.C., Fruchart-Najib J. and Staels B., **2003** "The orphan nuclear receptor Rev-Erbalpha is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma target gene and promotes PPARgamma-induced adipocyte differentiation" *J. Biol. Chem.* 278 pp. 37672-37680.
- Francki A**, Bradshaw AD, Bassuk JA, Howe CC, Couser WG, Sage EH. **1999** "SPARC regulates the expression of collagen type I and transforming growth factor-beta1 in mesangial cells" *J Biol Chem.* 274(45):32145-52
- Frostegard J**, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. **1999** "Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines" *Atherosclerosis.* 145(1):33-43
- Fu M.** Rao M, Bouras T, Wang C, Wu K, Zhang X, Li Z, Yao TP, Pestell RG. **2005** "Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment" *J. Biol. Chem.* 280; 16934-16941

- Fu M., Zhu X., Wang Q., Zhang J, Song Q, Zheng H, Ogawa W, Du J, Chen YE., 2001 “Platelet-derived growth factor promotes the expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in vascular smooth muscle cells by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway” *Circ Res* 11, p. 1058
- Fujino, T., Asaba, H., Kang, M. J., Ikeda, Y., Sone, H., Takada, S., Kim, D. H., Ioka, R. X., Ono, M., Tomoyori, H., Okubo, M., Murase, T., Kamataki, A., Yamamoto, J., Magoori, K., Takahashi, S., Miyamoto, Y., Oishi, H., Nose, M., Okazaki, M., Usui, S., Imaizumi, K., Yanagisawa, M., Sakai, J., and Yamamoto, T. T. 2003 “Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 229-234
- Fuster V., Badimon L., Badimon J. J., and Chesebro J. H.. 1992. “The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (part I)” *N. Engl. J. Med.* 326: 242-250
- Galetto R., et al. 2001. “Identification of a peroxisome-proliferator-activated-receptor response element in the apolipoprotein E gene control region”. *Biochem. J.* 357:521-527
- Galis Z. S., Sukhova G. K., Lark M. W. and Libby P. 1994. “Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques”. *J. Clin. Invest.* 94:2493-2503
- Gallicchio MA, Kaun C, Wojta J, Binder B, Bach LA. 2003 “Urokinase type plasminogen activator receptor is involved in insulin-like growth factor-induced migration of rhabdomyosarcoma cells in vitro”. *J Cell Physiol.* 197(1):131-8
- Galvan V, Logvinova A, Sperandio S, Ichijo H, Bredesen DE. 2003 “Type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF-IR) signaling inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)” *J Biol Chem.* 278(15):13325-32
- Gaudel C, Grimaldi PA. 2007 “Metabolic Functions of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta/delta in Skeletal Muscle” *PPAR Res* 2007:86394
- Gaur T., Rich L., Lengner C. J., Hussain S., Trevant B., Ayers D., Stein J. L., Bodine P. V., Komm B. S., Stein G. S. and Lian J. B. 2006 “Secreted frizzled related protein 1 regulates Wnt signaling for BMP2 induced chondrocyte differentiation.” *J. Cell. Physiol.* 208, 87-96
- George J, Afek A, Shaish A, Levkovitz H, Bloom N, Cyrus T, Zhao L, Funk CD, Sigal E, Harats D., 2001 “12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice” *Circulation* 104(14):1646-50
- Gesta S., Tseng Y.H., and Kahn C.R. 2007. “Developmental origin of fat: Tracking obesity to its source” *Cell* 131: 242- 256
- Gilde A.J., Fruchart J.C. and Staels B. 2006. “Peroxisome proliferator-activated receptors at the crossroads of obesity, diabetes, and cardiovascular disease” *J. Am. Coll. Cardiol.* 48:A24-A32
- Gilde AJ, van der Lee KA, Willemsen PH, Chinetti G, van der Leij FR, van der Vusse GJ, Staels B, van Bilsen M. 2003 “Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and

PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism” *Circ Res* 92(5): 518-24

Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM. 1990 “Cell proliferation in human coronary arteries” *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4600±4604

Goto JJ, Tanzi RE. J Mol Neurosci. 2002 “The role of the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP1) in Alzheimer’s A beta generation: development of a cell-based model system”. 19(1-2):37-41

Gotthardt M, Trommsdorff M, Nevitt MF, Shelton J, Richardson JA, Stockinger W, Nimpf J, Herz J. 2000 “Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction.”, *J Biol Chem.* 18;275(33):25616-24

Grant, M. B . Wargovich TJ, Ellis EA, Caballero S, Mansour M, Pepine CJ. 1994 “Localization of insulin-like growth factor I and inhibition of coronary smooth muscle cell growth by somatostatin analogues in human coronary smooth muscle cells. A potential treatment for restenosis? ” *Circulation* 89, 1511-1517

Greenwalt D.E., Lipsky R.H. , Ockenhouse C.F. Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. 1992 “Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine” *Blood* 5, p. 1105

Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, Pratt RE, Mulligan RC, Dzau VJ. 2003 “Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy”. *Circulation*.108: 2710-2715

Gruber HE, Sage EH, Norton HJ, Funk S, Ingram J, Hanley EN Jr 2005 “Targeted deletion of the SPARC gene accelerates disc degeneration in the aging mouse”. *J Histochem Cytochem.* 53(9):1131-8

Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ. 1998 “Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice” *Mol Cell.* 2(2):275-81

Guan Y, Zhang Y, Breyer MD. 2002 “The Role of PPARs in the Transcriptional Control of Cellular Processes” *Drug News Perspect.*;15(3):147-154

Guerin M., Le Goff W., Lassel T.S., Van Fol A., Steiner G., Chapman M.J. 2001 “Atherogenic role of elevated CE transfer from HDL to VLDL(1) and dense LDL in type 2 diabetes : impact of the degree of triglyceridemia”. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21 :282-288

Gurnell M, Wentworth JM, Agostini M, Adams M, Collingwood TN, Provenzano C, Browne PO, Rajanayagam O, Burris TP, Schwabe JW, Lazar MA, Chatterjee VK. 2000 “A dominant-negative peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mutant is a constitutive repressor and inhibits PPARgamma-mediated adipogenesis” *J Biol Chem.* 275(8):5754-9

Guzman RJ. 2007 “Clinical, cellular, and molecular aspects of arterial calcification” *J Vasc Surg.* 45 Suppl A:A57-63

Haberstroh U, Zahner G, Disser M, Thaiss F, Wolf G, Stahl RA. 1993 “TGF-beta stimulates rat mesangial cell proliferation in culture: role of PDGF beta-receptor expression”. *Am J Physiol.* 264 (2 Pt 2): F199-205

- Halabi CM, Beyer AM, de Lange WJ, Keen HL, Baumbach GL, Faraci FM, Sigmund CD 2008** “Interference with PPAR gamma function in smooth muscle causes vascular dysfunction and hypertension” *Cell Metab.* 7(3):215-26
- Hall B.K., and Miyake T. 2000.** “All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development.” *Bioessays* 22:138-147
- Hall BK, Miyake T. 1992** “Role of cell condensation in vertebrate skeletogenesis.” *Anat Embryol* 186 : 107-25
- Hamilton JA, Myers D, Jessup W, et al. 1999** “Oxidized LDL can induce macrophage survival, DNA synthesis, and enhanced proliferative response to CSF-1 and GM \pm CSF” *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:98 \pm 105
- Hamilton JA. 1983** “Glucocorticoids and prostaglandins inhibit the induction of macrophage DNA synthesis by macrophage growth factor and phorbol ester” *J Cell Physiol* 115:67 \pm 74
- Hamilton JA, 1981** “Dientsman SR. Induction of macrophage DNA synthesis by phorbol esters” *J Cell Physiol* 106:445 \pm 450
- Hansen JB, Zhang H, Rasmussen TH, Petersen RK, Flindt EN, Kristiansen K. 2001** “PPARdelta-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling” *J Biol Chem* 276:3175 \pm 3182
- Hansmann G, de Jesus Perez VA, Alastalo TP, Alvira CM, Guignabert C, Bekker JM, Schellong S, Urashima T, Wang L, Morrell NW, Rabinovitch M. 2008** “An antiproliferative BMP-2/PPARgamma/apoE axis in human and murine SMCs and its role in pulmonary hypertension”. *J Clin Invest.* 118(5):1846-57
- Hansson G.K. and Libby P., 2006** “The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword.” *Nat Rev Immunol*; 6(7): 508-19
- Hansson GK, Holm J, Jonasson L. 1989** “Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque” *Am J Pathol.* 135(1):169-75
- Hartmann C. and Tabin C. J. 2001** “Wnt-14 plays a pivotal role in inducing synovial joint formation in the developing appendicular skeleton.” *Cell* 104, 341-351
- Hartmann C. and Tabin C. J. 2000** “Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb.” *Development* 127, 3141-3159
- Hashimoto S, Wong H, Blissard D, Anderson D. 1988** “Cholesteryl ester accumulation in smooth muscle cells after uptake of necrotic products from atherosclerotic lesions” *Exp Mol Pathol.* 49(2):196-205.
- Hautmann MB, Madsen CS, Owens GK. 1997** “A transforming growth factor beta (TGFbeta) control element drives TGFbeta-induced stimulation of smooth muscle alpha-actin gene expression in concert with two CarG elements”. *J Biol Chem.* 272:10948 -10956
- Hayry P. Myllärniemi M, Aavik E, Alatalo S, Aho P, Yilmaz S, Räisänen-Sokolowski A, Cozzone G, Jameson BA, Baserga R. 1995** “Stabile D-peptide analog of insulin-like growth factor-1 inhibits smooth muscle cell proliferation after carotid ballooning injury in the rat” *FASEB J.* 9, 1336-1344

- Hedin U, Bottger BA, Luthman J, Johansson S, Thyberg J. 1989** “A substrate of the cell-attachment sequence of fibronectin (Arg-Gly-Asp-Ser) is sufficient to promote transition of arterial smooth muscle cells from a contractile to a synthetic phenotype” *Dev Biol.* 133:489-501
- Heid H. W., Moll R., Schwetlick I., Rackwitz H. R., and Keenan T. W.. 1998** “Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases”. *Cell Tissue Res.* 294: 309-321
- Herz J, Strickland DK 2001** “LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor” *J Clin Invest* 108:779- 784
- Herz J, Clouthier DE, Hammer RE. 1992** “LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation”, *Cell.* 30;71(3):411-21
- Herz J, Kowal RC, Goldstein JL, Brown MS., 1990** “Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment.” *EMBO J.* 9 (6): 1769-76
- Herz J., Hamann U., Rogne S., Myklebost O., Gausepohl H., and Sanley K. K., 1988** “Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor”. *EMBO J.* 7, 4119-4127
- Hofmann SM, Zhou L, Perez-Tilve D, Greer T, Grant E, Wancata L, Thomas A, Pfluger PT, Basford JE, Gilham D, Herz J, Tschop MH, Hui DY. 2007** “Adipocyte LDL receptor-related protein-1 expression modulates postprandial lipid transport and glucose homeostasis in mice” *J Clin Invest* 117: 3271-3282
- Holifield B, Helgason T, Jemelka S, Taylor A, Navran S, Allen J, Seidel C. 1996** “Differentiated vascular myocytes: are they involved in neointimal formation?” *J Clin Invest.* 97(3):814-25
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y 2003** “IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice”. *Nature* 421:182-187
- Hosooka T, Noguchi T, Kotani K, Nakamura T, Sakaue H, Inoue H, Ogawa W, Tobimatsu K, Takazawa K, Sakai M, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yasuda T, Lazar MA, Yamanashi Y, Kasuga M. 2008** “Dok1 mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and obesity through modulation of PPAR-gamma phosphorylation” *Nat Med.* 14(2):188-93
- Hruska KA, Mathew S, Saab G 2005** “Bone morphogenetic proteins in vascular calcification” *Circulation* 97:105-114 10
- Hu L, Boesten LS, May P, Herz J, Bovenschen N, Huisman MV, Berbée JF, Havekes LM, van Vlijmen BJ, Tamsma JT. 2006** “Macrophage low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency enhances atherosclerosis in ApoE/LDLR double knockout mice”. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(12):2710-5
- Huang SS, Huang JS. 2005** “TGF-beta control of cell proliferation” *J Cell Biochem.* 96(3):447-62

- Huang SS, Leal SM, Chen CL, Liu I-H, Huang JS. 2004a.** "Identification of insulin receptor substrate as keymolecule for the Tbr-V/LRP-1 mediates growth inhibition signaling cascade" *FASEB J* 18:1719-1721
- Huang SS, Leal SM, Chen CL, Liu IH, Huang JS. 2004b.** "Cellular growth inhibition by TGF-b1 involves IRS proteins" *FEBS Lett* 565:117-121
- Huang SS, Ling TY, Tseng WF, Huang YH, Tang FM, Leal SM, Huang JS. 2003.** "Cellular growth inhibition by IGFBP-3 and TGF-b1 requires LRP-1" *FASEB J* 17:2068-2081
- Huang H, Virmani R, Younis H, Burke AP, Kamm RD, Lee RT. 2001** "The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques" *Circulation* 103:1051-6
- Hull G. 1998** "Caleb Hillier Parry 1755-1822: a notable provincial physician". *J R Soc Med.*91:335-338
- Huo H, Guo X, Hong S, Jiang M, Liu X, Liao K 2003** "Lipid rafts/caveolae are essential for IGF-1 receptor signaling during 3T3-L1 preadipocyte differentiation induction". *J Biol Chem* 278:11561-11569
- Hurt-Camejo E., Olsson U., Wiklund O., Bondjers G., and Camejo G.. 1997.** "Cellular consequences of the association of apoB lipoproteins with proteoglycans" *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1011-1017
- Hwang S. G., Yu S. S., Lee S. W. and Chun J. S. 2005** "Wnt-3a regulates chondrocyte differentiation via c-Jun/AP-1 pathway." *FEBS Lett.* 579, 4837-4842
- Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR 1993** "Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair" *Mol Biol Cell* 4: 637-645
- Ihn H 2002** "Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF" *Curr Opin Rheumatol* 14: 681-685
- Ijpenberg A., Jeannin E., Wahli W. & Desvergne B. 1997** "Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/ retinoid X receptor heterodimer binding to DNA.Afunctional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element." *J. Biol. Chem.* 272, 20108-20117
- Ikegawa M, Han H, Okamoto A, Matsui R, Tanaka M, Omi N, Miyamae M, Toguchida J, Tashiro K 2008** "Syndactyly and preaxial synpolydactyly in the single Sfrp2 deleted mutant mice" *Dev Dyn.*; 237(9):2506-17
- Ikuno Y, Kazlauskas A 2002** "TGFbeta1-dependent contraction of fibroblasts is mediated by the PDGFalpha receptor" *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 41-46
- Imai T., Takakuwa R., Marchand S., Dentz E., Bornert J.M., Messaddeq N., Wendling O., Mark M., Desvergne B., Wahli W., Chambon P, Metzger D. 2004** "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101:4543-4547
- Imamura M., Inoguchi T., Ikuyama S., Taniguchi S., Kobayashi K., Nakashima N., and Nawata H.. 2002** "ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts". *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 283: E775-E783

- Inada M., Yasui T., Nomura S., Miyake S., Deguchi K., Himeno M., Sato M., Yamagiwa H., Kimura T., Yasui N. et al. **1999** "Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice" *Dev. Dyn.* 214, 279-290
- Ishigami M., Swertfeger D.K., Granholm N.A., and Hui D.Y. **1998** "Apolipoprotein E inhibits platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation by suppressing signal transduction and preventing cell entry to G1 phase". *J. Biol. Chem.* 273:20156-20161
- Enomoto-Iwamoto M., Kitagaki J., Koyama E., Tamamura Y., Wu C., Kanatani N., Koike T., Okada H., Komori T., Yoneda T., Church V., Francis-west P. H., Kurisu K., Nohno T., Pacifici M. and Iwamoto M. **2002** "The Wnt antagonist Frzb-1 regulates chondrocyte maturation and long bone development during limb skeletogenesis." *Dev. Biol.* 251, 142-156
- Izhar U, Hasdai D., Richardson DM, Cohen P, Lerman A. **2000** "Insulin and insulin-like growth factor-I cause vasorelaxation in human vessels in vitro" *Coron Artery Dis* 11: 69-76
- Jawien A, Bowen-Pope DF, Lindner V, Schwartz SM, Clowes AW. **1992** "Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty". *J Clin Invest.* 89 (2): 507-11
- Jehl-Pietri C, Bastie C, Gillot I, Luquet S, Grimaldi PA. **2000** "Peroxisome-proliferator-activated receptor delta mediates the effects of long-chain fatty acids on post-confluent cell proliferation". *Biochem J* 350:93±98
- Jeziorska M, McCollum C, Wooley DE. **1998** "Observations on bone formation and remodeling in advanced atherosclerotic lesions of human carotid arteries" *Virchows Arch.* 433:559-565
- Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. **1986** "Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque" *Arteriosclerosis.* 6(2):131-8
- Jones JI, Prevette T, Gockerman A, Clemmons DR. **1996** "Ligand occupancy of the alpha-V-beta3 integrin is necessary for smooth muscle cells to migrate in response to insulin-like growth factor" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(6):2482-7
- Jones JI, Clemmons DR. **1995** "Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions". *Endocr Rev.* 16:3-34
- Juul A., Scheike T., Davidsen M., Gyllenborg J., Jorgensen T. **2002** "Low serum insulin-like growth factor I is associated with increased risk of ischemic heart disease: a population-based case-control study" *Circulation* 106, 939-944
- Kang S, Bennett CN, Gerin I, Rapp LA, Hankenson KD, Macdougald OA. **2007** "Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma" *J Biol Chem.* 282(19):14515-24
- Kannel W.B., Castelli W.P., Gordon T. et al. **1971** "Serum cholesterol, lipoproteins and the risk of coronary heart disease. The Framingham Study" *Ann. Intern. Med.* 74 : 1-12
- Karaplis A. C., Luz A., Glowacki J., Bronson R. T., Tybulewicz V. L., Kronenberg H. M. and Mulligan R. C. **1994**. "Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene." *Genes Dev.* 8, 277-289

- Karp SJ, Schipani E, St-Jacques B, Hunzelman J, Kronenberg H, McMahon AP 2000** "Indian hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and -independent pathway" *Development*; 127 (3):543-8
- Kawachi, S., N. Takeda, et al. 2005** "Circulating insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3 are associated with early carotid atherosclerosis" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(3): 617-21
- Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. 2001** "Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia". *Circulation*. 103:634-637
- Kawano Y, Kypta R 2003** "Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway" *J Cell Sci*.116(Pt 13):2627-34
- Kawata K, Eguchi T, Kubota S, Kawaki H, Oka M, Minagi S, Takigawa M. 2006** "Possible role of LRP1, a CCN2 receptor, in chondrocytes" *Biochem Biophys Res Commun*. 345(2):552-9
- Keys A. 1975** "Coronary Heart Disease. The global picture. Atherosclerosis" 22 : 149-192
- Khorsandi M., Fagin J. A., Fishbein M. C., Forrester J. S., Cercek B. 1992** "Effects of hypophysectomy on vascular insulin-like growth factor-I gene expression after balloon denudation in rats" *Atherosclerosis* 93 115-122
- Kim J, Han DC, Kim JM, Lee SY, Kim SJ, Woo JR, Lee JW, Jung SK, Yoon KS, Cheon HG, Kim SS, Hong SH, Kwon BM. 2009** "PPAR gamma partial agonist, KR-62776, inhibits adipocyte differentiation via activation of ERK" *Cell Mol Life Sci*. 66(10):1766-81
- Kim D J , Bility M T , Billin A N , Willson T M , Gonzalez F J and Peters J M . 2006** "PPAR β/δ selectively induces differentiation and inhibits cell proliferation" *Cell Death and Differentiation* 13, 53-60
- Kim JE, Chen J. 2004** "regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis" *Diabetes*. 53(11):2748-56
- Kim B, Cheng HL, Margolis B, Feldman EL 1998** "Insulin receptor substrate 2 and Shc play different roles in insulin-like growth factor I signaling". *J Biol Chem* 273:34543-34550
- Kirstein, M., Aston, C., Hintz, R. & Vlassara, H. 1992** "Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J. Clin. Invest.* 90, 439-446
- Kirton JP, Crofts NJ, George SJ, Brennan K, Canfield AE. 2007** "Wnt/beta-catenin signaling stimulates chondrogenic and inhibits adipogenic differentiation of pericytes: potential relevance to vascular disease?" *Circ Res*.101(6):581-9
- Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. 1997** "Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma" *Proc Natl Acad Sci U S A.*;94(9):4318-23

- Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. 1995** “A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation” *Cell*. 83(5):813-9
- klouche M., Rose-John S., Schmiedt W. and Bhakdi S., 2000** “Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation” *Circulation* 15, p. 1799
- Kobayashi T, Soegiarto DW, Yang Y, Lanske B, Schipani E, McMahon AP, Kronenberg HM. 2005** “Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP” *J Clin Invest*. 115(7):1734-42
- Kohn AD, Moon RT. 2005** “Wnt and calcium signalling: beta-catenin independent pathways” *Cell Calcium*. 38(3-4):439-46.
- Kolodgie FD, Narula J, Haider N, Virmani R. 2001** “Apoptosis in atherosclerosis. Does it contribute to plaque instability?” *Cardiol Clin*. 19(1):127-39, ix
- Kounnas MZ, Moir RD, Rebeck GW, Bush AI, Argraves WS, Tanzi RE, Hyman BT, Strickland DK. 1995 Jul** “LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation.” *Cell*. 28;82(2):331-40
- Kowal RC, Herz J. Goldstein J.L., Esser V., Brown M.S., 1989,** “Low density lipoprotein receptor- related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoprotein.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86, 5810-5814
- Krauss RM. 1998** “Triglycerides and atherogenic lipoproteins: rationale for lipid management” *Am J Med*. 105(1A):58S-62S
- Krauss R.M., 1994** “Heterogeneity of plasma low-density lipoproteins and atherosclerosis risk”. *Curr Opin Lipidol*. 5:339-149
- Kretzschmar M, Massague J 1998** “SMADs: mediators and regulators of TGFbeta signaling” *Curr Opin Genet Dev* 8: 103-111
- Krueger RC, Fields TA, Hildreth J, Schwartz NB 1990** “Chick cartilage chondroitin sulfate proteoglycan core protein. I. Generation and characterization of peptides and specificity for glycosaminoglycan attachment” *J Biol Chem* 265:12075-12087
- Ku DN, Giddens DP. 1983** “Pulsatile flow in a model carotid bifurcation” *Arteriosclerosis* 3: 31-9
- Kühl M. 2004** “The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements.” *Front Biosci.*;9:967-74
- Kulik G, Klippel A, Weber MJ. 1997** “Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor I receptor, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt”. *Mol Cell Biol*. 17(3):1595-606
- B. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr 1992** “Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells” *J Clin Invest*. 90(3):1138-44
- Lai KM, Pawson T. 2000** “The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo” *Genes Dev*. 14(9):1132-45

- Langlois B, Emonard H, Martiny L, Dedieu S., 2009** "Multiple involvements of LRP-1 receptor in tumor progression" *Pathol Biol* (Paris)
- Lanske B., Karaplis A. C., Lee K., Luz A., Vortkamp A., Pirro A., Karperien M., Defize L. H. K., Ho C., Mulligan R. C. et al. 1996.** "PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth." *Science* 273, 663-666
- Latronico MVG, Costinean S, Lavitrano ML, Peschle C, Condorelli G. 2004** "Regulation of cell size and contractile function by AKT in cardiomyocytes" *Ann NY Acad Sci* 1015:250-260
- Leal SM, Huang SS, Huang JS. 1999** "Interactions of high affinity insulin-like growth factor-binding proteins with the type V transforming growth factor-b receptor in mink lung epithelial cells" *J Biol Chem* 274:6711- 6717
- Leal SM, Liu Q, Huang SS, Huang JS. 1997** "The type V transforming growth factor b receptor is the putative insulin-like growth factor-binding protein 3 receptor" *J Biol Chem* 272:20572-20576
- Lee R. T. and Libby, P. 1997** "The unstable atheroma". *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17 :1859-1867
- Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. 1998** "A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene" *EMBO J.* 17(19):5718-33
- Lehti K, Rose NF, Valavaara S, Weiss SJ, Keski-Oja J. 2009** "MT1-MMP promotes vascular smooth muscle dedifferentiation through LRP1 processing" *J Cell Sci.* 122(Pt 1):126-35
- Le Roith D. 2003** "The insulin-like growth factor system" *Exp Diabesity Res.* 4(4):205-12
- Le Roith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT Jr. 1995** "Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor" *Endocr Rev.* 16:143-163
- Levine AJ, Feng Z, Mak TW, You H, Jin S. 2006** "Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways" *Genes Dev.* 1;20(3):267-75
- Lewis DA, Travers JB, Spandau DF. 2009** "A new paradigm for the role of aging in the development of skin cancer" *J Invest Dermatol.* 129(3):787-91
- Li D, Zhang C, Song F, Lubenec I, Tian Y, Song QH. 2009** "VEGF regulates FGF-2 and TGF-beta1 expression in injury endothelial cells and mediates smooth muscle cells proliferation and migration" *Microvasc Res.* 77(2):134-42
- Li M, Chiou KR, Kass DA. 2007** "Shear stress inhibition of H₂O₂ induced p66(Shc) phosphorylation by ASK1-JNK inactivation in endothelium" *Heart Vessels* 22(6):423-7
- Li X, Van Putten V, Zarinetchi F, Nicks ME, Thaler S, Heasley LE, Nemenoff RA. 1997** "Suppression of smooth-muscle alpha-actin expression by platelet-derived growth factor in vascular smooth-muscle cells involves Ras and cytosolic phospholipase A₂". *Biochem J.* 327(Pt):709 -716
- Li S, Couet J, Lisanti MP 1996** "Src tyrosine kinases, G_s subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases" *J Biol Chem* 271:29182-29190

- Li H, Freeman MW, Libby P. **1995** "Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines" *J Clin Invest.* 95:122-133
- Libby P. **2002** "Inflammation in atherosclerosis" *Nature.* 420(6917):868-74
- Lieskovska J, Ling Y, Badley-Clarke J, Clemmons DR. **2006** "The role of Src kinase in insulin-like growth factor-dependent mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells" *J Biol Chem.* 281(35):25041-53.
- Lim HJ, Lee S, Lee KS, Park JH, Jang Y, Lee EJ, Park HY. **2006** "PPARgamma activation induces CD36 expression and stimulates foam cell like changes in rVSMCs" *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 80:165-174
- Ling Y., Maile L. A., Lieskovska J., Badley-Clarke J., and Clemmons D. R. **2005** "Role of SHPS-1 in the regulation of insulin-like growth factor I-stimulated Shc and mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells" *Mol. Biol. Cell* 16, 3353-3364
- LIPID: **1985** "Consensus conference : lowering blood cholesterol ta prevent heart disease" *JAMA* 253 : 2080-2086
- Liu J, Wang H, Zuo Y, Farmer SR. **2006** "Functional interaction between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin" *Mol Cell Biol.* 26(15):5827-37
- Liu J, Farmer SR. **2004** "Regulating the balance between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and beta-catenin signaling during adipogenesis. A glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation-defective mutant of beta-catenin inhibits expression of a subset of adipogenic genes" *J Biol Chem.* 279(43):45020-7
- Liu T, DeCostanzo AJ, Liu X, Wang H, Hallagan S, et al. **2001** "G protein signaling from activated rat frizzled-1 to the beta-catenin-Lef-Tcf pathway" *Science* 292:1718-22
- Liu Q, Huang SS, Huang JS **1997** "Function of the type V transforming growth factor beta receptor in transforming growth factor beta-induced growth inhibition of mink lung epithelial cells" *J Biol Chem* 272: 18891-18895
- Lobstein JGCFM. **1833** "*Traites d'Anatomie Pathologique*" Paris France ; Chez F. G. Levrault 533-534.
- Logan M., Martin J.F., Nagy A., Lobe C., Olson E.N., and Tabin C.J. **2002** "Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prxl enhancer" *Genesis* 33:77-80
- Longo KA, Wright WS, Kang S, Gerin I, Chiang SH, Lucas PC, Opp MR, MacDougald OA. **2004** "Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues" *J Biol Chem.*;279(34):35503-9
- Llorente-Corte´s V., Royo T., Otero-Vin~as M., Berrozpe M., and Badimon L.. **2007a.** "Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein (LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages" *Cardiovasc. Res.* 74: 526-536

- Llorente-Cortés V, Royo T, Juan-Babot O, Badimon L. 2007b** “Adipocyte differentiation-related protein is induced by LRP1-mediated aggregated LDL internalization in human vascular smooth muscle cells and macrophages” *J Lipid Res.* 48(10):2133-40
- Llorente-Cortés V., Otero-Vin˜as M., Camino-Lo´pez S., Costales P., and Badimon L.. 2006** “Cholesteryl esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in human vascular smooth muscle cells” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26: 117-123
- Llorente-Cortés V., Otero-Vin˜as M., Hurt-Camejo E., Martı´nez- Gonza´lez J., and Badimon L.. 2002a** “Human coronary smooth muscle cells internalize versican-modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors”. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 387-393
- Llorente-Cortés V., Otero-Vin˜as M., and Badimon L.. 2002b** “Differential role of heparan sulfate proteoglycans on aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells and mouse embryonic fibroblasts”. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22: 1905-1911
- Llorente-Cortés V., Martı´nez-Gonza´lez J., and Badimon L.. 2000.** “LDL receptor-related protein mediates uptake of aggregated LDL in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1572-1579
- Loukinova E, Ranganathan S, Kuznetsov S, Gorlatova N, Migliorini MM, Loukinov D, Ulery PG, Mikhailenko I, Lawrence DA, Strickland DK. 2002** “Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF”. *J Biol Chem.* 3; 277 (18):15499-506
- Luft FC. 1998** “Molecular genetics of human hypertension” *J Hypertens.* 16(12 Pt 2):1871-8
- Luo G., Ducey P., McKee M.D., Pinero G.J., Loyer E., Behringer R.R., and Karsenty G. 1997** “Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein.” *Nature* 386:78-81
- Luo G, D’Souza R, Hogue D 1995** “The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development.” *J Bone Min Res.* 10 : 325-34
- Luoma J, Hiltunen T, Sarkioja T, et al.: 1994** “Expression of alpha 2-macroglobulin receptor/ low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions” *J Clin Invest* 93: 2014- 2021
- Lusis A. J. 2000** “Atherosclerosis.” *Nature*; 407(6801): 233-41
- Luzi L, Confalonieri S, Di Fiore PP, Pelicci PG. 2000** “Evolution of Shc functions from nematode to human”. *Curr Opin Genet Dev* 10: 668-674
- Luyten FP, Hascall VC, Nissley SP, Morales TI, Reddi AH. 1988** “Insulin-like growth factors maintain steady-state metabolism of proteoglycans in bovine articular cartilage explants. *Arch Biochem Biophys.* 267(2):416-25
- Maggi D, Biedi C, Segat D, Barbero D, Panetta D, Cordera R 2002** “IGF-I induces caveolin 1 tyrosine phosphorylation and translocation in the lipid rafts”. *Biochem Biophys Res Commun* 295:1085-1089
- Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. 1984** “Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function” *J Lipid Res.* 25(12):1277-94

- Maile LA, Clemmons DR. 2002** "Regulation of insulin-like growth factor I receptor dephosphorylation by SHPS-1 and the tyrosine phosphatase SHP-2" *J Biol Chem.* 277:8955-8960
- Mak KK, Kronenberg HM, Chuang PT, Mackem S, Yang Y. 2008** "Indian hedgehog signals independently of PTHrP to promote chondrocyte hypertrophy." *Development.* 135(11):1947-56
- Mandrup S, Lane MD. 1997** "Regulating adipogenesis" *J Biol Chem.* 272(9):5367-70
- Mann K, Deutzmann R, Paulsson M, Timpl R. 1987** "Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents and evidence for its identity with osteonectin and SPARC" *FEBS Lett.* 218(1):167-72
- Marchand F. 1904** "Über arteriosklerose. *Verhandlung des Congresses fur innere Medizin*" 21:23-59
- Martens JS, Lougheed M, Gomez-Munoz A, Steinbrecher UP. 1999** "A modification of apolipoprotein B accounts for most of the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein" *J Biol Chem.* 274:10903±10910
- Martens JS, Reiner NE, Herrena-Velit P, Steinbrecher UP. 1998** "Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein" *J Biol Chem.* 273:4915±4920
- Martin I, Vunjak-Novakovic G, Yang J, Langer R, Freed LE. 1999** "Mammalian chondrocytes expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue" *Exp Cell Res.* 253(2):681-8
- Martin I, Muraglia A, Campanile G, Cancedda R, Quarto R. 1997** "Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow." *Endocrinology.*;138(10):4456-62
- Marx N.N., Duez H.H., Fruchart J.C., and Staels B.B. 2004** "Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells" *Circ. Res.* 94:1168-1178
- Marx N., Sukhova G., Murphy C., Libby P. and Plutzky J., 1998** "Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro" *Am J Pathol.* 1, p. 17
- Matsumoto K, Hirano K, Nozaki S, Takamoto A, Nishida M, Nakagawa-Toyama Y, Janabi MY, Ohya T, Yamashita S, Matsuzawa Y. 2000** "Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype in vitro, and its implication in atherogenesis" *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:1027-1032
- Matsumura T, Sakai M, Kobori S, et al. 1997** "Two intracellular signaling pathways for activation of protein kinase C are involved in oxidized low density lipoprotein-induced macrophage growth" *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:3013±3020

- May P, Woldt E, Matz RL, Boucher P. 2007** “The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions” *Ann Med.* 39(3):219-28
- May P, Rohlmann A, Bock HH, Zurhove K, Marth JD, Schomburg ED, Noebels JL, Beffert U, Sweatt JD, Weeber EJ, Herz J. 2004** “Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice” *Mol Cell Biol.* 24(20):8872-83
- May P, Bock HH, Herz J 2003** “Integration of endocytosis and signal transduction by lipoprotein receptors” *Sci STKE.* (176):PE12
- McMullen JR, Shioi T, Huang W-Y, Zhang L, Tarnavski O, Bisping E, Schinke M, Kong S, Sherwood MC, Brown J, Riggi L, Kang PM, Izumo S. 2004** “The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110a) pathway” *J Biol Chem* 279:4782-4793
- Mehta D, Malik A 2006** “Signaling mechanisms regulating endothelial permeability.” *Physiol Rev;* 86:279-367
- Merkel M, Kako Y, Radner H, Cho IS, Ramasamy R, Brunzell JD, Goldberg IJ, Breslow JL. 1998** “Catalytically inactive lipoprotein lipase expression in muscle of transgenic mice increases very low density lipoprotein uptake: direct evidence that lipoprotein lipase bridging occurs in vivo” *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13841-13846
- Mermelstein, C. S., Portilho, D. M., Mendes, F. A., Costa, M. L., and Abreu, J. G. 2007** “Wnt/beta-catenin pathway activation and myogenic differentiation are induced by cholesterol depletion” *Differentiation* 75, 184-192
- Messai H, Duchossoy Y, Khatib AM, Panasyuk A, Mitrovic DR. 2000** “Articular chondrocytes from aging rats respond poorly to insulin-like growth factor-1: an altered signaling pathway” *Mech Ageing Dev.* 115(1-2):21-37
- Mestas J, Ley K. 2008** “Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis” *Trends Cardiovasc Med.* 18(6):228-32
- Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP, Lanfrancone L, Pelicci PG. 1999** “The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals” *Nature.* 402(6759):309-13
- Migliaccio E., Mele S., Salcini A.E., Pelicci G., Lai K., Superti F.G., Pawson T., Di F.P., Lanfrancone L., Pelicci P.G. 1997** “Opposite effects of the p52^{shc}/p46^{shc} and p66^{shc} splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase -fos signalling pathway” *EMBO J.* 16: 706-716
- Miller JR, Moon RT. 1996** “Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis.” *Genes Dev.* 10 (20):2527-39.
- Miyake S, Mullane-Robinson KP, Lill NL, Douillard P, Band H. 1999** “Cbl-mediated negative regulation of platelet-derived growth factor receptor-dependent cell proliferation. A critical role for Cbl tyrosine kinase-binding domain”. *J Biol Chem.* 4; 274 (23): 16619-28
- Mlodzik M. 2002** “Planar cell polarization: Do the same mechanisms regulate *Drosophila* tissue polarity and vertebrate gastrulation?” *Trends Genet.* 18:564-71

- Mody N, Tintut Y, Radcliff K, Demer LL. 2003** "Vascular calcification and its relation to bone calcification: possible underlying mechanisms" *J Nucl Cardiol* 10:177-83
- Moe SM, O'Neill KD, Duan D, Ahmed S, Chen NX, Leapman SB, Fineberg N, Kopecky K. 2002** "Medial artery calcification in ESRD patients is associated with deposition of bone matrix proteins" *Kidney Int.* 61: 638-647.
- Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. 1992** "Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues." *Cell Tissue Res.* 269 (3): 375-82
- Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park BH, Liu J, Farmer SR. 2003** "Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis" *Biochem J.*;376(Pt 3):607-13
- Mori T. et al., 2005** "Role of Kruppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis" *J. Biol. Chem.* 280; 12867-12875
- Morita S., Kawabe M., Sakurai A., Okuhira K., Vertut-Doi A, Nakano M., and Handa T.. 2004** "Ceramide and lipid particles enhance heparan sulfate proteoglycans and low density lipoprotein receptor-related protein-mediated uptake by macrophages" *J. Biol. Chem.* 279: 24355-24361
- Moscatello, D. K., Santra, M., Mann, D. M., McQuillan, D. J., Wong, A. J., and Iozzo, R. V. 1998** "Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor" *J. Clin. Investig.* 15, 406-412
- Mosse PR, Campbell GR, Wang ZL, Campbell JH. 1985** "Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. I. Comparison of cells from diffuse intimal thickenings adjacent to atheromatous plaques with those of the media". *Lab Invest.* 53:556 -562
- Motamed K, Funk SE, Koyama H, Ross R, Raines EW, Sage EH. 2002** "Inhibition of PDGF-stimulated and matrix-mediated proliferation of human vascular smooth muscle cells by SPARC is independent of changes in cell shape or cyclin-dependent kinase inhibitors" *J Cell Biochem.* 84(4):759-71
- Mothe-Satney I, Gautier N, Hinault C, Lawrence JC Jr, Van Obberghen E. 2004** "In rat hepatocytes glucagon increases mammalian target of rapamycin phosphorylation on serine 2448 but antagonizes the phosphorylation of its downstream targets induced by insulin and amino acids" *J Biol Chem.* 279(41):42628-37
- MRFIT 1982** "Multiple Risk Factors Intervention trial research Group. Risk factors changes and mortality results" *JAMA* 248 : 1465-1477
- Murray R, Granner D., Mayes P, Rodwell V., et al. 2003** "Harper's Illustrated Biochemistry" *Twenty-Sixth Edition by The McGraw-Hill Companies* (25) 205-217
- Nabel EG, Yang Z, Liptay S, San H, Gordon D, Haudenschild CC, Nabel GJ. 1993** "Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induce intimal hyperplasia in vivo". *J Clin Invest.* 91 (4): 1822-9
- Nagao S, Murao K, Imachi H, Cao WM, Yu X, Li J, Matsumoto K, Nishiuchi T, Ahmed RA, Wong NC, Ueda K, Ishida T. 2006** "Platelet derived growth factor regulates ABCA1 expression in vascular smooth muscle cells" *FEBS Lett.* 580:4371- 4376

- Nakamura T, Muraoka S, Sanokawa R, Mori N.** N-Shc and Sck two neuronally expressed Shc adapter homologs. **1998** "Their differential regional expression in the brain and roles in neurotrophin and Src signaling". *J Biol Chem*; 273: 6960-6967
- Narayan S, Roy D.** **2003** "Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers" *Mol Cancer*. 12; 2:41
- Newton CS, Loukinova E, Mikhailenko I, Ranganathan S, Gao Y, Haudenschild C, Strickland DK** **2005** "Platelet-derived growth factor receptor-beta (PDGFR-beta) activation promotes its association with the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for co-receptor function". *J Biol Chem*. 29; 280(30): 27872-8
- Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E, Bell DM, Tam PP, Cheah KS, Koopman P.** **1997** "SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse." *Dev Biol*. 183(1):108-21
- Nichols TC, Busby WH Jr, Merricks E, Sipos J, Rowland M, Sitko K, Clemmons DR.** **2007** "Protease-resistant insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 inhibits IGF-I actions and neointimal expansion in a porcine model of neointimal hyperplasia" *Endocrinology*. 148(10):5002-10
- Nie J, Sage EH.** **2009** "SPARC inhibits adipogenesis by its enhancement of beta-catenin signaling". *J Biol Chem*. 284(2):1279-90
- Nigon F., Lesnik P., Rouis M., Chapman M.J.** **1991** "Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor". *J Lipid Res*, 32:1741-1753
- Nkjaer A, Bengtsson-Olivecrona G, Lookene A, Moestrup SK, Petersen CM, Weber W, Beisiegel U, Gliemann J.** **1993** "The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds lipoprotein lipase and beta-migrating very low density lipoprotein associated with the lipase" *J Biol Chem* 268: 15048-15055
- Nozaki S., Kashiwagi H. , Yamashita S. Nakagawa T, Kostner B, Tomiyama Y, Nakata A, Ishigami M, Miyagawa J, Kameda-Takemura K.,** **1995** "Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects" *J Clin Invest* 4, p. 1859
- Oberfield JL, Collins JL, Holmes CP, Goreham DM, Cooper JP, Cobb JE, Lenhard JM, Hull-Ryde EA, Mohr CP, Blanchard SG, Parks DJ, Moore LB, Lehmann JM, Plunket K, Miller AB, Milburn MV, Kliewer SA, Willson TM.** **1999** "A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25;96(11):6102-6
- Oh SH, Lee OH, Schroeder CP, Oh YW, Ke S, Cha HJ, Park RW, Onn A, Herbst RS, Li C, Lee HY.** **2006** "Antimetastatic activity of insulin-like growth factor binding protein-3 in lung cancer is mediated by insulin-like growth factor-independent urokinase-type plasminogen activator inhibition" *Mol Cancer Ther*. 5:2685-2695
- Ohtani K., Iwanaga R., Nakamura M., et al.,** **1999** "Cell growth regulated expression of mammalian MCM5 and MCM6 genes mediated by the transcription factor E2F," *Oncogene*, vol. 18, no. 14, pp. 2299-2309

- Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Tsushima K, Shindo T, Fujiu K, Nishimura G, Maemura K, Yamauchi T, Kubota N, Suzuki R, Kitamura T, Akira S, Kadowaki T, Nagai R. 2005 "Kruppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation" *Cell Metab.* 1; 27-39
- Ornitz, D.M., Itoh, N. 2001 "Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2: 1-12
- Ovchinnikov, D.A., Deng, J.M., Ogunrinu, G., and Behringer, R.R. 2000 "Col2a1- directed expression of Cre recombinase in differentiating chondrocytes in transgenic mice". *Genesis* 26:145-146
- Overton CD, Yancey PG, Major AS, Linton MF, Fazio S. 2007 "Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse.". *Circ Res.* 16;100(5):670-7
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. 2004 "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease" *Physiol Rev.* 84:767- 801
- Owens GK. 1995 "Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells" *Physiol Rev.* 75:487-517
- Packard CJ. 1999 Understanding coronary heart disease as a consequence of defective regulation of apolipoprotein B metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 10(3):237-44
- Pagnotto MR, Wang Z, Karpie JC, Ferretti M, Xiao X, Chu CR. 2007 "Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor-beta1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair." *Gene Ther.* 14(10):804-13
- Pelicci G, Dente L, De Giuseppe A 1996 "A family of Shc related proteins with conserved PTB, CH1 and SH2 regions. *Oncogene* 13: 633-641
- Pelicci G., Lanfrancone L., Grignani F., McGlade J., Cavallo F., Forni G., Nicoletti I., Grignani F., Pawson T., Pelicci P.G. 1992 "A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction" *Cell.* 70: 93-104
- Picard F, Auwerx J. 2002 "PPAR (gamma) and glucose homeostasis" *Annu Rev Nutr.*;22:167-97
- Pidkovka NA, Cherepanova OA, Yoshida T, Alexander MR, Deaton RA, Thomas JA, Leitinger N, Owens GK. 2007 "Oxidized phospholipids induce phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro" *Circ Res.* 101:792- 801
- Piqueras L, Sanz MJ, Perretti M, Morcillo E, Norling L, Mitchell JA, Li Y, Bishop-Bailey D. 2009 "Activation of PPARbeta/delta inhibits leukocyte recruitment, cell adhesion molecule expression, and chemokine release" *J Leukoc Biol.* Jul;86(1):115-22
- Platt N., Gordon S. 2001 "Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? The mouse's tale". *J Clin Invest.* 108: 649-654
- Podar K, Tai YT, Cole CE, Hideshima T, Sattler M, Hamblin A, Mitsiades N, Schlossman R, Davies FE, Morgan GJ, Munshi NC, Chauhan D, Anderson KC 2002 "Essential role of caveolae in IL-6 and IGF-I-triggered Akt-1-mediated survival of multiple myeloma cells". *J Biol Chem* 278:5794-5801
- Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. 2004 "Insulin-like growth factors and neoplasia" *Nat Rev Cancer.* 4(7):505-18

- Porse** B.T, Pedersen TA, Xu X, Lindberg B, Wewer UM, Friis-Hansen L, Nerlov C. **2001** "E2F repression by C/EBP α is required for adipogenesis and granulopoiesis *in vivo*", *Cell* 107;247-258
- Purdom** S, Chen QM. **2003** "p66(Shc): at the crossroad of oxidative stress and the genetics of aging" *Trends Mol Med* 9(5):206-10
- Rader** DJ, Puré E. **2005** "Lipoproteins, macrophage function, and atherosclerosis: beyond the foam cell?" *Cell Metab.* 1(4):223-30
- Raggatt** LJ, Jefcoat SC Jr, Choudhury I, Williams S, Tiku M, Partridge NC. **2006** "Matrix metalloproteinase-13 influences ERK signalling in articular rabbit chondrocytes" *Osteoarthritis Cartilage.* 14(7):680-9
- Rahaman** SO, Lennon DJ, Febbraio M, Podrez EA, Hazen SL, Silverstein RL. **2006** "CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation" *Cell Metab.* 4(3):211-21
- Raines** EW. **2004** "PDGF and cardiovascular disease". *Cytokine Growth Factor Rev.* 15(4): 237-54
- Raines** EW, Ross R. **1993** "Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis" *Br Heart J.* 69 (1 Suppl):S30-7
- Raines** E.W., Lane T.F., Iruela-Arispe M.L., Ross R., Sage E.H., **1992** "The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor β PDGF- β and - β B and inhibits the binding of PDGF to its receptors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1281_1285
- Rajavashisth** TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. **1990** "Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins" *Nature.* 344(6263):254-7
- Ravichandran** K.S. **2001** "Signaling via Shc family adapter proteins" *Oncogene.* 20: 6322-6330
- Rawadi** G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S **2003** "BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop" *J Bone Miner Res* 18:1842-1853
- Reiss** AB, Vagell ME. **2006** "PPAR γ activity in the vessel wall: anti-atherogenic properties" *Curr Med Chem.*13(26):3227-38
- Rennenberg** Roger J M W , Schurgers L J , Vermeer C, Scholte JB J , Houben A, Leeuw and Kroon A A . **2008** "Renal Handling of Matrix Gla-Protein in Humans with Moderate to Severe Hypertension" *Hypertens Research* 31, 1745-1751
- Reubinoff** BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. **2000** "Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*" *Nat. Biotechnol.* 18(4):399-404
- Reusch** P, Wagdy H, Reusch R, Wilson E, Ives HE. **1996** "Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells" *Circ Res.* 79:1046 -1053

- Ricote M., Huang J. and Fajas L. *et al.*, **1998** "Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein" *Proc Natl Acad Sci USA* 13, p. 7614
- Ricote M., Li A.C., Willson T.M., Kelly C.J. and Glass C.K., **1998b** "The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation" *Nature* 662, p. 79
- Riedemann, J. & Macaulay, V. M. **2006** "IGF1R signalling and its inhibition" *Endocr. Relat. Cancer* 1, 533-543
- Rieusset J, Seydoux J, Anghel SI, Escher P, Michalik L, Soon Tan N, Metzger D, Chambon P, Wahli W, Desvergne B. **2004** "Altered growth in male peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterozygous mice: involvement of PPARgamma in a negative feedback regulation of growth hormone action" *Mol Endocrinol.* 18(10):2363-77
- Roberts AB. **1998** "Molecular and cell biology of TGF-beta". *Miner Electrolyte Metab.* 24 :111-119
- Rodgers GM. **1988** "Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells" *FASEB J.* 2(2):116-23
- Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Hammer RE, Herz J. **1998** "Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants". *J Clin Invest.* 101:689-695
- Rohlmann A., Gotthardt M., Willnow T.E., Hammer R.H. and Herz J. **1996** "Sustained somatic gene inactivation by viral transfer of Cre recombinase." *Nat. Biotech.* 14:1562-1565
- Rong J.X., Shapiro M., Trogan E. and Fisher E.A., **2003** "Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading" *Proc Natl Acad Sci USA* 23, p. 13531
- Rosen ED, MacDougald OA. **2006** "Adipocyte differentiation from the inside out" *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(12):885-96.
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. **1999** "PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro" *Mol Cell.*;4(4):611-7
- Rosenfeld M.E., Yla-Herttuala S., Lipton B.A., Ord V.A., Witztum J.L., Steinberg D., **1992** "Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans" *American Journal of Pathology* 140 (2), 291-300
- Rosenfeld ME, Ross R. **1990** "Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fatfed rabbits" *Arteriosclerosis* 10:680±687
- Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA. **2000** "Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling" *Science.* 289(5481):950-3.
- Ross R.N. **1999** "Mechanisms of Disease: Atherosclerosis-An Inflammatory Disease." *N Engl. J. Med.* 340:115-126

- Ross R. 1993 "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." *Nature* 3; 62(6423): 801-9
- Ross R., 1986 "The pathogenesis of atherosclerosis—an update" *N Engl J Med* 8 p. 488
- Rotllant J, Liu D, Yan YL, Postlethwait JH, Westerfield M, Du SJ. 2008 "Sparc (Osteonectin) functions in morphogenesis of the pharyngeal skeleton and inner ear" *Matrix Biol.* 27(6):561-72
- Ruan XZ, Moorhead JF, Tao JL, Ma KL, Wheeler DC, Powis SH, Varghese Z. 2006 "Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines" *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1150 -1155
- Rudnicki J. A. and Brown A. M. 1997 "Inhibition of chondrogenesis by Wnt gene expression *in vivo* and *in vitro*." *Dev. Biol.* 185, 104-118
- Ruffer, 1911 "On arterial lesion found in Egyptian mummies" *J. Patho. Bacteriol.*; 15: 453
- C. Russo-Marie F, Peltier A, Polla BS 1998 "L'inflammation" Page 126
- Sacks F.M., Pfeffer M.A., Moya L.A. et al. 1996 "The effects of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol level" *N. Engl. J. Med.*; 335 : 1001-1009
- Sagripanti A, Carpi A. 2000 "Antithrombotic and prothrombotic activities of the vascular endothelium" *Biomed Pharmacother.* 54(2):107-11
- Sakaue H, Ogawa W, Matsumoto M, Kuroda S, Takata M, Sugimoto T, Spiegelman BM, Kasuga M. 1998 "Posttranscriptional control of adipocyte differentiation through activation of phosphoinositide 3-kinase" *J Biol Chem.* 273(44):28945-52
- Sakr S. W., Eddy R. J, Barth H., Wang F., Greenberg S., Maxfield F. R., and Tabas I.. 2001 "The uptake and degradation of matrix-bound lipoproteins by macrophages require an intact actin cytoskeleton, Rho family GTPases, and myosin ATPase activity" *J. Biol. Chem.* 276: 37649-37658
- Saltiel AR, Kahn CR. 2001 "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism" *Nature.* 414:799-806
- Sandell LJ, Morris N, Robbins JR, Goldring MB. 1991 "Alternatively spliced type II procollagen mRNA define distinct populations of cells during vertebral development." *J Cell Biol* 114 : 1307-19
- Sarruf .A. Iankova I, Abella A, Assou S, Miard S, Fajas L 2005 "Cyclin D3 promotes adipogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma" *Mol. Cell. Biol.* 25; 9985-9995
- Sasaoka T., Ishiki M., Wada T., Hori H., Hirai H., Haruta T., Ishihara H., and Kobayashi M. 2001 "Tyrosine phosphorylation-dependent and -independent role of Shc in the regulation of IGF-1-induced mitogenesis and glycogen synthesis" *Endocrinology* 142, 5226-5235
- Sasaoka T, Ishiki M, Sawa T, Ishihara H, Takata Y, Imamura T, Usui I, Olefsky JM, Kobayashi M 1996 "Comparison of the insulin and insulin-like growth factor 1 mitogenic intracellular signaling pathways" *Endocrinology* 137:4427-4434

- Sasaoka T, Rose DW, Jhun BH, Saltiel AR, Draznin B, Olefsky JM **1994** "Evidence for a functional role of Shc proteins in mitogenic signaling induced by insulin, insulin-like growth factor-1, and epidermal growth factor" *J Biol Chem* 269:13689-13694
- Scheidegger KJ, James RW, Delafontaine P. **2000** "Differential effects of low density lipoproteins on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 receptor expression in vascular smooth muscle cells" *J Biol Chem.* 275:26864-26869
- Scheidegger KJ, Du J, Delafontaine P. **1999** "Distinct and common pathways in the regulation of insulin-like growth factor-1 receptor gene expression by angiotensin II and basic fibroblast growth factor" *J Biol Chem.* 274:3522-3530
- Schonherr, E., Sunderkotter, C., Iozzo, R. V., and Schaefer, L. **2005** "Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system" *J. Biol. Chem.* 280, 15767-15772
- Schoonjans K., Staels B., Auwerx Y. **1996** "The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation" *Biochimica et Biophysica Acta* 1302 : 93-109
- Schulick AH, Taylor AJ, Zuo W, Qiu CB, Dong G, Woodward RN, Agah R, Roberts AB, Virmani R, Dichek DA. **1998** "Overexpression of transforming growth factor beta1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia." *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 95(12):6983-8
- Schwartz CJ, Mitchell JR. **1962** "The morphology, terminology and pathogenesis of arterial plaques" *Postgrad Med J* 38:25-34
- Sears IB, MacGinnitie MA, Kovacs LG, Graves RA. **1996** "Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma" *Mol Cell Biol.* 16(7):3410-9
- Seemayer TA, Thelmo WL, Morin J. **1973** "Cartilaginous transformation of the aortic valve" *Am J Clin Pathol.* 60:616-620.
- Sepp-Lorenzino L. **1998** "Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor" *Breast Cancer Res. Treat* 47:235-253
- Shackelford RE, Misra UK, Florine-Casteel K, et al. **1995** "Oxidized low density lipoprotein suppresses activation of NFkB in macrophages via a pertussis toxin-sensitive signaling mechanism" *J Biol Chem.* 270:3475±3478
- Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernandez-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G, Fallon JT, Regnstrom J, Fuster V. **1995** "Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture" *Circulation.* 92(6):1565-9
- Shanahan CM, Cary NR, Salisbury JR, Proudfoot D, Weissberg PL, Edmonds ME. **1999** "Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Mönckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification." *Circulation.* 100(21):2168-76
- Shanahan C. M., Cary N. R., Metcalfe J. C., and Weissberg P. L. **1994** "High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques". *J. Clin. Invest.* 93, 2393-2402

- Shankar R, de la Motte CA, DiCorleto PE. 1992** "3-Deazaadenosine inhibits thrombin-stimulated platelet-derived growth factor production and endothelial-leukocyte adhesion molecule-1-mediated monocytic cell adhesion in human aortic endothelial cells" *J Biol Chem.* May 5;267(13):9376-82
- Shao JS, Cai J, Towler DA. 2006** "Molecular mechanisms of vascular calcification: lessons learned from the aorta" *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(7):1423-30
- Shao JS, Cheng SL, Pingsterhaus JM, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. 2005** "Msx2 promotes cardiovascular calcification by activating paracrine Wnt signals" *J Clin Invest.* 115(5):1210-20
- Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA. 1998** "Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma" *Nature.* 396(6709):377-80
- Shashkin P, Dragulev B, Ley K. 2005** "Macrophage differentiation to foam cells" *Curr Pharm Des.* 11(23):3061-72
- Sheperd J., Cobbe S.M., Ford L. et al. 1995** "Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia" *N. Engl. J. Med.* 333 : 1301-1307
- Sima AV, Stancu CS, Simionescu M., 2009** "Vascular endothelium in atherosclerosis ." *Cell Tissue Res.* 335(1):191-203
- Simionescu M., Antohe F. 2006** "Functional ultrastructure of the vascular endothelium: changes in various pathologies." *Hand.Exp. Pharmacol.;* (176 Pt1): 41-69
- Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM. 2002** "Smooth muscle progenitor cells in human blood" *Circulation.* 106: 1199-1204
- Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. 1995** "Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 8264-8
- Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B, Lefebvre V 2001** "The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. " *Dev Cell.*;1(2):277-90
- Soutoglou E, Talianidis I. 2002** "Coordination of PIC assembly and chromatin remodeling during differentiation-induced gene activation" *Science.* 295(5561):1901-4
- Spagnoli LG, Orlandi A, Santeusano G. 1991** "Foam cells of the rabbit atherosclerotic plaque arrested in metaphase by colchicine show a macrophage phenotype" *Atherosclerosis.* 88:87±92
- Speer MY, Yang HY, Brabb T, Leaf E, Look A, Lin WL, Frutkin A, Dichek D, Giachelli CM. 2009** "Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries" *Circ Res.* 104(6):733-41
- Spector AA. 1984** "Plasma lipid transport" *Clin Physiol Biochem.* 2(2-3):123-34
- Spicer SS, Lewis SE, Tashian RE, Schulte BA. 1989** "Mice carrying a CAR-2 null allele lack carbonic anhydrase II immunohistochemically and show vascular calcification" *Am J Pathol.* 134: 947-954

- Spronk HM, Soute BA, Schurgers LJ, Cleutjens JP, Thijssen HH, De Mey JG, Vermeer C. 2001** "Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall" *Biochem Biophys Res Commun.* 289(2):485-90
- Stanley ER, Guilbert LJ, Tushinski RJ, Bartlemets SH. 1983** "CSF-1 \pm a mononuclear phagocyte lineage specific hemopoietic growth factor" *J Cell Biol.* 21:151 \pm 159
- Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. 1994** "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association" *Arterioscler Thromb.* 14:840-856
- Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebersold R, Schinke T, Karsenty G, Giachelli CM. 2001** "Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers." *Circ Res.* 89 (12): 1147-54
- Stewart CE, Rotwein P. 1996** "Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors". *Physiol Rev.* 76:1005-1026
- Stewart CC, Lin H. 1978** "Macrophage growth factor and its relationship to colony stimulating factor" *J Reticuloendothel Soc* 23:269 \pm 285
- St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP 1999** " Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation." *Genes Dev.* 13(16):2072-86
- Stott N. S., Jiang T. X. and Chuong C. M. 1999** "Successive formative stages of precartilaginous mesenchymal condensations *in vitro*: modulation of cell adhesion by Wnt-7A and BMP-2." *J. Cell. Physiol.* 180, 314-324
- Strong JP, Malcom GT, Oalman MC. 1995** "Environmental and genetic risk factors in early human atherogenesis: lessons from the PDAY study. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth" *Pathol Int.* 45(6):403-8
- Student AK, Hsu RY, Lane MD. 1980** "Induction of fatty acid synthetase synthesis in differentiating 3T3-L1 preadipocytes" *J Biol Chem.* 255(10):4745-50
- Su B, Mitra S, Gregg H, Flavahan S, Chotani MA, Clark KR, Goldschmidt-Clermont PJ, Flavahan NA. 2001** "Redox regulation of vascular smooth muscle cell differentiation" *Circ Res.* 89:39-46
- Sun H, Tu X, Prisco M, Wu A, Casiburi I, Baserga R. 2003** "Insulin-like growth factor I receptor signaling and nuclear translocation of insulin receptor substrates 1 and 2" *Mol Endocrinol* 17:472-486
- Surmacz E., Guvakova M., Nolan M., Nicosia R., and Sci-acca L. 1998** "Type I insulin-like growth factor receptor function in breast cancer" *Breast Cancer Res. Treat.* 47:255-267
- Szebenyi G, Fallon JF. 1999** "Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors" *Int Rev Cytol.* 185:45-106

- Tabas I. 2009** “Macrophage Apoptosis in Atherosclerosis: Consequences on Plaque Progression and the Role of Endoplasmic Reticulum Stress” *Antioxid Redox Signal* Feb 25. [Epub ahead of print]
- Tabas 2002** “Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications” *J Clin Invest* 7, p. 905
- Takada I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, Youn MY, Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y, Takezawa S, Yogiashi Y, Kitagawa H, Yamada G, Takada S, Minami Y, Shibuya H, Matsumoto K, Kato S. 2007** “A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation” *Nat Cell Biol.* 9(11):1273-85
- Takahashi M, Takahashi S, Suzuki C, Jia L, Morimoto H, Ise H, Iwasaki T, Hattori H, Suzuki J, Miyamori I, Kobayashi E, Ikeda U. 2005** “IL-1beta attenuates beta-very low-density lipoprotein uptake and its receptor expression in vascular smooth muscle cells” *J Mol Cell Cardiol.* 38:637- 646
- Takahashi K., Takeya M., Sakashita N., 2002** “Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals” *Medical Electron Microscopy* 35 (4), 179-203
- Takakura N, Huang XL, Naruse T, Hamaguchi I, Dumont DJ, Yancopoulos GD, Suda T. 1998** “Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis” *Immunity.* 9(5):677-86
- Takayama Y, May P, Anderson RG, Herz J. 2005** “Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) controls endocytosis and c-CBL-mediated ubiquitination of the platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR beta)”. *J Biol Chem.* 6; 280(18): 18504-10
- Takeuchi, Y., Kodama, Y., and Matsumoto, T. 1994** “Bone matrix decorin binds transforming growth factor-beta and enhances its bioactivity” *J. Biol. Chem.* 269, 32634-32638
- Tanaka T, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. 1997** “Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBPbeta and/or C/EBPdelta gene” *EMBO J.* 16(24):7432-43
- Tartare-Deckert S, Chavey C, Monthouel MN, Gautier N, Van Obberghen E 2001** “The matricellular protein SPARC/osteonectin as a newly identified factor up-regulated in obesity” *J Biol Chem.* 276(25):22231-7
- Tavella S, Raffo P, Tacchetti C, Cancedda R, Castagnola P. 1994** “N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis.” *Exp Cell Res.* 215(2):354-62
- Taylor LM, Khachigian LM 2000** “Induction of platelet-derived growth factor B-chain expression by transforming growth factor-beta involves transactivation by Smads” *J Biol Chem* 275: 16709-16716
- Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. 1981** “Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen” *Cell.* 26 (1Pt 1): 99-105
- Terrand J, Bruban V, Zhou L, Gong W, El Asmar Z, May P, Zurhove K, Haffner P, Philippe C, Woldt E, Matz RL, Gracia C, Metzger D, Auwerx J, Herz J, Boucher P. 2009** “LRP1

- controls intracellular cholesterol storage and fatty acid synthesis through modulation of Wnt signaling" *J Biol Chem.* 284(1):381-8.
- Tertov V. V., Orekhov A. N., Sobenin I. A., Gabbasov Z. A., Popov E. G., Yaroslovov A. A., and Smirnov V. N. 1992** "Three types of naturally occurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation". *Circ. Res.* 71: 218-228
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz et al. 1998** "Embryonic stem cell lines derived from blastocystes" *Science* 282 : 1145-1147
- Thyberg J, Hultgardh-Nilsson A. 1994** "Fibronectin and the basement membrane components laminin and collagen type IV influence the phenotypic properties of subcultured rat aortic smooth muscle cells differently" *Cell Tissue Res.* 276:263-271
- Tintut Y, Alfonso Z, Saini T, Radcliff K, Watson K, Bostrom K, Demer LL. 2003** "Multilineage potential of cells from the artery wall" *Circulation.* 108: 2505-2510
- Tomiyama K, Nakata H, Sasa H, Arimura S, Nishio E, Watanabe Y. 1995** "Wortmannin, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, inhibits adipocytic differentiation of 3T3-L1 cells" *Biochem Biophys Res Commun.* 212(1):263-9
- Tontonoz P., Nagy L., Alvarez J.G., Thomazy V.A. and Evans R.M., 1998** "PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL" *Cell.* 2, p. 241
- Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. 1994a** "mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer" *Genes Dev.* 8(10):1224-34
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. 1994b** "Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor" *Cell.* 79(7):1147-56. Erratum in: *Cell* 1995 Mar 24;80(6):following 957
- Toussaint J-F, Jacob M-P, Lagrost L., Chapman J. 2003** "l'Athérosclérose : physiologies, diagnostics, thérapeutiques " *Masson, Paris*
- Tseng WF, Huang SS, Huang JS. 2004** "LRP-1/TbetaR-V mediates TGF-beta1-induced growth inhibition in CHO cells". *FEBS Lett.* 26; 562(1-3):71-8
- Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K, Kahn CR. 2001** "Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2- mediated signaling" *Mol Cell Biol.* 21:26-38
- Tufan A. C., Daumer K. M. and Tuan R. S. 2002** "Frizzled-7 and limb mesenchymal chondrogenesis: effect of misexpression and involvement of N-cadherin." *Dev. Dyn.* 223, 241-253
- Tyson K.L., Reynolds J.L., McNair R., Zhang Q., Weissberg P.L., and Shanahan C.M. 2003** "Osteo/chondrocytic transcription factors and their target genes exhibit distinct patterns of expression in human arterial calcification". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:489-494
- Vaessen N. Heutink P, Janssen JA, Witteman JC, Testers L, Hofman A, Lamberts SW, Oostra BA, Pols HA, van Duijn CM 2001** "A polymorphism in the gene for *IGF1*: functional properties and risk for type 2 diabetes and myocardial infarction" *Diabetes* 50, 637-642

- Van de Wetering M.**, Cavallo R., Dooijes D., van Beest M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A. et al. **1997** "Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF". *Cell* 88, 789-799
- Vanhoutte PM.** **1997** "Endothelial dysfunction and atherosclerosis" *Eur Heart J.* 18 Suppl E:E19-29
- Vanhoutte PM, Eber B.** **1991** "Endothelium-derived relaxing and contracting factors" *Wien Klin Wochenschr.* 103(14):405-11
- Ververis JJ, Ku L, Delafontaine P.** **1993** "Regulation of insulin-like growth factor I receptors on vascular smooth muscle cells by growth factors and phorbol esters" *Circ Res.* 72:1285-1292
- Vindis C, Escargueil-Blanc I, Uchida K, Elbaz M, Salvayre R, Negre-Salvayre A.** **2007** "Lipid oxidation products and oxidized low-density lipoproteins impair platelet-derived growth factor receptor activity in smooth muscle cells: implication in atherosclerosis" *Redox Rep.* 12(1):96-100
- Virchow R.** **1863** *Cellular Pathology.* New York, NY: Dover
- Virchow R.** **1971** "Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Chance F, translator; an unabridged and unaltered replication of english translation originally published by J.B. Lippincott and Co, Philadelphia, 1863. New-York: Dover Publications 1971:404-408
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G. V., Kronenberg, H. M. and Tabin, C. J.** **1996** "Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein" *Science* 273, 613-622
- D. Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantes J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E,** **1994** "Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the *SRY*-related gene *SOX9*." *Cell.* 16;79(6):1111-20
- Wagsater D, Olofsson PS, Norgren L, Stenberg B, Sirsjo A.** **2004** "The chemokine and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by INF gamma" *Biochem Biophys Res Commun.* 325:1187-1193
- Wakino S., Kintscher U., Kim S., Yin F., Hsueh W. A., and Law R. E.,** **2000** "Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1 \rightarrow S transition in vascular smooth muscle cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 29, pp. 22435-22441
- Walsh MF, Barazi M, Pete G, Muniyappa R, Dunbar JC, Sowers JR.** **1996** "Insulin-like growth factor I diminishes in vivo and in vitro vascular contractility: role of vascular nitric oxide" *Endocrinology* 137: 1798-1803
- Wang L., Shao Y. Y. and Ballock R. T.** **2007** "Thyroid hormone interacts with the Wnt/beta-catenin signaling pathway in the terminal differentiation of growth plate chondrocytes." *J. Bone. Miner. Res.* 22, 1988-1995
- Wang X, Adhikari N, Li Q, Hall JL.** **2004** "LDL receptor-related protein LRP6 regulates proliferation and survival through the Wnt cascade in vascular smooth muscle cells". *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287(6):H2376-83
- Wang HY, Malbon CC.** **2003** "Wnt signaling, Ca²⁺, and cyclic GMP: visualizing Frizzled functions" *Science* 300:1529-30

- Wang X**, Xiao Y, Mou Y, Zhao Y, Blankesteyn WM, and Hall JL. **2002** "A role for the beta-catenin/T-cell factor signaling cascade in vascular remodeling". *Circ Res.* 90: 340-347
- Wang J**, Niu W, Witte DP, Chernausek SD, Nikiforov YE, Clemens TL, Sharifi B, Strauch AR, Fagin JA. **1998** "Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-4 (IGFBP-4) in smooth muscle cells of transgenic mice through a smooth muscle α -actin-IGFBP-4 fusion gene induces smooth muscle hypoplasia" *Endocrinology* 139, 2605-2614
- Wang ND**, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR, Darlington GJ. **1995** "Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice". *Science.* 269(5227):1108-12
- Watanabe Y**, Inaba T, Shimano H, Gotoda T, Yamamoto K, Mokuno H, Sato H, Yazaki Y, Yamada N. **1994** "Induction of LDL receptor-related protein during the differentiation of monocyte-macrophages. Possible involvement in the atherosclerotic process". *Arterioscler Thromb.* 14(6):1000-6
- Watson KE**, Boström K, Ravindranath R, Lam T, Norton B, Demer LL. **1994** "TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify" *J Clin Invest.* 93(5):2106-13
- Webb DJ**, Nguyen DH, Gonias SL. **2000** "Extracellular signal-regulated kinase functions in the urokinase receptor-dependent pathway by which neutralization of low density lipoprotein receptor-related protein promotes fibrosarcoma cell migration and matrigel invasion" *J Cell Sci.*;113 (Pt 1):123-34
- Willnow**, T. Nykjaer, A. and Herz, J. **1999**."Lipoprotein receptors: new roles for ancient proteins". *Nat. Cell Biol.* 1:E157-E162
- Willnow TE**, Armstrong SA, Hammer RE, Herz J. **1995** "Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(10):4537-41
- Willnow TE**, Sheng Z, Ishibashi S, Herz J **1994** "Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist" *Science* 264:1471- 1474
- Wilson PW**, Kauppila LI, O'Donnell CJ, Kiel DP, Hannan M, Polak JM, Cupples LA. **2001** "Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality." *Circulation* 103(11):1529-34
- Witztum J.L.**, Strinberg D. **2001** "The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis : does it hold for humans ?" *Trends Cardiovasc Med.* 11:93-102
- Wolfbauer G.**, Glick J.M., Minor L.K. and Rothblat G.H., **1986** "Development of the smooth muscle foam cell: uptake of macrophage lipid inclusions" *Proc Natl Acad Sci USA* 20, p. 7760
- Worth NF**, Rolfe BE, Song J, Campbell GR. **2001** "Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins" *Cell Motil Cytoskeleton.* 49:130 -145
- Wright WS**, Longo KA, Dolinsky VW, Gerin I, Kang S, Bennett CN, Chiang SH, Prestwich TC, Gress C, Burant CF, Susulic VS, MacDougald OA. **2007** "Wnt10b inhibits obesity in ob/ob and agouti mice" *Diabetes.* 56(2):295-303

- Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. 1999** “Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity” *Mol Cell.* 3(2):151-8
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. 2006** “TOR signaling in growth and metabolism” *Cell.* 124(3):471-84
- Xia X, Serrero G. 1999** “Inhibition of adipose differentiation by phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors” *J Cell Physiol.* 178(1):9-16
- Xu J, Liao K. 2004** “Protein kinase B/AKT 1 plays a pivotal role in insulin-like growth factor-1 receptor signaling induced 3T3-L1 adipocyte differentiation” *J Biol Chem.* 20;279(34):35914-22
- Xu W, Takahashi Y, Sakashita T, Iwasaki T, Hattori H, Yoshimoto T. 2001** “Low density lipoprotein receptor-related protein is required for macrophage-mediated oxidation of low density lipoprotein by 12/15-lipoxygenase”. *J Biol Chem.* 28;276(39):36454-9
- Yamaguchi, Y., Mann, D., and Ruoslahti, E. 1990** “Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin” *Nature* 346, 281-284
- Yamakawa T, Tanaka S., Kamei J., Kadonosono K., Okuda K. 2003** “Phosphatidylinositol 3-kinase in angiotensin II-induced hypertrophy of vascular smooth muscle cells” *European Journal of Pharmacology* 478 39- 46
- Yamashita S, Andoh M, Ueno-Kudoh H, Sato T, Miyaki S, Asahara H. 2009** “Sox9 directly promotes Bapx1 gene expression to repress Runx2 in chondrocytes” *Exp Cell Res.*;315(13):2231-40
- Yan Q, Weaver M, Perdue N, Sage EH. 2005** “Matricellular protein SPARC is translocated to the nuclei of immortalized murine lens epithelial cells” *J Cell Physiol.* 203(1):286-94
- Yang Y., Topol L., Lee H. and Wu J. 2003** “Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation.” *Development* 130, 1003-1015
- Yano F., Kugimiya F., Ohba S., Ikeda T., Chikuda H., Ogasawara T., Ogata N., Takato T., Nakamura K., Kawaguchi H. and Chung U. I. 2005** “The canonical Wnt signaling pathway promotes chondrocyte differentiation in a Sox9-dependent manner.” *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 1300-1308
- Yeh WC, Cao Z, Classon M, McKnight SL. 1995** “Cascade regulation of terminal adipocyte differentiation by three members of the C/EBP family of leucine zipper proteins”. *Genes Dev.* 9(2):168-81
- Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, Bugge TH, Strickland DK, Lawrence DA. 2003** “Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein” *J Clin Invest.* 112(10):1533-40
- Yoon BS, Lyons KM. 2004** “Multiple functions of BMPs in chondrogenesis” *J Cell Biochem.* 93(1):93-103
- Yoshida CA, Yamamoto H, Fujita T, Furuichi T, Ito K, Inoue K, Yamana K, Zanma A, Takada K, Ito Y, Komori T. 2004** “Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and

- Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog". *Genes Dev.* 18(8):952-63
- Yu W, Chen Z, Zhang J, Zhang L, Ke H, Huang L, Peng Y, Zhang X, Li S, Lahn BT, Xiang AP. 2008 "Critical role of phosphoinositide 3-kinase cascade in adipogenesis of human mesenchymal stem cells" *Mol Cell Biochem.* 310(1-2):11-8
- Yu KC, Mamo JC. 1997 "Binding and uptake of chylomicron remnants by cultured arterial smooth muscle cells from normal and Watanabeheritable- hyperlipidemic rabbits" *Biochim Biophys Acta.* 1346: 212-220
- Yui S, Sasaki T, Miyzaki A, et al. 1993 "Induction of murine macrophage growth by modified LDLs" *Arterioscler Thromb* 13:331±337
- Yumi K, Fagin JA, Yamashita M, Fishbein MC, Shah PK, Kaul S, Niu W, Nilsson J, Cercek B. 1997 "Direct effects of somatostatin analog octreotide on insulin-like growth factor-I in the arterial wall". *Lab Invest.* 76(3):329-38
- Yumi K, Fagin JA, Dimayuga P, Yano J, Forrester JS, Cercek B. 1994 "Somatostatin analogue octreotide decreases arterial IGF-1 gene expression and neointimal thickening after injury" *Clin Res.* 42:15A
- Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK, Sottiurai VS, Mabon RF, Glagov S. 1983 "Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress" *Circ Res.* 53 : 502-14
- Zebboudj AF, Shin V, Boström K. 2003 "Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells." *J Cell Biochem.* 90(4):756-65
- Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K 2002 "Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2" *J Biol Chem.* 277:4388-4394
- Zeleny M., Swertfeger D.K., Weisgraber K.H., and Hui D.Y. 2002 "Distinct apolipoprotein E isoform preference for inhibition of smooth muscle cell migration and proliferation". *Biochemistry.* 41:11820-11823
- Zernecke A., Weber C., 2005 "Inflammatory mediators in atherosclerotic vascular disease" *Basic Research in Cardiology* 100 (2), 93-101
- Zhao GQ 2003 "Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse." *Genesis.* 35(1):43-56
- Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, De Crombrughe B. 1997 "Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis." *Dev Dyn.* 209(4):377-86
- Zhao Q, Behringer RR, de Crombrughe B. 1996 "Prenatal folic acid treatment suppresses acrania and meroanencephaly in mice mutant for the Cart1 homeobox gene." *Nat Genet.* 13(3):275-83
- Zhao GQ, Eberspaecher H, Seldin MF, de Crombrughe B. 1994 "The gene for the homeodomain-containing protein Cart-1 is expressed in cells that have a chondrogenic potential during embryonic development." *Mech Dev.* 48(3):245-54
- Zheng B, Clemmons DR. 1998 "Blocking ligand occupancy of the $\alpha_3\beta_1$ integrin inhibits insulin-like growth factor I signaling in vascular smooth muscle cells" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:11217-11222

- Zhou S, Eid K, Glowacki J. 2004** “Cooperation between TGF-beta and Wnt pathways during chondrocyte and adipocyte differentiation of human marrow stromal cells” *J Bone Miner Res.* 19(3):463-70
- Zhu S, Liu L, Korzh V, Gong Z, Low BC. 2006** “RhoA acts downstream of Wnt5 and Wnt11 to regulate convergence and extension movements by involving effectors Rho kinase and Diaphanous: use of zebrafish as an in vivo model for GTPase signaling.” *Cell Signal.* 18(3):359-72.
- Zhu H, Takahashi Y, Xu W, Kawajiri H, Murakami T, Yamamoto M, Iseki S, Iwasaki T, Hattori H, Yoshimoto T. 2003** “Low density lipoprotein receptor-related protein-mediated membrane translocation of 12/15-lipoxygenase is required for oxidation of low density lipoprotein by macrophages”. *J Biol Chem.* 11;278(15):13350-5
- Zhu B., Zhao G., Witte D. P., Hui D. Y. & Fagin J. A . 2001** “Targeted overexpression of IGF1 in smooth muscle cells of transgenic mice enhances neointimal formation through increased proliferation and cell migration after intraarterial injury” *Endocrinology* 142, 3598-3606
- Zilberberg A, Yaniv A, Gazit A. 2004** “The low density lipoprotein receptor-1, LRP1, interacts with the human frizzled-1 (HFz1) and down-regulates the canonical Wnt signaling pathway” *J Biol Chem.* 279(17):17535-42
- Zurhove K, Nakajima C, Herz J, Bock HH, May P. 2008** “Gamma-secretase limits the inflammatory response through the processing of LRP1” *Sci Signal.* 1(47):ra15

Résumé de thèse

La calcification vasculaire est une complication de l'athérosclérose, cependant les mécanismes moléculaires de ce processus sont encore inconnus. Nous avons constaté que PPAR γ et LRP1 interagissent fonctionnellement pour contrôler la transformation des cellules musculaires lisse (CML) en cellules cartilagineuses. L'inactivation de LRP1 dans le muscle lisse perturbe l'export du cholestérol et accélère la formation de la plaque d'athérome, cet effet est atténué par la rosiglitazone, un agoniste de PPAR γ . L'inactivation de l'expression de PPAR γ dans les CML induit la formation de cartilage dans la média vasculaire. Cependant de façon étonnante l'absence de LRP1 dans les CML contrecarre cet effet. En effet, la présence de LRP1 est nécessaire à l'expression de Wnt5a et à la capture et la translocation nucléaire de SPARC, ce qui induit l'expression de Sox9 et de Cart1 et le programme de différenciation chondrocytaire. En revanche, PPAR γ induit l'expression de l'antagoniste de Wnt5a, sFRP2, ainsi la présence de LRP1 et de PPAR γ dans les CML bloque le processus de calcification. PPAR γ et LRP1 contrôlent le remodelage vasculaire en régulant l'état de différenciation des CML.

De plus, nous avons constaté que la présence de LRP1 est nécessaire pour activer la cascade de signalisation ShcA/Grb2/Ras/Er1-2 et progresser dans le cycle cellulaire en réponse à l'IGF1, un facteur impliqué dans le développement de l'athérosclérose. Quand LRP1 est absent, c'est Akt/mTOR qui est hyperactivé en réponse à l'IGF1. Ceci montre que LRP1 oriente la voie de l'IGF1 vers la prolifération et la détourne de la différenciation cellulaire. Ainsi LRP1 en contrôlant la cascade de signalisation de l'IGF-1 semble être capable de protéger contre l'accumulation de cellules spumeuses dans la paroi vasculaire.

Vascular calcification is a hallmark of advanced atherosclerosis but the mechanism for this process remains unknown. We found that the nuclear hormone receptor PPAR γ and the LDL receptor-related protein LRP1 functionally interact to control the metaplastic cartilaginous transformation of vSMC. Tissue-specific disruption of LRP1 in smooth muscle disrupts cellular cholesterol export and accelerates atherosclerosis, which is mitigated by the PPAR γ agonist rosiglitazone. Loss of PPAR γ in vSMC promotes cartilage formation in the medial muscular layer, but surprisingly this is prevented in the absence of LRP1. Wnt5a expression and recapture and nuclear translocation of SPARC, both regulators of the cartilage inducers Sox9 and Cart1, require LRP1. By contrast, PPAR γ controls the expression of the Wnt5a antagonist sFRP2. LRP1 and PPAR γ both suppress fibrosis- and calcification-promoting TGF β signals. Thus, PPAR γ and LRP1 jointly control the vascular wall architecture, by regulating cellular lipid and extracellular matrix homeostasis, as well as the differentiation state of vSMC.

Moreover, we found that LRP1 is required for a full activation of the ShcA/Grb2/Ras/Er1-2 pathway and progression in the cell cycle in response to IGF1, a factor implicated in the development of atherosclerosis. When LRP1 is lacking, the Akt/mTOR pathway is hyperactivated in response to IGF1. These findings prompt us to propose LRP1 as an IGF1 receptor-dependent molecular switch necessary to drive the cell to proliferation instead differentiation. This new role of LRP1 on IGF1 signalling seems to contribute to protect against foam cell accumulation during atherosclerosis.