

UNIVERSITE PARIS 13 - U.F.R. Santé Médecine et Biologie Humaine

Ecole doctorale Galilée

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 13**

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Sophie VO**

---

**Modulation phénotypique de la cellule musculaire lisse  
lors des stades précoces de l'athérosclérose :  
Rôle du syndécan-1 et formation des cristaux de cholestérol**

---

Thèse dirigée par le Pr Nathalie CHARNAUX

Co-encadrée par le Dr Benjamin RICHARD

Soutenue le 1<sup>er</sup> avril 2016 devant un jury composé de :

Pr Dominique LEDOUX

Président du jury

Dr Patricia ROUSSELLE

Rapportrice

Pr Isabelle LIMON

Rapportrice

Dr Wilfried LE GOFF

Examineur

Dr Benjamin RICHARD

Examineur

Pr Nathalie CHARNAUX

Directrice de thèse



## Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements aux membres du jury qui ont aimablement accepté d'évaluer ma thèse. A Dominique Ledoux, pour avoir accepté de présider le jury. A Isabelle Limon et Patricia Rousselle, pour avoir relu mon manuscrit avec autant d'attention et apporté leurs corrections pertinentes. A Wilfried Le Goff, pour avoir pris le temps d'examiner mes travaux.

Un très grand merci à Benjamin Richard, qui a encadré mes travaux et sans qui ce projet n'aurait pas vu le jour. Cela n'a pas été simple de démarrer un sujet tout nouveau et le syndécan-1 ne nous a pas aidé, mais tes précieux conseils et encouragements m'ont permis d'arriver jusqu'au bout. Tu as toujours été là pour répondre à mes questions et me corriger, et je t'en remercie. J'ai apprécié travailler avec toi et te souhaite le meilleur pour la suite.

A Nathalie Charnaux, qui a suivi mes travaux et soutenu tout au long de cette thèse. Merci pour tes conseils et commentaires avisés qui m'ont aidée à avancer.

A Benoit Ho-Tin-Noe, j'ai pris un réel plaisir à contribuer à ton projet et ce fut très enrichissant. Je te remercie pour tout le temps que tu m'as accordé, autant pour me former aux manip techniques que pour répondre à mes questions. J'ai énormément appris grâce à tes longues explications et tes idées lumineuses.

Je remercie également le Dr Jean-Baptiste Michel pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur les échantillons de la biobanque de l'unité. Ainsi que Didier Letourneur qui m'a accueilli dans l'équipe et m'a permis d'effectuer ma thèse dans de bonnes conditions.

Merci à toute l'équipe de Bobigny pour votre accueil :

A Olivier Oudar, Angela Sutton, Hania Hlawaty, Erwan Guyot, Christelle Laguillier, Oualid Haddad, pour votre écoute attentive et vos conseils lors des réunions d'équipe.

Nicolas, on était dans le même bateau et c'était sympa d'en discuter. Bon courage pour la dernière ligne droite.

Amena, Hadjer, Kevin, et Abdallah, vous avez apporté l'animation qui manquait à ce bureau. J'espère que ça continuera et je vous souhaite de beaux projets.

A la petite Soumaya devenue grande, je te confie le syndécan-1. C'était sympa de partager ce projet avec toi et ta motivation fait plaisir à voir. Je suis certaine que tu te débrouilleras comme une chef.

Aux stagiaires Quentin et Margaux, qui ont travaillé un temps sur le projet et partagé mes manip.

Sans oublier les anciens : Loic, Nadine, Dorian, Sanaa et Widdy, avec qui j'ai fait mes premiers pas au laboratoire.

Je tiens à remercier les membres de l'équipe de Martine Jandrot Perrus, qui m'ont guidée lors de mon arrivée au laboratoire et qui ont toujours accordé du temps à mes questions. A Véronique Arocas qui a beaucoup apporté à ce projet par son avis et ses sages conseils. A Yacine Boulaftali, Laurence Venisse, Marie-Christine Bouton, Stéphane Loyau, pour leur sympathie et leur aide précieuse.

Merci à Angélique Levoye, pour son aide technique sur les lentivirus et ses réponses pertinentes à mes questions. C'était très intéressant d'échanger avec toi et j'ai apprécié t'avoir comme coloc de bureau.

A Olivier Meilhac, ton expertise et tes conseils ont bien aidé au commencement de ce projet.

A Catherine Deschildre et Véronique Ollivier qui m'ont permis de travailler sur les précieux tissus et cellules de la biothèque, et à Liliane Louedec qui a pris le temps de m'aider en histologie. Merci pour votre sympathie et votre aide, vous avez ainsi beaucoup contribué à l'avancement de mes travaux.

Ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans ceux qui ont égayé mes journées au laboratoire. Pour les pauses eau, les goûters, les congrès ensoleillés, et tous ces petits moments qui font du bien au moral, j'adresse un grand merci à :

Marie-Anne, on ne peut pas compter l'une sur l'autre comme bonne conscience mais on aura passé de bons moments ! J'espère que tu me feras découvrir un jour Strasbourg et ses kouglof.

Minnie, on en a franchi des kilomètres ensemble (We own the night !) et j'espère qu'il y en aura d'autres. Je compte sur toi pour maintenir le groupe des chinoises.

Kamelou, merci d'avoir été là les nombreuses fois où j'ai eu besoin de conseils ou de soutien moral. Je viendrai en été pour honorer notre deal et te voir en djellaba.

Kristell, j'aime ta bonne humeur et c'était sympa de faire des pauses bavardages à ton bureau. Merci pour la découverte du kouignamann, ainsi que pour tes tuyaux et mails concernant ma réorientation.

Karen, je ne pensais pas dire ça un jour mais ça me manquera de ne plus entendre France Gall...

Adrian, tu nous délaisses mais ça fait toujours très plaisir de te voir les vendredis.

Devy, le bro et maître jedi qui a fait mon apprentissage alors que je n'étais qu'une petite padawan. Tu m'as vu dans les pires moments, mais ces souvenirs font aussi partie des meilleurs.

Sandrine, merci de ton aide salvatrice les fois où j'étais au plus mal.

Clément, tu as tout de même été un gentil bad cop durant mon apprentissage de padawan.

Lamia, j'ai aimé tes conseils de grande sœur quand tu étais au labo. Contentée que tu sois toujours présente même si tu es maintenant à l'autre bout.

Ainsi que Kevin qui a bien rempli son rôle de Sam quand il le fallait, Angèle papame, Francis, Radouane, Nicolas, Sandy, et tous les autres.

Merci également à Maya, Louis, Pierre, Bo, Rachida, Jessica, Marisol, Joana, Cédric Chauvierre, et tous les membres du 3e qui m'ont gentiment accueilli à l'étage. Etant littéralement scotchée devant l'ordi ces derniers temps, je n'ai malheureusement pas pu profiter de tous les goûters crêpes et fin de confiture, mais c'était très agréable de passer cette dernière année à vos côtés.

Sans oublier ceux qui ont quitté le labo pour d'autres horizons. A Richard Bayles, ça a été un plaisir de travailler ensemble sur les tissus et de déguster des whiskies malgré ma grippe carabinée. Je remercie pour les bons moments Camille, Reda, Julia, Fanny, Laetitia, Jean-Phi, Candice, Marie, Nathalie, Alexy, Sophia et Nouhad. Ainsi que les personnes qui ont été là lors de mes premières années : Lourdes, Quoc, Nadir, Silvia, Thao, Saouda et Claire.

Durant ces années, j'ai croisé de nombreuses personnes qui ont pris le temps de discuter et de m'apporter quelque chose. Je remercie Marie-Paule Jacob, Hadidja, Antonino Nicoletti, Giuseppina Caligiuri, Jamila, Marion, Corinne Legrand, Mathilde Varret, Matthieu Barbier, Marie-Sylvie, Min-ji, Christine Choqueux ainsi que *tous les membres de l'unité U1148* pour leur gentillesse et leur disponibilité.

Enfin, je pense aux personnes extérieures qui m'ont énormément soutenu dans ce travail :

A Jerem, parce que ma chanson est moins joyeuse sans couplet. Merci de me soutenir dans mes projets, tes mots d'encouragement m'inspirent et m'aident à avancer.

A mamacita, merci pour ta gentillesse et tes petites attentions qui me touchent beaucoup.

A mes parents et mes soeurs sans qui cela n'aurait été possible. Un immense merci à ma mère et à ma *sœur Claire* qui ont été présentes dès le début et sur qui je peux toujours compter. A Nhatrang et à la petite Jade qui me donne le sourire par sa joie et son espièglerie.



# Tables des matières

<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	1
<b>RESUME/ABSTRACT</b> .....	4
<b>LISTE DES ABBREVIATIONS</b> .....	6
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	8
<b>INTRODUCTION</b> .....	11
<b>L'athérosclérose</b> .....	13
<b>I. Structure de la paroi artérielle</b> .....	13
1. L'intima .....	13
2. La média .....	13
3. L'adventice.....	14
<b>II. Physiopathologie de l'athérosclérose</b> .....	15
1. Description générale .....	15
2. Classification des lésions .....	16
a. La strie lipidique.....	16
b. La lésion fibro-lipidique .....	16
c. Les lésions compliquées.....	16
d. Autres complications des lésions d'athérosclérose .....	17
<b>III. Mécanismes de formation de l'athérosclérose</b> .....	18
1. Epaissement de l'intima et rétention des LDL par les protéoglycans .....	18
2. Modification des LDL et réponse immunitaire.....	18
3. Migration et transition phénotypique de la CML.....	20
4. Formation de cellules spumeuses : Implication des macrophages et CML.....	21
5. Développement du centre nécrotique et formation de la chape fibreuse.....	22
6. Formation d'un thrombus.....	23

<b>IV. La transition phénotypique de la CML dans l'athérosclérose</b> .....	24
1. Plasticité de la CML et dédifférenciation.....	24
2. Marqueurs de l'état de différenciation de la CML .....	25
3. Phénotype de la CML dans l'athérosclérose .....	28
e. Migration et prolifération intimale .....	28
f. Formation de cellules spumeuses .....	29
g. Production de cytokines.....	29
h. Production de matrice extracellulaire et de MMP .....	30
i. Calcification .....	31
4. Facteurs impliqués dans la modulation phénotypique.....	32
a. Facteurs de signalisation solubles .....	32
b. Composants de la matrice extracellulaire .....	33
c. Facteurs physiques .....	33
d. Régulation moléculaires de l'expression des gènes.....	35
e. Origine embryologique et diversité phénotypique .....	37
<b>V. Facteurs de rupture de plaque</b> .....	37
<b>Les cristaux de cholestérol</b> .....	39
<b>I. Les cristaux de cholestérol dans la plaque d'athérosclérose</b> .....	39
1. Propriétés optiques des structures lipidiques retrouvées dans les lésions.....	39
2. Détection des cristaux solides de cholestérol.....	40
3. Implication des cristaux de cholestérol dans la rupture de plaque.....	41
4. Facteurs physiques influant sur l'état de cristallisation du cholestérol .....	44
<b>II. Métabolisme intracellulaire du cholestérol</b> .....	45
1. Stockage et efflux du cholestérol.....	45
2. Formation de cellules spumeuses.....	47
3. Mort des cellules spumeuses et induction de l'autophagie.....	48
<b>III. Formation de cristaux in vitro</b> .....	49
<b>Le syndécan-1</b> .....	51
<b>I. La familles des syndécans</b> .....	51
1. Structure.....	51

2. Régulation de l'activité par le shedding .....	54
<b>II. Rôle du syndécan-1 en physiopathologie.....</b>	<b>55</b>
1. Inflammation .....	56
2. Cancer.....	56
a. Croissance des cellules cancéreuses et apoptose .....	57
b. Invasion cellulaire et métastase .....	57
c. Angiogenèse tumorale .....	57
3. Maladies infectieuses .....	58
4. Syndécan-1 et pathologie cardio-vasculaire .....	58
a. Fibrose cardiaque .....	58
b. Anévrismes de l'aorte abdominale.....	59
c. Artériogenèse post-ischémique .....	59
5. Syndécan-1 et métabolisme des lipoprotéines.....	59
6. Syndécan-1 et physiologie de la CML .....	61
<b>Objectifs de la thèse .....</b>	<b>63</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>65</b>
<b>Partie I .....</b>	<b>67</b>
<b>Syndecan-1 is overexpressed in early atheromatous aortas and is involved in smooth muscle cell phenotypic changes.....</b>	<b>69</b>
<b>Partie II .....</b>	<b>105</b>
<b>Cholesterol crystallisation in human atherosclerosis is triggered in smooth muscle cells during the transition from fatty streaks to fibroatheroma .....</b>	<b>106</b>
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>145</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>157</b>

## Résumé

L'athérosclérose est un processus d'évolution lente, dont les premières étapes sont marquées par le dépôt de lipoprotéines de basse densité (LDL) dans l'intima des artères. Les études histologiques montrent que les cellules musculaires lisses (CML) sont prépondérantes dans l'intima des lésions précoces et qu'elles ont un rôle critique dans le développement des lésions. A l'inverse des CML saines de la média qui présentent un phénotype contractile, certaines CML de l'intima sont caractérisées par la synthèse de matrice extracellulaire, associée à une migration et une prolifération augmentées. Comme les macrophages, une fraction de ces CML peut internaliser les LDL et participe à la formation de cellules spumeuses.

Dans ce travail, nous avons cherché à déterminer le rôle du syndécan-1 dans la modulation du phénotype de la CML. Nous avons mis en évidence une surexpression du syndécan-1 par les CML intimales lors des stades précoces de l'athérosclérose. Dans le but de déterminer l'effet de cette surexpression, nous avons élaboré un vecteur lentiviral codant le syndécan-1 afin de le surexprimer dans les CML en culture. Nos résultats montrent qu'en réponse au transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ), les CML surexprimant le syndécan-1 présentent une augmentation amplifiée des gènes du collagène de type I et de certains marqueurs de fonction contractile incluant la SM  $\alpha$ -actine, la calponine et la smootheline.

Un autre volet de l'étude s'est intéressé à l'origine des cristaux de cholestérol (CCs) dans les lésions. Fréquemment retrouvés dans les lésions avancées, les études montrent que ces CCs pourraient induire mécaniquement la rupture de la plaque. Par l'analyse de coupes d'aortes fraîches, nous avons observé que les CCs apparaissent au stade de la lésion fibrolipidique et qu'ils sont associés à la présence de CML mortes. In vitro, les CML chargées en cholestérol sont capables de produire des cristaux, un processus qui est accéléré par la présence de collagène de type I et par l'inhibition de l'autophagie et de l'estérfication du cholestérol. Nous avons montré que le collagène de type I entraîne une diminution de p62 et une augmentation de Niemann-Pick C1, suggérant qu'il module l'expression de gènes associés à l'autophagie et au trafic du cholestérol.

L'ensemble de ce travail ouvre ainsi de nouvelles perspectives quant à l'identification des mécanismes initiant la modulation du phénotype de CML, et aux conséquences de cette modulation au niveau de la lésion.

## Abstract

Atherosclerosis is a chronic pathological process that is characterized, in the earliest stage, by low density lipoproteins (LDL) accumulation within the arterial intima. Evidences show that smooth muscle cells (SMCs) are preponderant in the intima of early lesions and play a major role in lesions development. Whereas medial SMCs are involved in the contractile function, intimal SMCs are characterized by increased proliferation and migration, loss of contractile markers, and extracellular matrix production. Like macrophages, these SMCs have the capacity to internalize LDL and become foam cells.

In this work, we explored syndecan-1 role in SMCs phenotypic modulation. We show that syndecan-1 expression is increased in intimal SMCs of early lesions. To determine the effect of this overexpression in SMCs in vitro, we elaborated the construction of a lentiviral vector encoding syndecan-1 cDNA. Our results demonstrate that syndecan-1 amplifies the up-regulation of type I collagen, SM  $\alpha$ -actin, calponin, and smoothelin mRNA expression, induced by TGF- $\beta$ .

In the second part of our work, we investigated cholesterol crystals (CCs) formation in atherosclerotic lesions. Besides to being a major component of the atheromatous core, studies have shown that CCs could promote plaque rupture by causing mechanical damage. Our observations of fresh aortas revealed that CCs first appeared at the fibroatheroma transition and are associated with the death of SMC. Cholesterol-loaded human SMCs were capable of producing CCs in vitro, a process that was enhanced by type I collagen and by inhibition of autophagy and cholesterol esterification. We found that type I collagen leads to a decrease in the expression of p62, and an increase in Niemann-Pick C1, suggesting that collagen induces changes in genes relating to regulation of intracellular cholesterol levels and localization.

In conclusion, this work described a novel candidate potentially implicated in SMCs phenotypic modulation, and the important consequences of this modulation in lesions development.

## Liste des abréviations

3-MA : 3-méthyladénine

### A

AAA : Anévrisme de l'Aorte Abdominale

ABC transporter : ATP Binding Cassette  
Transporter

ABCA1 : ATP Binding Cassette, sub-family  
A, member 1

ABCG1 : ATP-Binding Cassette G1

ACAT : Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase  
domain-containing protein 17

Apo A-1 : Apolipoprotein A-1

Apo B : Apolipoprotein B

Apo E : Apolipoprotein E

ATPase  $Na^+ K^+$  : Adenosine Triphosphatase  
Sodium Potassium

### C

CCs : Cristaux solides de cholestérol

CD68 : Cluster of Differentiation 68

CD36 : Cluster of Differentiation 36

CEH : Cholesterol Ester Hydrolase

CHO cell : Chinese Hamster Ovary

CL : Cholestérol Libre

CML : Cellule Musculaire Lisse

CTGF : Connective Tissue Growth Factor

### F

Fas : Apoptosis Stimulating Fragment

FGF : Fibroblast Growth Factor

FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor

### G

GAG : Glycosaminoglycan

GTPase : Guanosine Triphosphate hydrolase

### H

HDL : High Density Lipoprotein

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HPV : papillomavirus humain

Hs-CRP : high sensitivity C-Reactive Protein

HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycan

### I

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule 1

IFN- $\gamma$  : Interferon gamma

IL1- $\beta$  : Interleukin-1 beta

IL8 : Interleukin-8

### K

KO : Knock-out

### L

LC3-I : microtubule-associated protein 1 light  
chain 3

LDL : Low Density Lipoprotein

LDLox : LDL oxydées

LDLR : Low Density Lipoprotein Receptor

LOX-1 : Lectin-like Oxidized low-density  
lipoprotein receptor 1

LPL : Lipoprotein Lipase

LRP-1 : Low density lipoprotein receptor-  
related protein 1

## **M**

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1

MEC : Matrice Extracellulaire

MIF : Macrophage Inhibitory Factor

MMP : Matrix Metalloproteinase

MT1-MMP : Membrane type-1 matrix metalloproteinase

MT3-MMP3 : Membrane type-3 matrix metalloproteinase

## **N**

NDST1 : N-deacetylase/N-sulfotransferase 1

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

NO : Monoxyde d'azote

NPC1 : Niemann-Pick disease type C1

NPC2 : Niemann-Pick disease type C2

## **P**

PDGF : Platelet-derived Growth Factor

PDZ : PDZ domaine

Pi : Phosphate inorganique

PIP2 : Phosphatidyl inositol diphosphate

PKC $\alpha$  : Protein kinase C-alpha

## **R**

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

## **S**

S100 A9/A10 : S100 calcium binding protein A9 / A10

SDS : Sodium Dodecylsulfate

SM  $\alpha$ -actine : Smooth Muscle alpha actin

SM1 et SM2 : Isoformes de SM MHC 1 et 2

SM MHC : Smooth Muscle Myosin heavy chain

SM22 $\alpha$  : Smooth Muscle 22-alpha

SM emb : Smooth Muscle embryonic

SR-A 1 et 2 : Scavenger Receptors type 1 and 2

SRB-1: Scavenger Receptor class B type 1

Src-kinase

SRF : Serum Response Factor

## **T**

TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor-beta

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor-alpha

TRL : Triglyceride-rich Lipoprotein

## **V**

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VEGF : Vascular Endothelium Growth Factor

VLDL : Very Low Density Lipoprotein

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Représentation schématique de la paroi artérielle.....	14
<b>Figure 2</b> : Les stades évolutifs de l'athérosclérose humaine .....	17
<b>Figure 3</b> : Modèle de réponse à la rétention .....	19
<b>Figure 4</b> : Réponse inflammatoire induite par les LDL oxydées.....	20
<b>Figure 5</b> : Rupture de la plaque .....	23
<b>Figure 6</b> : Modulation phénotypique de la CML vasculaire.....	25
<b>Figure 7</b> : Diversité des phénotypes exhibés par la CML dans l'athérosclérose .....	31
<b>Figure 8</b> : Forces appliquées sur la paroi artérielle.....	34
<b>Figure 9</b> : Récapitulatif des facteurs impliqués dans la modulation phénotypique de la CML .....	35
<b>Figure 10</b> : Régulation de l'expression des gènes de l'axe CARG-myocardine-SRF .....	36
<b>Figure 11</b> : Etats physiques des lipides retrouvés dans les lésions athéromateuses .....	39
<b>Figure 12</b> : Représentation de la structure des inclusions riches en esters de cholestérol .....	40
<b>Figure 13</b> : Traces de cristaux de cholestérol sur une coupe histologique de plaque carotidienne .....	41
<b>Figure 14</b> : Cristallisation du cholestérol et formation d'aiguilles .....	42
<b>Figure 15</b> : Modèle de rupture de plaque induite par les cristaux de cholestérol .....	44
<b>Figure 16</b> : Métabolisme intracellulaire du cholestérol .....	47
<b>Figure 17</b> : La famille des quatre syndécans .....	52
<b>Figure 18</b> : Le clivage des syndécans .....	55
<b>Figure 19</b> : HSPGs et métabolisme des lipoprotéines .....	61
<b>Tableau 1</b> : Marqueurs de différenciation de la CML .....	27





# INTRODUCTION



# L'athérosclérose

---

Les maladies cardio-vasculaires représentent, avec 30% des décès, l'une des principales causes de mortalité mondiale. Dans la majorité des cas, les accidents ischémiques aigus tels que l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral, sont la traduction clinique de l'athérosclérose. Ce processus pathologique, caractérisé par le dépôt de plaques sur la paroi artérielle, est responsable de l'obstruction des vaisseaux conduisant à l'ischémie des organes distaux.

## I. Structure de la paroi artérielle

La paroi artérielle est constituée de trois tuniques concentriques, qui de la lumière vers la périphérie de l'artère sont : l'intima, la média, et l'adventice (Figure 1).

### 1. L'intima

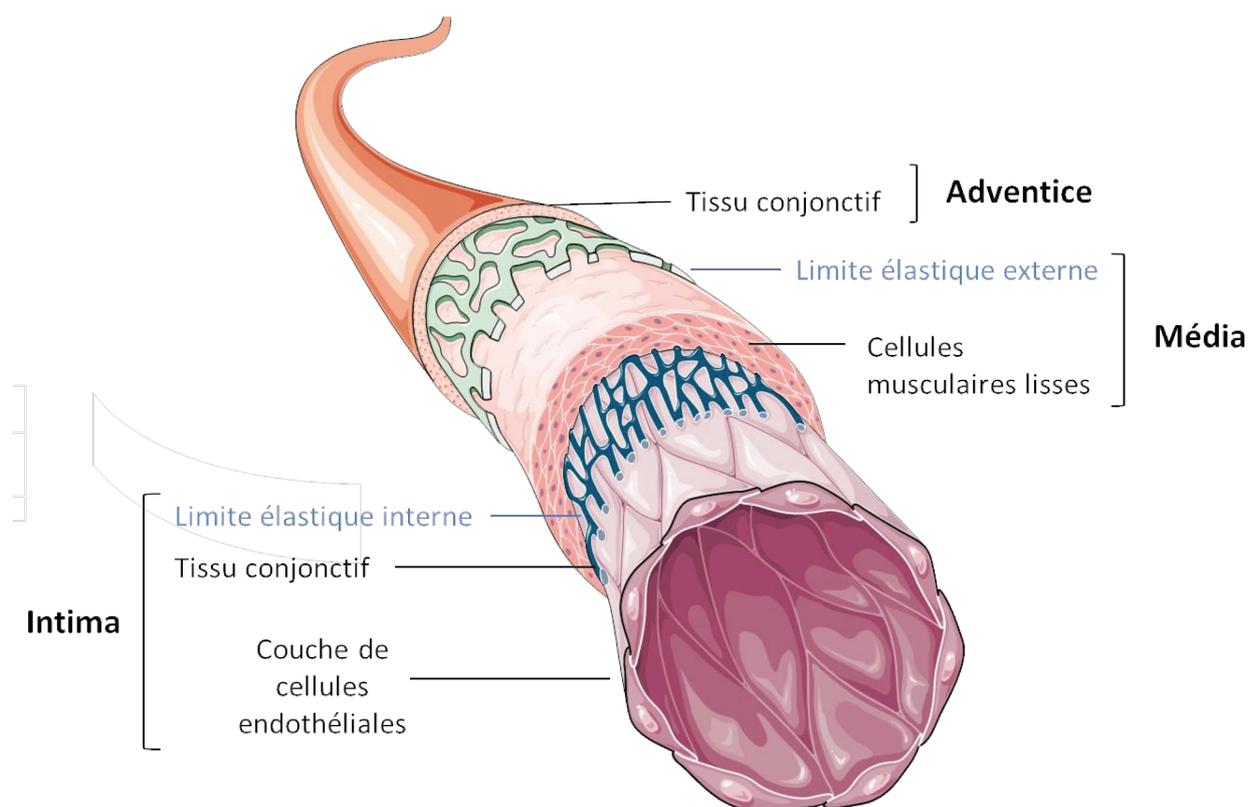
L'intima est la couche interne de la paroi artérielle, directement en contact avec le flux sanguin. A l'état normal, cette tunique est fine et à peine visible en microscopie optique. Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales étroitement jointes qui reposent sur une membrane basale, et plus en profondeur sur la couche sous-endothéliale constituée de matrice extracellulaire (MEC). Cette couche sous-endothéliale est le site initial de développement de l'athérosclérose.

### 2. La média

La média est la tunique la plus épaisse à l'état normal. Elle est constituée essentiellement de cellules musculaires lisses (CML), empilées en couches appelées unités lamellaires. Chaque unité lamellaire est composée de CML entourées de MEC, en particulier des collagènes fibrillaires et des fibres élastiques. L'élasticité de la média permet à l'artère de modifier son calibre et son état de tension, donc le niveau de pression du sang en se contractant et en se dilatant. Elle est séparée de l'intima par la limitante élastique interne et de l'adventice par la limitante élastique externe.

### 3. L'adventice

L'adventice est la tunique externe qui ancre le vaisseau dans les tissus voisins. C'est un tissu lâche et peu organisé, riche en collagène et fibres élastiques, et contenant des fibroblastes. Elle est irriguée par des micro-vaisseaux appelés vasa vasorum, qui assurent la nutrition de l'adventice et de la partie externe de la média. Dans les états pathologiques épaississant l'intima, on observe une néo-angiogenèse avec pénétration des vasa vasorum dans la média et l'intima pathologique, comme dans le cas de la vascularisation de la plaque d'athérosclérose. Dans l'adventice cheminent également des fibres nerveuses qui rejoignent le muscle lisse de la média.



**Figure 1 : Représentation schématique de la paroi artérielle**, composé de trois couches : l'intima, la média et l'adventice. (Illustration tiré de Servier Medical Art Gallery)

## II. Physiopathologie de l'athérosclérose

### 1. Description générale

L'athérosclérose se caractérise par le dépôt progressif de plaques d'athérome sur la paroi des artères. C'est un processus pathologique distinct du vieillissement vasculaire, qui débute dès le plus jeune âge et tend à évoluer. Les lésions débutantes ressemblent à de simples trainées de dépôts lipidiques sur la paroi de l'artère. Les plaques d'athérome surviennent dans un second temps, et ont deux composantes : un cœur lipidique riche en cholestérol et débris cellulaires, et une chape fibreuse dure contenant des fibres de collagène. En référence à la dualité de ces plaques, le terme « athérosclérose », a été proposé en 1904 par Felix Marchand à partir des mots grecs *athara* qui veut dire « bouillie de farine », et *skléros*, signifiant « dur ».

La formation et le développement de ces plaques résultent d'interactions complexes, faisant intervenir les éléments du sang circulant incluant les lipoprotéines et les macrophages dérivés de monocytes, et les composants de la paroi artérielle. Dans la plupart des cas, les plaques d'athérome sont asymptomatiques. Cependant, l'épaississement progressif d'une plaque peut provoquer un rétrécissement de la lumière artérielle (sténose) qui gêne le passage du sang et donc l'apport en oxygène à l'organe qu'elle irrigue. A terme, certaines plaques se fragilisent, rompent et exposent leur contenu thrombogène au sang circulant. Le thrombus formé peut ainsi obstruer localement le vaisseau ou être transporté par la circulation sanguine et provoquer l'ischémie d'un organe situé en aval.

Les manifestations cliniques de l'athérosclérose sont multiples et fonction de l'organe touché. La sténose des artères coronaires est à l'origine des angines de poitrine. Les conséquences d'une rupture de plaque sont quant à elles dépendantes du territoire ischémié par le thrombus : myocarde, cerveau, membres inférieurs ou intestin.

Les facteurs de risques, déterminés lors d'études épidémiologiques, font intervenir des facteurs génétiques non modifiables (âge, genre, hérédité), des habitudes de vie modifiables (alimentation riche en sucre et graisse, tabac, sédentarité) et des situations pathologiques modifiables dans une certaine mesure (hypercholestérolémie, diabète, obésité, hypertension).

Bien que l'hypercholestérolémie soit un facteur de risque, le risque athérogène ne dépend pas tant du cholestérol en lui-même, mais de la nature des lipoprotéines auxquelles il est associé. On distingue deux grandes classes de lipoprotéines aux propriétés antagonistes. Alors que les lipoprotéines de basse densité (LDL) exercent un effet athérogène en favorisant le dépôt de cholestérol dans les artères, les lipoprotéines de haute densité (HDL) ont plutôt un effet protecteur en ramenant le cholestérol en excès

des tissus périphériques vers le foie. De ce fait, le risque cardiovasculaire est proportionnel aux taux des LDL et inversement proportionnel aux taux des HDL.

## **2. Classification des lésions**

La description moderne de l'athérosclérose retient trois stades évolutifs : la strie lipidique, la lésion fibro-lipidique, et la lésion compliquée (Figure 2) [1].

### **a. La strie lipidique**

Les stries lipidiques apparaissent dès l'enfance. Ce sont les premières lésions visibles, qui se présentent sous la forme de traînées jaunâtres allongées dans le sens du flux sanguin. Elles sont formées par l'accumulation de macrophages et de CML qui se sont chargés de lipides, devenant des cellules spumeuses. Ces cellules spumeuses sont disposés en couches stratifiées dans la couche sous-endothéliale de l'intima [2].

### **b. La lésion fibro-lipidique**

A un stade plus avancé, une chape fibreuse vient entourer le centre lipidique, donnant naissance à la plaque fibro-lipidique. Le centre lipidique contient les cellules spumeuses et des lipides extra-cellulaires, ainsi que des débris cellulaires, et cristaux de cholestérol. La chape fibreuse est constituée majoritairement de CML qui ont migré de la média vers l'intima, et d'une abondante MEC comprenant du collagène et des glycosaminoglycanes (GAGs). Macroscopiquement, les plaques fibro-lipidiques se présentent comme un nodule blanchâtre surélevant l'endothélium, de consistance ferme, contenant à la coupe un matériel grumeleux, la bouillie athéromateuse, enkysté dans une coque fibreuse. En se développant, cette lésion peut engendrer une réduction de plus en plus importante de la lumière artérielle, et conduire à la sténose.

### **c. Les lésions compliquées**

Les lésions compliquées sont associées à de graves complications cliniques :

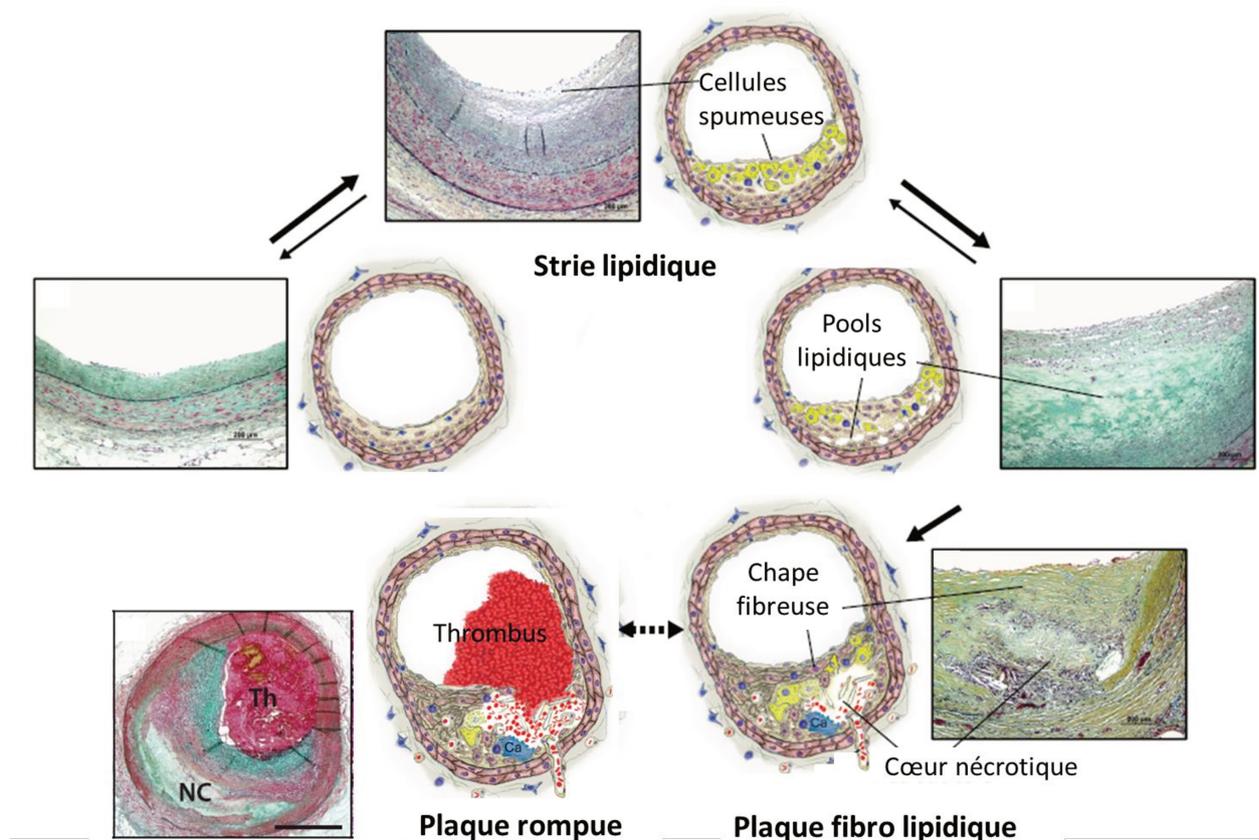
L'ulcération se traduit par une rupture de l'endothélium, mettant en contact le sang circulant et le contenu de la plaque, ce qui aboutit à la formation d'un thrombus. L'ulcération peut aussi provoquer la libération de matériel athéromateux ou de cristaux de cholestérol dans la circulation, causant des embolies [3] [4]. Les hémorragies intra-plaque sont liées soit à la pénétration de sang circulant dans le centre de la plaque après ulcération, soit à la rupture des vasa vasorum nés d'une néovascularisation qui s'étend à partir de l'adventice vers la plaque. Ces hémorragies entraînent une augmentation brutale

du volume de la plaque, rétrécissant la lumière artérielle. Souvent, la cicatrisation permet de stabiliser le thrombus ou l'hémorragie intra-plaque, mais dans certains cas, ces lésions compliquées peuvent engendrer des conséquences cliniques liées à la souffrance du tissu ischémié [5].

A ces phénomènes s'ajoutent des processus de calcification qui durcissent la plaque. La calcification vasculaire se fait selon un mécanisme similaire à la formation de l'os. Lors de ce processus, les CML perdent leurs caractéristiques pour se différencier et favoriser le dépôt de calcium dans la plaque.

#### d. Autre complication des lésions d'athérosclérose

D'autres complications intéressent une autre tunique artérielle, notamment la média dans le cas des anévrismes. Les anévrismes sont définis comme un élargissement du calibre artériel avec perte du parallélisme des bords. Les lésions anévrismales sont dominées par un amincissement de la média, avec perte des CML remplacées par de la fibrose. L'athérosclérose est étroitement liée au développement des anévrismes aortiques surtout au niveau abdominal.



**Figure 2. Les stades évolutifs de l'athérosclérose humaine.** Les stries lipidiques sont les premières lésions, caractérisées par l'accumulation de cellules spumeuses. Elles évoluent en plaques fibro-lipidiques, qui associent

au centre lipidique une chape fibreuse. Avec l'élargissement du cœur nécrotique, ces plaques se fragilisent et peuvent rompre, ce qui conduit à la formation d'un thrombus. (Adapté de Bentzon et al [5])

### **III. Mécanismes de formation de l'athérosclérose**

#### **1. Épaississement de l'intima et rétention des LDL par les protéoglycans**

Avant même le développement de l'athérosclérose, certaines régions des artères présentent une intima plus épaisse. Ces régions, décrites par Nakashima comme un « épaissement diffus de l'intima », contiennent des protéoglycans en abondance ainsi que des CML et de l'élastine. Aucun dépôt lipidique n'est présent, et on observe dans certains cas quelques macrophages isolés dans la couche superficielle [6]. Bien que les mécanismes précis ne soient pas connus, Stary a suggéré que l'épaississement de l'intima représentait une adaptation physiologique aux contraintes mécaniques [7].

Il est généralement considéré que l'épaississement diffus de l'intima constitue un précurseur des lésions d'athérosclérose avancées. L'accumulation des lipoprotéines athérogènes dans l'intima, en particulier les LDL, est une étape essentielle dans le développement de l'athérosclérose. Nakashima a montré que ces régions enrichies en protéoglycans piègent les lipoprotéines extra-cellulaires, ce qui favorise leur accumulation dans l'intima (Figure 3) [8]. Les protéoglycans portent en effet des chaînes de GAGs qui interagissent avec les composants protéiques des lipoprotéines, notamment les apolipoprotéines B et E, via des interactions électro-statiques [9]. L'infiltration des macrophages est subséquente au dépôt de lipides. Ces résultats renforcent l'hypothèse de « réponse à la rétention » établie en 1995 par Williams et Tabas, dans laquelle la rétention de lipoprotéines par les protéoglycans de l'espace sous-endothélial serait l'évènement initial de l'athérogenèse [10].

Bien que tous les protéoglycans se lient aux lipoprotéines *in vitro*, les études histologiques identifient le biglycan comme étant le protéoglycan majeur impliqué dans la rétention des LDL [11].

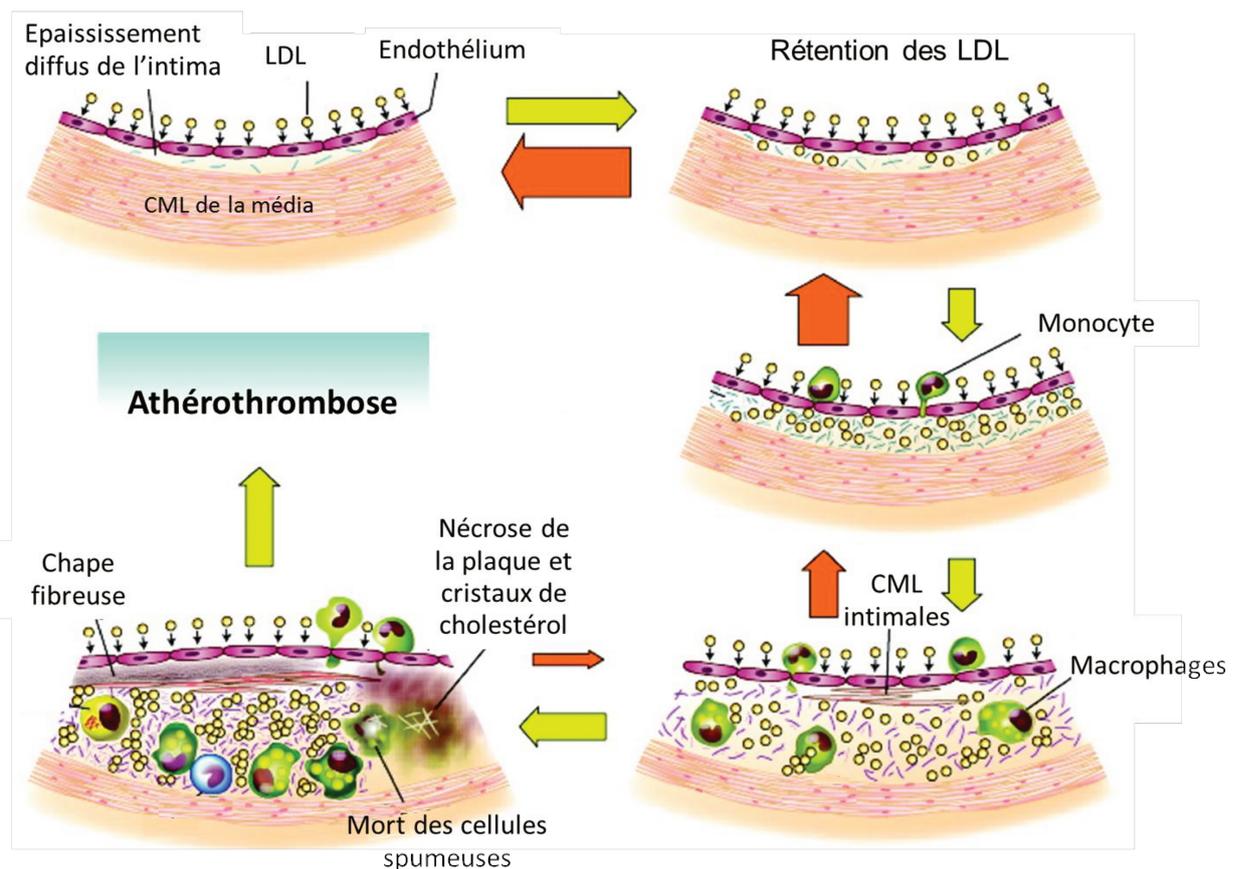
#### **2. Modification des LDL et réponse immunitaire**

Suite à leur rétention dans la matrice extra-cellulaire, les LDL sont exposés à des agents oxydants et des enzymes qui vont conduire à des LDL oxydées et agrégées [12]. Ces LDL modifiées jouent les stimulateurs des réponses immunitaires.

Les LDL oxydées activent les cellules endothéliales en induisant l'expression de molécules d'adhérence et de chimiokines, ce qui conduit à l'infiltration de monocytes et de lymphocytes dans l'espace sous-endothélial (Figure 4) [13]. Une fois entrées dans l'intima, les monocytes acquièrent les caractéristiques morphologiques des macrophages. Le recrutement de monocytes dans la paroi

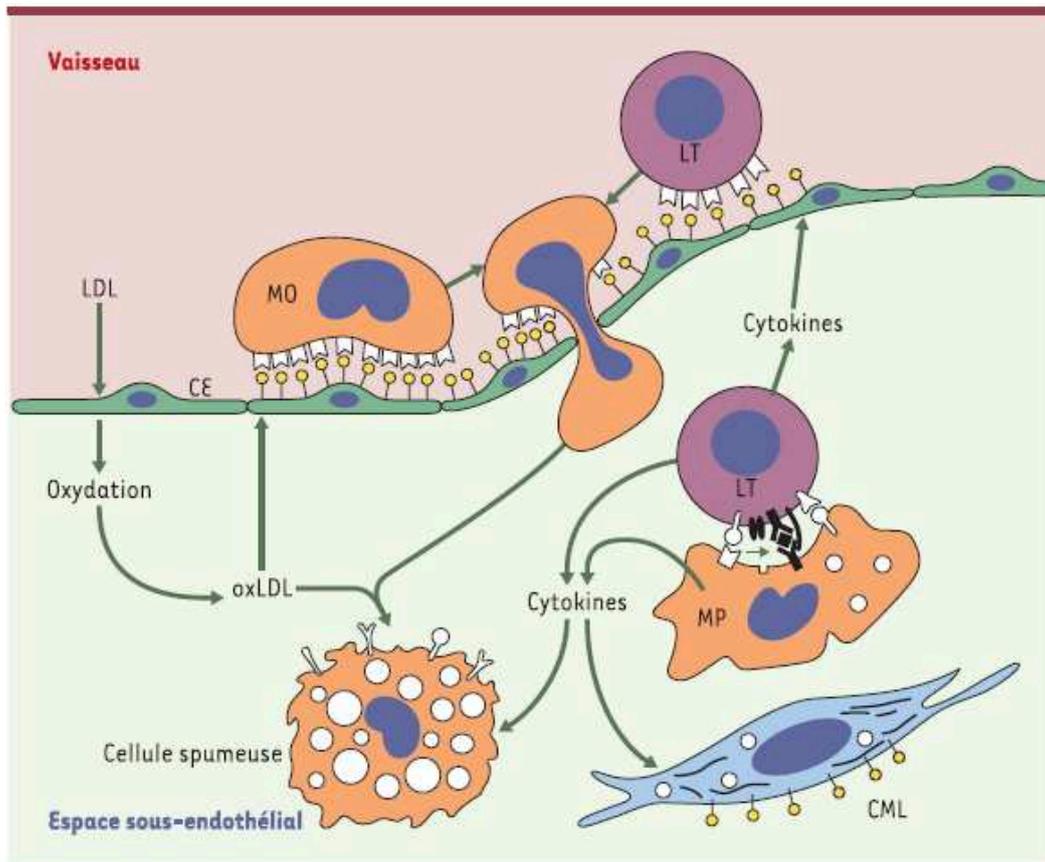
artérielle et leur différenciation en macrophages servent initialement une fonction protectrice, puisque leur rôle est d'éliminer les particules de LDL oxydées pro-inflammatoires et les cellules apoptotiques. Mais l'accumulation progressive des macrophages, qui internalisent les LDL oxydées de manière non régulée et deviennent spumeux, contribue finalement au développement de l'athérosclérose [14].

Des lymphocytes T sont également recrutés, alertés par les cytokines sécrétées par les macrophages, et par des molécules d'adhérence et chimiokines exprimées par les cellules endothéliales et CML activées. Ces lymphocytes reconnaissent des peptides antigéniques portés par les LDL oxydées, qui peuvent être présentés par les macrophages locaux. Cette stimulation antigénique conduit à la sécrétion de cytokines, entraînant des effets importants sur le devenir des plaques précoces, et l'évolution des plaques compliquées [15] [16]. Mis à part leur rôle de cellules spumeuses et présentatrices d'antigènes, les macrophages présents dans l'athérome sécrètent également des facteurs de croissance agissant sur la prolifération des CML.



**Figure 3. Modèle de réponse à la rétention.** L'athérogenèse est initiée par la rétention de LDL dans l'espace sous-endothélial par les protéoglycans de la MEC. Ces LDL sont modifiées et entraînent une série de réponses biologiques qui initie un processus inflammatoire. L'accumulation de cellules spumeuses, par l'internalisation

des LDL oxydées par les macrophages et CML, conduit à la formation d'un centre nécrotico-lipidique, qui s'entoure d'une chape fibreuse. (Adapté de Tabas et al [10])



**Figure 4. Réponse inflammatoire induite par les LDL oxydées.** Les LDL oxydées (oxLDL) activent les cellules endothéliales (CE), conduisant à l'entrée des monocytes (MO) et lymphocytes (LT). Les monocytes se différencient en macrophages (MP), qui internalisent les LDL oxydées, comme les CML. Les lymphocytes T (LT) reconnaissent des peptides des LDL oxydées présentés par les macrophages et sécrètent des cytokines, qui participent à modifier les caractéristiques des CML. (Tiré de Caligiuri et al [15])

### 3. Migration et transition phénotypique des CML

L'accumulation de lipoprotéines, l'activation endothéliale, ainsi que les réponses inflammatoires conduisent à la modulation du phénotype des CML. Durant ce processus, les CML quiescentes contractiles diminuent l'expression des marqueurs de fonction contractile, comme la smooth muscle alpha actine (SM  $\alpha$ -actine) et la myosine. Elles migrent de la média vers l'intima, où elles prolifèrent et acquièrent un phénotype sécrétoire, en augmentant leur production de MEC et protéoglycans [17].

Ce changement de phénotype est critique dans le développement des lésions. En sécrétant des protéoglycans, les CML de l'intima favorisent la rétention des LDL et leur oxydation subséquente. Elles participent également à l'accumulation de cellules spumeuses puisqu'elles internalisent les LDL modifiées comme les macrophages. La diversité des phénotypes exhibés par les CML, ainsi que les mécanismes conduisant à la transition phénotypique, seront développés dans un paragraphe dédié.

#### **4. Formation de cellules spumeuses : implication des macrophages et des CML**

Contrairement aux LDL natives, dont l'internalisation est soumise à un contrôle négatif strict, les LDL modifiées sont internalisées de manière non régulée. Elles s'accumulent alors dans le cytoplasme des cellules, conduisant à la formation de cellules spumeuses.

Les LDL modifiées reconnues par les récepteurs scavengers incluent les LDL oxydées, acétylées, et les LDL enzymatiquement altérées. Les LDL agrégées sont internalisées par phagocytose médiée par le LDLR, ou par une voie indépendante des récepteurs. L'expression des récepteurs scavengers et récepteurs aux LDL a été décrite aussi bien dans les macrophages et les CML. Les macrophages expriment une variété de récepteurs incluant les récepteurs scavengers de classe A (SR-A) de types I et II, Cluster of differentiation 36 (CD36), Lectin-like Oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1), et Cluster of Differentiation 68 (CD68) [18]. Chaque récepteur scavenger dispose d'une spécificité large, bien qu'il ait une préférence pour certains ligands. Comme les macrophages, il a été rapporté que les CML expriment les récepteurs scavengers de classe A et CD36 [19]. La tendance des CML à accumuler le cholestérol apparaît cependant être variable selon leur phénotype. L'expression de récepteurs scavengers étant plus forte dans les CML intimaux comparé aux CML de la média, la transition phénotypique semble critique à leur transformation en cellules spumeuses.

Dans les macrophages comme dans les CML, des processus tels que l'internalisation des lipoprotéines, le stockage et l'hydrolyse du cholestérol, ainsi que son efflux, participent à l'homéostasie du cholestérol intracellulaire. Ces phénomènes, qui seront décrits en détail ultérieurement, contribuent à la balance entre l'accumulation de cholestérol provenant des lipoprotéines athérogènes, et la sortie de ce cholestérol des cellules. En condition athérogène, la dérégulation de ces mécanismes favorise la formation de cellules spumeuses [20].

La contribution des macrophages et des CML à la population de cellules spumeuses n'a pas été clairement élucidée. Le marqueur CD68, habituellement utilisé pour caractériser les macrophages dans les lésions, a été montré être également exprimé par des CML chargées en cholestérol [19] [21]. Ces observations montrent que des cellules spumeuses identifiées comme des macrophages par immunomarquage dans les plaques d'athérome humaines pourraient en fait être dérivées de CML. D'un autre côté, les macrophages peuvent, sous certaines conditions, exprimer des marqueurs de CML comme la SM  $\alpha$ -actine [22]. Le manque de marqueurs spécifiques d'un seul type cellulaire rend donc difficile l'identification de l'origine des cellules spumeuses.

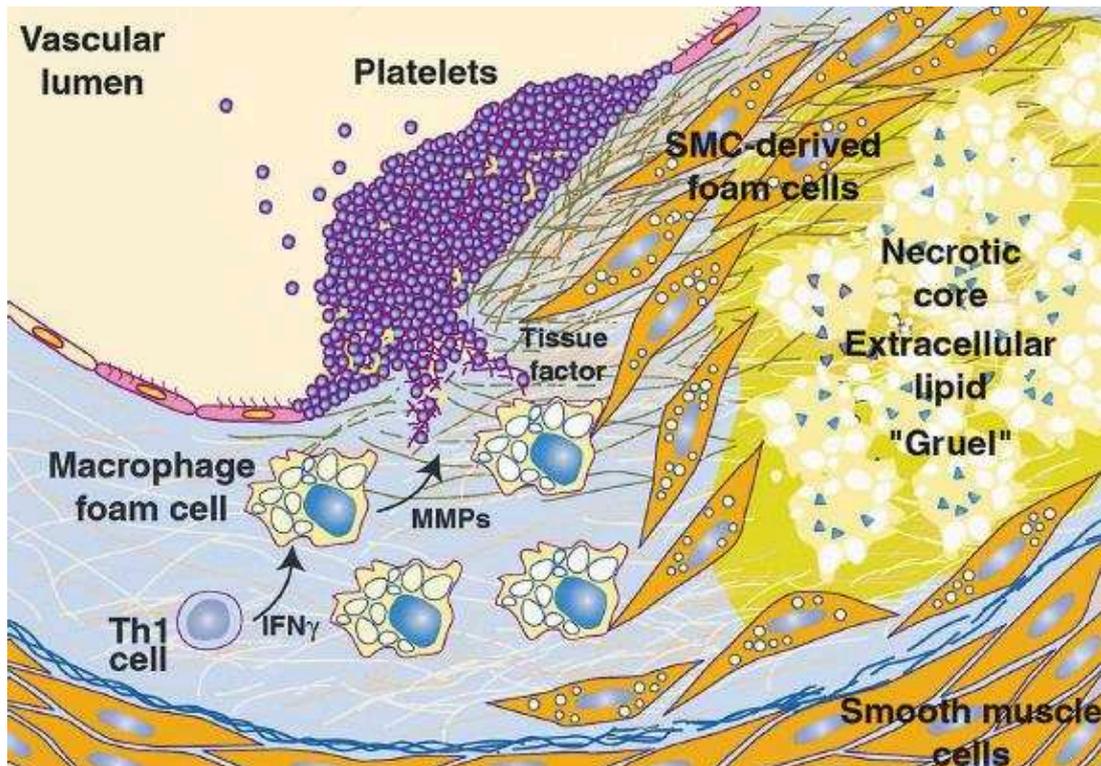
## 5. Développement du centre nécrotique et formation de la chape fibreuse

Suite à l'accumulation de cellules spumeuses, un centre lipidique se forme. Le centre lipidique se constitue de cellules parfois mortes, dont les macrophages et CML, et de lipides extracellulaires sous forme de cristaux de cholestérol, d'esters de cholestérol et de phospholipides. Avec l'évolution de la lésion, le nombre de cellules mortes et la lyse cellulaire augmentent, ce qui aboutit à la genèse d'un cœur nécrotique. L'apoptose, ainsi que la nécrose secondaire des cellules spumeuses et des CML sont une cause importante de développement d'un cœur nécrotique. De nombreux facteurs capables d'induire l'apoptose sont présents dans les plaques, parmi lesquels les lipides, puisqu'il a été montré qu'un chargement excessif des cellules avec du cholestérol libre induit l'apoptose [23].

Par ailleurs, alors que les cellules et corps apoptotiques sont rapidement éliminés par les phagocytes tissulaires en condition physiologique, cette épuration est ralentie dans la plaque d'athérome. Ces processus conduisent à l'expansion d'un cœur nécrotique caractéristique des plaques avancées, qui contribue à la rupture de plaque et à la thrombose (Figure 5).

Progressivement, une couche de tissu fibreux encapsule le centre nécrotique contenant les cellules mortes. Cette chape fibreuse est constituée d'une matrice qui contient des fibres de collagène de type I et III, des glycoprotéines dont la fibronectine, et des GAGs. Ce tissu est principalement produit par les CML de l'intima, en l'absence de fibroblastes qui sont les cellules habituellement impliquées dans la réparation tissulaire. Le processus diffère ainsi d'une réponse pro-fibrotique normale à l'injure. Les phénomènes de dédifférenciation, migration et prolifération des CML sont importants dans la constitution de la chape fibreuse.

L'épaisseur de la chape fibreuse diffère selon les plaques, et traduit la balance entre prolifération et apoptose des CML, et entre synthèse et dégradation de la MEC. Elle constitue un élément déterminant de fragilisation de la plaque, puisqu'une chape fine associée à un large cœur lipidique est liée à un risque de rupture élevé. Les différents facteurs de vulnérabilité de plaque seront évoqués ultérieurement.



**Figure 5. Rupture de la plaque fibro-lipidique.** La mort des cellules spumeuses dérivées de macrophages et CML conduit à la formation d'un cœur nécrotique et l'accumulation de cholestérol extracellulaire. Une chape fibreuse entoure le cœur nécrotique. La sécrétion de MMPs contribue à fragiliser la chape fibreuse. La rupture de plaque expose les composants du sang au facteur tissulaire, initiant la coagulation, le recrutement des plaquettes et la formation du thrombus. (Tiré de Glass et al [14])

## 6. Formation du thrombus

Lors de la rupture de la chape fibreuse, les constituants du cœur nécrotico-lipidique (facteur tissulaire et molécules pro-agrégantes) rencontrent les éléments du sang circulant, et initient le processus thrombotique.

Les premières étapes de formation du thrombus consistent en l'activation et l'agrégation des plaquettes sanguines au niveau de la plaque lésée. Les plaquettes adhèrent au collagène et autres facteurs du sous-endothélium par l'intermédiaire de leurs glycoprotéines membranaires. En réponse à ces interactions, les plaquettes s'activent. L'agrégation plaquettaire se fait grâce au fibrinogène qui établit des ponts entre les plaquettes, créant un premier thrombus fragile. Grâce à la libération des enzymes et contenu granulaire des plaquettes, d'autres plaquettes sont recrutées.

La coagulation, initiée par le facteur tissulaire, met en jeu une cascade de réactions enzymatiques. Elle conduit à la formation d'un réseau de fibrine qui va stabiliser l'agrégat plaquettaire. La génération de

thrombine a un rôle important dans ce phénomène. En clivant le fibrinogène en fibrine, la thrombine permet la formation d'un caillot fibrinoplaquettaire stable.

#### **IV. La transition phénotypique de la CML dans l'athérosclérose**

Il est établi que les CML ont un rôle critique dans l'évolution des lésions d'athérosclérose, de par leur implication dans divers processus tels que la formation des cellules spumeuses, ou le développement de la chape fibreuse. La modulation phénotypique de la CML, qui détermine ces processus, a été le sujet de nombreuses études et débats durant ces dernières années.

##### **1. Plasticité de la CML et dédifférenciation**

Dans les artères matures normales, les CML localisées dans la média sont des cellules quiescentes, fortement spécialisées et différenciées. Leur principale fonction est la contraction assurant le tonus et la vasomotricité des vaisseaux, indispensables au contrôle du débit sanguin des organes. Les CML contractiles contiennent peu d'organites dédiés à la biosynthèse et se caractérisent par un faible taux de migration et de prolifération. Elles expriment un répertoire unique de protéines contractiles du cytosquelette, de canaux ioniques, et de molécules de signalisation requises pour leurs propriétés contractiles [24].

L'état de différenciation de la CML est réversible, même chez l'adulte. La CML possède une remarquable plasticité et subit des changements réversibles de son phénotype permettant une adaptation rapide à un environnement fluctuant.

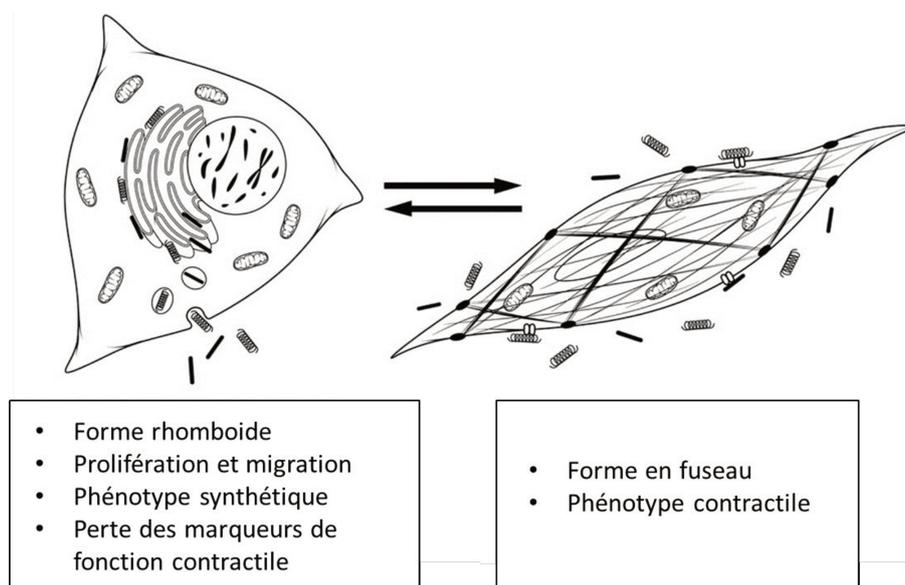
A l'état physiologique, la plasticité de la CML est observée lors du développement et du remodelage vasculaire. Durant la morphogenèse du vaisseau sanguin, la CML présente un taux élevé de prolifération et de migration, alors qu'elle acquière dans le même temps ses propriétés contractiles. Elle synthétise les composants de la MEC tels que le collagène, l'élastine et les protéoglycans, constituant une majeure partie de la paroi vasculaire. De façon similaire, en réponse à une lésion vasculaire, la CML augmente son taux de prolifération, de migration, et sa capacité synthétique afin de favoriser la réparation tissulaire. Après résolution de la lésion et un retour aux conditions physiologiques normales, les CML acquièrent de nouveau une fonction contractile.

Dans ces situations, la prolifération et la migration sont des processus normaux et nécessaires. L'habilité de la CML à modifier son phénotype est une propriété qui est restée chez les organismes évolués puisqu'elle conférait un avantage sélectif. En effet, les mutations inhibant l'habilité de la CML

à participer à la réparation vasculaire étaient désavantageuses et n'ont pas persisté. Toutefois, la conséquence de ce degré de plasticité est qu'il prédispose la CML à modifier son phénotype en réponse à des signaux anormaux, ce qui conduit à l'acquisition de caractéristiques contribuant au développement de maladies. Les études montrent ainsi que la transition phénotypique de la CML joue un rôle majeur dans diverses pathologies telles que l'athérosclérose, l'hypertension, ou le cancer [25].

## 2. Marqueurs de l'état de différenciation de la CML

Bien qu'il existe plusieurs états intermédiaires de la CML, la transition phénotypique est généralement caractérisée par le passage d'un phénotype contractile à un phénotype synthétique (Figure 6). Alors que les CML contractiles sont fusiformes, les CML synthétiques ont une forme moins allongée et présentent une morphologie de type rhomboïde. Ces CML synthétiques sont dépourvues de filaments contractiles et contiennent un nombre plus élevée d'organites impliqués dans la synthèse protéique. Leur réticulum endoplasmique et leur appareil de Golgi se développent, ainsi que leur activité sécrétoire. Elles acquièrent la capacité à produire des cytokines et des facteurs de croissance, et de synthétiser une grande quantité de MEC. Par ailleurs, les CML synthétiques ont généralement des taux de prolifération et de migration plus élevés que les CML contractiles [26].



**Figure 6 : Modulation phénotypique de la CML vasculaire.** Les CML transitent d'un état différencié contractile, à un état dé-différencié caractérisé par la perte des propriétés contractiles et une augmentation de la prolifération, de la migration, et de l'activité sécrétoire. Alors que les CML contractiles ont une forme fusiforme (à droite), les CML de type synthétique (à gauche), présentent une morphologie rhomboïde. (Adapté de Milewicz et al [27] )

Une variété de gènes sélectifs et spécifiques ont été identifiés comme des marqueurs de l'état relatif de différenciation de la CML. Ces marqueurs incluent un grand nombre de protéines contractiles, comme l'actine, la myosine, la calponine, et la tropomyosine. Les CML différenciées expriment également des protéines faisant partie du cytosquelette et qui sont potentiellement impliquées dans la régulation de la contraction, telles que la transgeline, la caldesmone, la vinculine, la smootheline et la desmine. Toutes ces protéines présentent un certain degré de spécificité de la CML différenciée. Toutefois, ces marqueurs peuvent également être exprimés par d'autres cellules dans certaines conditions, à l'exception de l'isoforme de la myosine, qui apparaît être le marqueur le plus spécifique de la CML différenciée [28].

L'actine est l'un des premiers marqueurs de différenciation exprimé par la CML lors du développement [29]. C'est la protéine la plus abondante de la CML différenciée puisqu'elle représente 40% des protéines totales de la cellule. Bien qu'elle constitue un marqueur sélectif de la CML adulte en condition normale, elle peut être exprimée de façon transitoire par d'autres types cellulaires, incluant le muscle squelettique lors du développement, les cardiomyocytes dans le cas de cardiomyopathie, les fibroblastes lors de la réparation tissulaire, ou les cellules endothéliales durant le remodelage vasculaire [25]. Malgré cela, un grand nombre d'études ont associé l'expression de l'actine à une identification évidente d'une lignée CML.

De même, la plupart des marqueurs de CML sont exprimés sous certaines conditions par d'autres types cellulaires. Par exemple, la transgeline (ou SM22 $\alpha$ ) a un profil d'expression similaire à l'actine, puisqu'elle est exprimée dans le muscle cardiaque et squelettique lors du développement [30], mais aussi dans les fibroblastes stimulés par le transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) [31]. La myosine quant à elle, est une protéine motrice composée de 2 chaînes lourdes et 4 chaînes légères, qui intervient avec l'actine dans le processus de contraction musculaire. La chaîne lourde de la myosine est présente sous 2 isoformes : SM1 qui est retrouvé dans les CML vasculaires durant le stade fœtal et jusqu'à l'âge adulte, et SM2 qui apparaît après la naissance sur des CML différenciées.

Plutôt que de s'intéresser aux marqueurs supprimés lors de la transition d'un phénotype contractile à un phénotype synthétique, plusieurs laboratoires ont cherché à identifier les gènes apparaissant lors des stades intermédiaires. Nagai et son équipe ont identifié l'isoforme non musculaire de la myosine, SMemb, comme un marqueur efficace de la CML phénotypiquement modifiée [32]. Bien qu'il soit aussi exprimé par des lignées neuronales, ce marqueur semble être relativement spécifique aux CML embryonnaires ou dé-différenciées. Son expression est induite lors d'une lésion vasculaire et par les CML intimes des lésions d'athérosclérose [33].

Les principaux marqueurs utilisés pour caractériser l'état de différenciation de la CML sont reportés dans le tableau 1.

Nom	Fonction	Pattern d'expression et spécificité	Notes
Smooth muscle actin	Contraction	- Expression transitoire dans le muscle squelettique lors du développement  - Exprimé chez l'adulte par les CML, myofibroblastes, cellules endothéliales	Marqueur le plus couramment utilisé de la lignée CML
SM MHC (Myosine)	Contraction	Fortement spécifique des CML différenciées	Isoformes SM-2 rapidement perdu dans les CML en culture et les lésions intimes
Calponine	- Interaction avec l'actine, régulation de la contraction  - Transduction de signal	CML, expression transitoire dans les cardiomyocytes	
SM22a (Transgelin)	- Interaction avec l'actine  - Fonction non connue	CML et myofibroblastes, expression transitoire dans les cardiomyocytes,	Pas d'altération de la fonction contractile chez les souris KO
Smoothelin	- Régulation potentielle de l'appareil contractile	- Smoothelin A exprimé par les CML viscérales  - Smoothelin-B prédominante dans les CML vasculaires bien qu'exprimé transitoirement par les CML viscérales	
Caldesmon	Contraction	- heavy-caldesmon : spécifique au CML  - light- caldesmon : tissu non musculaire	
Tropomyosine	Liaison à l'actine, stabilisation des microfilaments d'actine	Exprimé par les CML contractiles, expression augmentée dans les CML en culture et lors de l'athérogenèse	Marqueur des processus de réparation tissulaire
SMemb	Interaction actine-myosine	- Exprimé par les CML embryonnaires, lors du développement vasculaire, et par les CML dans l'athérosclérose  - Lignée neuronale	

**Tableau 1. Marqueurs de différenciation de la CML**

Il est à noter que la difficulté des études explorant le rôle de la transition phénotypique dans les maladies vasculaires est de distinguer les marqueurs de différenciation, indiquant l'état différencié de la CML, des marqueurs de lignée, identifiant les CML en excluant les autres types cellulaires. En effet,

à l'exception de la myosine, la plupart des marqueurs de différenciation peuvent être exprimés, au moins de façon transitoire, par d'autres types cellulaires lors du développement ou d'un stimuli pathologique. En conséquence, certaines cellules ont pu être identifiées comme CML alors qu'elles n'en étaient pas. De même, il est probable que des CML n'aient pas été identifiés comme telles, en raison de la difficulté à reconnaître une CML ayant perdu ses marqueurs spécifiques.

### **3. Phénotype de la CML dans l'athérosclérose**

La complexité des différents phénotypes qui sont exhibés par la CML est évidente dans les lésions d'athérosclérose. En effet, les propriétés morphologiques et physiologiques de la CML varient aux différents stades de l'athérosclérose, mais également entre CML localisées dans différentes régions d'une même lésion.

Lors des phases précoces de l'athérosclérose, on observe un épaissement intimal diffus de l'artère humaine, qui contient des CML en abondance. Les évidences montrent que ces CML intimaux diffèrent significativement des CML de la média, et qu'elles disposent de propriétés athérogènes faisant de l'intima un terrain fertile pour l'initiation des plaques (Figure 7).

#### **a. Migration et prolifération intimale**

La migration directionnelle des CML de la média vers l'intima prend place en réponse à des signaux extracellulaires. Pour migrer, la CML étend sa membrane vers le signal, en formant une structure appelée lamellipode. L'extension du lamellipode s'explique par un équilibre polymérisation/dépolymérisation de l'actine, la longueur du filament d'actine restant constante. Au niveau du front de migration, se forment des adhésions focales qui stabilisent l'adhérence de la membrane cellulaire à la matrice. Parallèlement, les contacts focaux à l'arrière se détachent, le cytosquelette est remodelé, et de la force est généré par la myosine dans le corps cellulaire afin de propulser la cellule [34]. Certains agents pro-migratoires comme le platelet-derived growth factor (PDGF) et le TGF- $\beta$ , activent des cascades de signalisation qui déclenchent le remodelage du cytosquelette, modifient le degré d'adhérence de la cellule à la matrice, et activent des protéines motrices. Les voies de signalisation qui leur sont associées sont activées par des récepteurs à tyrosines kinases et des récepteurs couplés aux protéines G [24]. Quant à la prolifération des CML, elle peut être induite par la stimulation de facteurs de croissance, comme le PDGF, le fibroblast growth factor-2 (FGF-2) et le TGF- $\beta$  [35].

## **b. Formation de cellules spumeuses**

La formation de cellules spumeuses dérivées de CML représente une étape critique dans l'évolution d'un épaissement intimal en plaque d'athérome. Bien que les macrophages aient longtemps été identifiés comme la source majoritaire de cellules spumeuses, de nombreuses études ont fait depuis la démonstration de la co-localisation *in vitro* et *in vivo* de marqueurs de CML et de lipides [18].

Les CML expriment en effet une variété de récepteurs au cholestérol, incluant le récepteur au LDL, le récepteur au VLDL, CD36, et les récepteurs scavenger de type I et II. Les récepteurs scavenger CD36, SRA-I et SRA-II, sont principalement impliqués dans l'endocytose des LDL acétylées ou oxydées, alors que le récepteur LRP-1 est associé à l'internalisation de LDL agrégées. L'endocytose de LDL par les CML conduit à la formation de cellules spumeuses contenant de larges gouttelettes lipidiques dans leur cytoplasme [35].

Les activités d'endocytose de la CML induisent la surexpression de protéines impliquées dans la fonction d'endosome/phagosome, telles que CD68, S100A9/A10, et la calprotectine, qui confèrent à la CML un phénotype de phagocyte. Par exemple, les CML stimulées par les LDL surexpriment le CD68, un marqueur de phagocytose qui est habituellement utilisé pour identifier les macrophages. De plus, dans l'intima d'artères sujettes à l'athérome précoce, des marqueurs comme la SM  $\alpha$ -actine ou la myosine ont été détectées sur des cellules positives pour le CD68. Ces observations impliquent que certaines cellules ayant été identifiées comme des macrophages par ce marqueur pourraient être des CML. Le rôle de la CML dans l'athérome humain précoce a alors probablement été sous-estimé au bénéfice des macrophages. Il est à noter qu'en plus de la capacité à internaliser des molécules solubles comme les LDL, les CML ont une capacité de phagocytose de microparticules dérivées de plaquettes, de cristaux, de cellules apoptotiques, et de globules rouges [36].

Les CML expriment en outre les composants nécessaires au transport inverse du cholestérol, l'ATP binding cassette (ABC) transporter, ABCA1. La voie de transport inverse du cholestérol est le moyen par lequel les cellules métabolisent les lipides dont elles sont chargées et les exportent à des transporteurs afin de les amener au foie. Lors d'un chargement continu en cholestérol, les CML régulent négativement l'expression de transporteurs du cholestérol, ce qui conduit à son accumulation intracellulaire et à l'augmentation de la formation de cellules spumeuses [37].

Les cellules spumeuses peuvent évoluer vers l'apoptose, mais aussi favoriser la prolifération intimale des CML adjacentes et la calcification, participant ainsi à la progression de la plaque.

## **c. Production de cytokines**

L'accumulation de cellules et de matrice extra-cellulaire composant les lésions d'athérosclérose sont conduites par la libération locale de cytokines au niveau des sites de prédilection de formation des lésions. Ces cytokines sont produites par les lymphocytes T, les macrophages, les cellules

endothéliales, et les CML. Les CML en particulier sécrètent des cytokines qui attirent et activent les leucocytes, induisent la prolifération des CML, favorisent la dysfonction endothéliale, et stimulent la production de matrice extra-cellulaire. Bien que les CML soient capables de produire diverses cytokines, quelques unes des plus importantes sont le PDGF, le TGF-  $\beta$ , l'interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), le monocyte chemoattractant protein (MCP-1) et le macrophage inhibitory factor (MIF) [38].

#### **d. Production de matrice extracellulaire et de MMPs**

L'une des caractéristiques majeures de la CML modifiée est la synthèse de MEC, qui s'accumule durant la progression de la lésion. Bien que les cellules endothéliales et les macrophages participent également à la production de MEC, les CML sont connues pour être les principales productrices du tissu conjonctif dans l'artère athéromateuse [39]. Alors que la MEC d'une artère saine est constituée de collagène fibrillaire de type I et III, les lésions d'athérosclérose contiennent plutôt des protéoglycans, avec des fibrilles de collagène de type I dispersées, et de la fibronectine. Cette transition altère non seulement l'architecture du vaisseau, mais aussi le contenu lipidique et la prolifération cellulaire. En effet, alors qu'elle a longtemps été considérée comme inerte, il est maintenant bien établi que la MEC joue un rôle actif et complexe dans divers événements clés de l'athérosclérose.

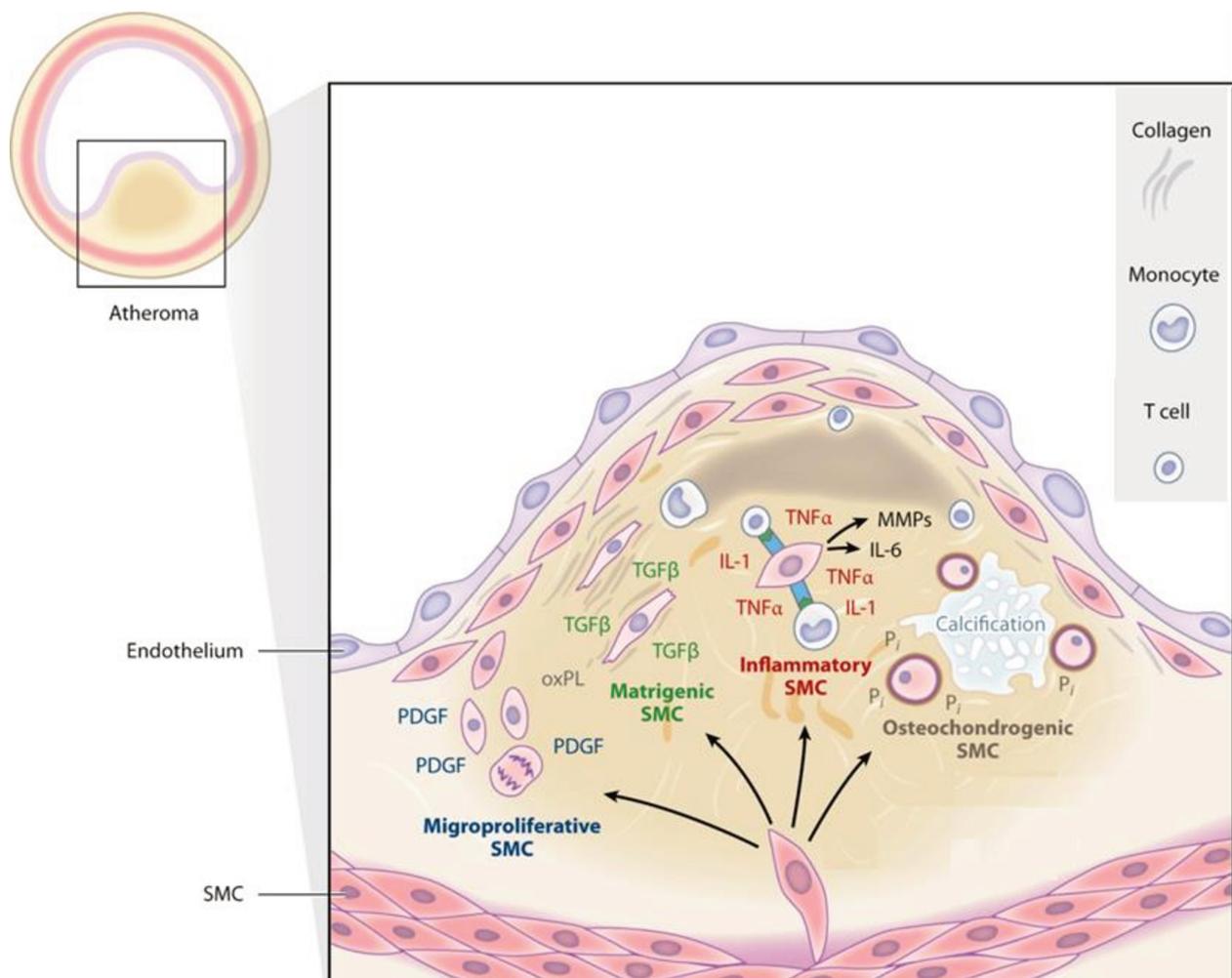
Lors des étapes initiales de l'athérosclérose, la MEC et notamment les protéoglycans participent à la rétention des LDL dans la paroi artérielle, comme cela a été décrit précédemment dans la partie évoquant l'hypothèse de réponse à la rétention [8]. La matrice a également d'importants effets sur le comportement des cellules puisqu'elle contrôle l'activation et la biodisponibilité des facteurs de croissance, et interagit avec les intégrines pour réguler l'adhérence, la migration et la prolifération cellulaire. Par ailleurs, l'exposition de la MEC après une rupture de plaque participe à l'adhérence des plaquettes et leur agrégation, générant le thrombus. Les plaquettes adhèrent préférentiellement aux régions de la plaque enrichies en collagène. Aux stades tardifs, la synthèse de MEC par les CML conduit à l'élargissement et à la restructuration de la lésion, qui se recouvre progressivement d'une chape fibreuse.

En plus de la produire, les CML modulent la structure la MEC en sécrétant des métalloprotéases matricielles (MMPs) spécialisées dans la dégradation des constituants matriciels. En remodelant le substrat matriciel, les MMPs augmentent la migration et la prolifération cellulaire. En effet, pour migrer, les cellules doivent traverser des barrières physiques résultant de contacts existants, notamment entre les composants de la membrane basale et les intégrines de surface cellulaire. La perte de contact cellule-matrice peut également entraîner de nouvelles interactions, ou casser une interaction inhibitrice, ce qui conduit à l'activation de voies de signalisation menant à la migration et prolifération [40].

## e. Calcification

Les études montrent que les CML représentent la source majeure de calcifications dans les lésions d'athérosclérose [41]. La présence de dépôts de calcium est indicative de lésions avancées, et cause une réduction de l'élasticité de la paroi vasculaire. Etant donné que des protéines associées à l'os telles que l'ostéonectine, l'ostéocalcine, et la protéine matrix Gla, ont été détectées dans les tissus vasculaires calcifiés, la calcification est considérée comme un processus régulé et organisé, similaire à la minéralisation du tissu osseux.

Plusieurs évidences indiquent que la calcification est initiée par les CML, qui sécrètent des vésicules matricielles et des corps apoptotiques, servant de sites de nucléation à la croissance des cristaux de calcium. La calcification requière la précipitation et l'attachement de cristaux de phosphate calcium à la MEC. Certains stimuli, notamment le phosphate inorganique (Pi), favorise les changements phénotypiques qui prédisposent la CML à la calcification.



**Figure 7. Diversité des phénotypes exhibés par la CML dans l'athérosclérose.** Lors du développement de l'athérosclérose, les CML migrent de la média vers l'intima et acquièrent différentes fonctions, telles que la

production de MEC et de cytokines pro-inflammatoires, et la calcification. Cette modulation phénotypique est déterminée par les signaux de l'environnement local, incluant les facteurs de croissance, les cytokines, et les forces mécaniques. (Tiré de Alexander et al [42])

#### **4. Facteurs impliqués dans la transition phénotypique de la CML**

##### **a. Facteurs de signalisation solubles**

Les molécules de signalisation extracellulaire jouent un rôle majeur dans la détermination du destin phénotypique de la CML vasculaire. Une variété de facteurs de signalisation est impliquée dans la transition des CML à un phénotype prolifératif synthétique, incluant le PDGF, le FGF, l'angiotensine II.

Le PDGF est un facteur de croissance connu pour induire la prolifération et la migration des CML. Il existe sous forme d'un dimère composé de 2 chaînes A et B. Les molécules PDGF-A et PDGF-B sont importantes lors des stades initiaux de différenciation de la CML lors du développement vasculaire, qui sont caractérisés par le recrutement de cellules mésenchymateuses et la prolifération subséquente. Dans les CML adultes, les isoformes de PDGF induisent généralement un phénotype synthétique [43]. Le PDGF induit une diminution de l'expression des marqueurs de CML dans les CML en culture, et stimule la prolifération et la migration de ces cellules dans des modèles de lésion artérielle. In vivo, l'inhibition de PDGF-A ou PDGF-B réduit la prolifération et la migration des CML suite à une lésion artérielle chez l'adulte, réduisant la formation de néo-intima.

A l'inverse, les isoformes de TGF- $\beta$  sont essentiels pour l'induction d'un phénotype contractile. Il a été montré que le TGF- $\beta$  favorise la différenciation de la CML en culture en induisant la surexpression de marqueurs sélectifs tels que la SM  $\alpha$ -actine ou la myosine. Dans des modèles de lésion induite par ballonnet, la surexpression de TGF- $\beta$  augmente la formation de néo-intima, la déposition de MEC, et la prolifération des CML [44]. Le rôle protecteur du TGF- $\beta$  a été mis en évidence par des études effectuées sur la souris ApoE  $-/-$ , suggérant que le TGF- $\beta$  est critique pour la production de la matrice par les CML et le développement d'une plaque fibrotique stable.

D'autres facteurs affectant le phénotype de la CML incluent l'angiotensine II, le NO (monoxyde d'azote), et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) [26].

Les processus inflammatoires contribuent à la perte du phénotype contractile des CML. Les cytokines libérées par les cellules inflammatoires peuvent directement stimuler la croissance des CML et jouer un rôle important dans le développement de l'hyperplasie intimale. En particulier, plusieurs des facteurs générés par les macrophages ont été associés à une augmentation de la prolifération des CML, comme l'interleukin 1-beta (IL-1  $\beta$ ), l'interleukin-8 (IL-8), et le TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha)

[41]. Divers stimuli provenant de l'endothélium activé et des cellules inflammatoires induisent également chez la CML la production de cytokines telles que le MCP-1 et l'IL-8 [45]. L'expression de ces molécules par les CML synthétiques accélère la prolifération.

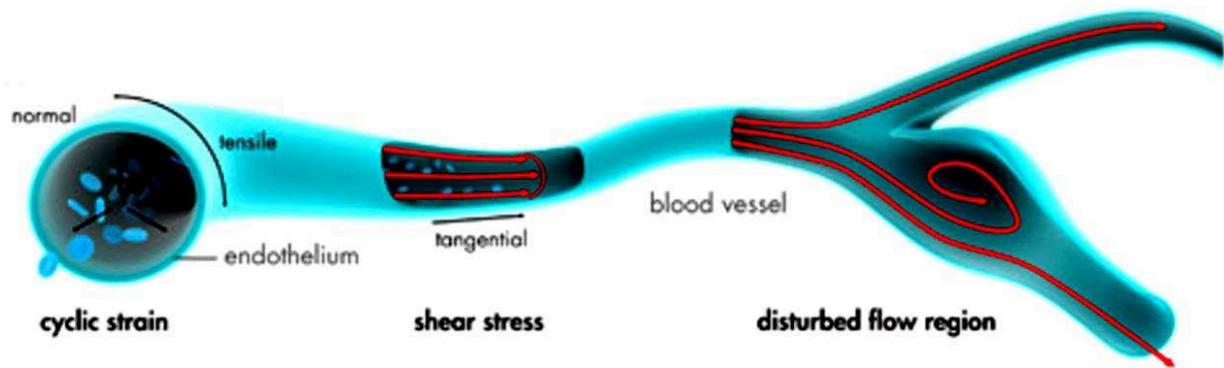
### **b. Composants de la matrice extracellulaire**

La majeure partie de la matrice constituant la média comporte des isoformes de collagène, l'élastine, et les protéoglycans. Parmi ceux-ci, le perlecan, inhibe la prolifération des CML via ses chaînes héparane sulfate qui séquestrent le FGF-2 [46]. L'héparine a par ailleurs été montrée favoriser la maintenance d'un phénotype contractile et diminuer la prolifération de la CML [47]. D'autres composants de la MEC sont impliqués dans cette modulation phénotypique. Le collagène fibrillaire de type I a été montré favoriser un phénotype contractile, alors que le collagène monomérique de type I active la prolifération [48].

En modifiant l'architecture de la matrice, les métalloprotéases matricielles sont impliquées dans le processus de dé-différenciation des CML. Produites par les CML et les macrophages, elles sont responsables de la dégradation et du remodelage de la MEC entourant les CML. Le comportement de la CML est alors modulé suite à la modification d'interactions cellule-matrice, ainsi que cellule-cellule. En exemple, plusieurs MMPs clivent la N-cadherine, qui représente une molécule majeure d'adhérence cellule-cellule [24]. Par ailleurs, la MEC est un réservoir de cytokines et de facteurs de croissance [26], et des changements dans sa composition peuvent par conséquent affecter directement la disponibilité de certains facteurs.

### **c. Facteurs physiques**

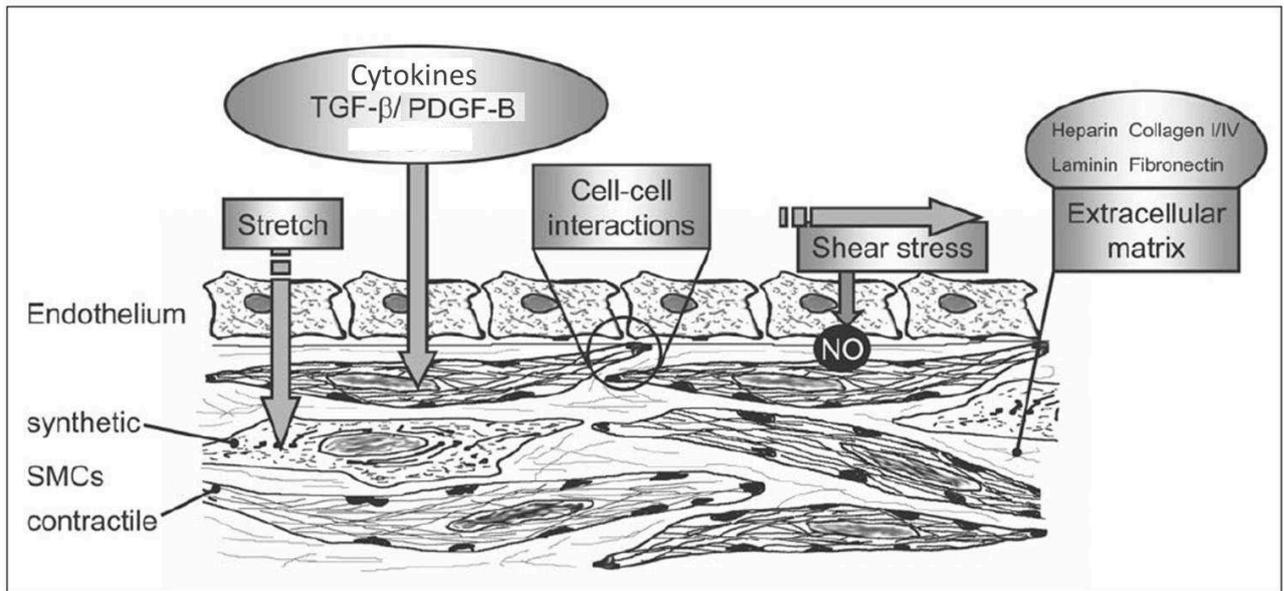
Les vaisseaux sont en permanence soumis à des forces mécaniques associées à la pression artérielle et au flux sanguin. Les contraintes de cisaillement (ou shear stress) correspondent aux forces appliquées parallèlement à la paroi vasculaire par l'écoulement sanguin, tandis que les contraintes cycliques agissent tangentiellement sur la paroi (Figure 8). Toute variation de ces contraintes se traduit par un remodelage de la paroi vasculaire, associé à une modification des caractéristiques cellulaires. Alors que les cellules endothéliales sont principalement sensibles aux contraintes de cisaillement, les CML sont plus sensibles à la contrainte cyclique résultant de la pression pulsatile [49].



**Figure 8. Forces appliquées sur la paroi artérielle.** Les cellules de la paroi artérielle sont soumises aux forces hémodynamiques exercés par le flux sanguin : les contraintes cycliques et les contraintes de cisaillement. La perturbation du flux induit alors des modifications cellulaires. (Illustration de Qiagen)

Bien que les mécanismes de transduction ne soient pas bien connus, il est établi que la déformation des CML par étirement engendre une réponse cellulaire. En accord avec les études *in vivo*, les modèles cellulaires montrent qu'un étirement cyclique, semblable à celui induit par la pression artérielle, régule la prolifération et la migration des cellules, ainsi que la synthèse et réorganisation de la MEC. En effet, les CML étirées présentent une synthèse augmentée des composants de la matrice, en particulier le collagène et l'élastine [50]. A l'opposé de cette réponse orientée vers un phénotype synthétique, la contrainte cyclique peut également augmenter l'expression de marqueurs de la fonction contractile, incluant l'actine, la calponine, la caldesmon, la myosine, et la transgeline. En addition, des changements morphologiques sont observés. Soumises à un étirement, les CML s'allongent, accentuant une morphologie en fuseau caractéristique du phénotype contractile, et s'alignent perpendiculairement à la direction de la contrainte [51].

En réponse aux contraintes mécaniques, la modification des caractéristiques cellulaires dépend de cascades de signalisation complexes. La transduction du signal implique l'activation des intégrines, mais également la stimulation d'autres structures telles que les récepteurs tyrosine kinases ou les canaux ioniques [52].



**Figure 9 : Récapitulatif des facteurs impliqués dans la modulation phénotypique de la CML.** Une diversité de signaux affecte l'expression des marqueurs de CML, parmi lesquels les forces mécaniques, les facteurs solubles (facteurs de croissance, cytokines), et la matrice extracellulaire. (Adapté de Rensen et al [26])

#### d. Régulation moléculaire de l'expression des gènes

Ces dernières années, de nombreuses études se sont penchées sur l'identification des mécanismes contribuant à la régulation transcriptionnelle des gènes de marqueurs de CML. En particulier, un modèle basé sur l'axe CArG-SRF-myocardine, initialement découvert par Olson, a été largement décrit [53].

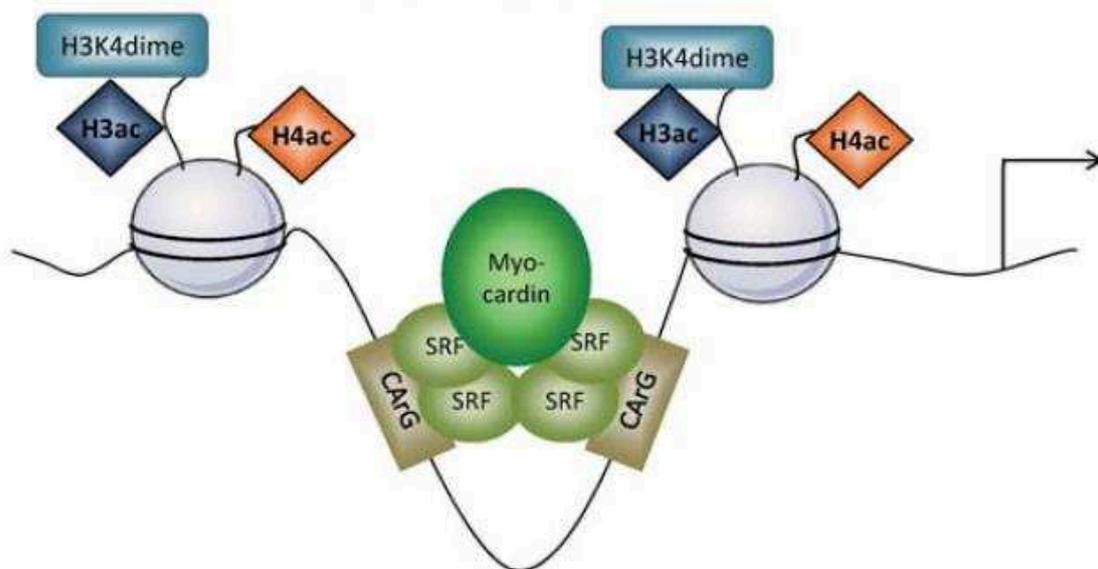
Le facteur de transcription Serum response factor (SRF) est impliqué dans la régulation de divers programmes cellulaires, incluant la prolifération et la différenciation des CML. SRF est fonctionnel sous forme d'homodimère et se fixe sur une séquence cible de l'ADN de type CC(A/T)6GC, appelée boîte CArG. Ces séquences CArG ont été identifiées dans les promoteurs et régions activatrices de près de 200 gènes, dont beaucoup sont impliqués dans la formation et la régulation du cytosquelette ou de l'appareil contractile. La plupart des gènes de la fonction contractile contiennent au moins une boîte CArG, comme la SM  $\alpha$ -actin, la calponine, la myosine [42] (Figure 10).

L'habilité de SRF à activer des programmes de transcription dépend de la présence de co-activateurs et de répresseurs spécifiques. Parmi ces co-activateurs, la myocardine a émergé comme un régulateur central de la différenciation cellulaire puisqu'elle induit l'expression de tous les gènes connus de marqueurs de CML dépendants de CArG, incluant ceux codant la SM  $\alpha$ -actine, la myosine, la SM $\alpha$  22,

et la calponine [54]. Elle joue par exemple un rôle dans l'augmentation de l'expression des gènes de CML induite par l'angiotensine II [55].

La régulation de l'expression de gènes de CML dépend en partie, de l'habilité de SRF à se lier à des boîtes CARG dans un contexte de chromatine intact. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, composé d'ADN enroulé autour d'un octamère de protéines d'histones. Les mécanismes épigénétiques modifient les histones au niveau post-traductionnelle, notamment en apposant des groupements méthyles. Ces modifications sont induites par l'environnement et ne modifient pas la séquence de l'ADN [42].

Bien que les mécanismes ne soient pas certains, l'opinion courante est que les modifications de l'histone altèrent directement ou indirectement la conformation de la chromatine, régulant ainsi l'accessibilité de l'ADN à des activateurs/répresseurs transcriptionnels séquence-spécifique. L'épigénétique apparaît alors comme déterminante dans le processus de différenciation/dé-différenciation de la CML.



**Figure 10. Régulation de l'expression des gènes par l'axe CARG-myocardine-SRF.** Lors de la différenciation phénotypique, des modifications épigénétiques (incluant l'acétylation d'histones 3 et 4 (H3ac et H4ac) et la diméthylation de l'histone H3 de la lysine 4 (H3K4dime)) apparaissent sur les promoteurs de gènes spécifiques de CML comme la SM-actine ou la SM-MHC. Ces modifications rendent accessibles les régions CARG pour la liaison à SRF/myocardine ou d'autres activateurs transcriptionnels. (Tiré de Gomez et al [54])

### **e. Origine embryologique des CML et diversité phénotypique**

En plus des facteurs locaux tels que le flux sanguin ou la composition de la paroi vasculaire, il a été proposé que l'hétérogénéité dans l'origine des CML influence la localisation et la progression de la maladie [47]. De récentes études de traçage de lignée ont montré que différents vaisseaux, ou différentes régions d'un même vaisseau, étaient composés de populations de CML provenant de sources embryologiques distinctes. Alors que les CML de l'aorte ascendante, de l'arche aortique et du tronc pulmonaire, dérivent de la crête neurale, les CML de l'aorte descendante proviennent du mésoderme somatique [56]. Ces CML provenant de progéniteurs distincts présentent des différences dans l'expression des gènes, et les propriétés fonctionnelles. Par exemple, une étude faite chez l'embryon de poulet montre que les CML dérivées de crêtes neurales ne réagissent pas de la même façon au TGF- $\beta$ , comparé aux cellules dérivées du mésoderme [57] [58]. De ce fait, une part des variations dans les populations de CML pourrait s'expliquer par leurs diverses origines embryologiques.

## **V. Facteurs de rupture de la plaque**

Certaines plaques dites stables, fibreuses et très dures, n'entraînent pas de complications majeures. Ce qui rend une plaque stable, c'est l'épaisse chape fibreuse fabriquée par les CML insérées dans une matrice riche en collagène. Lorsque les plaques présentent un risque élevé de rupture, on parle de plaque « vulnérable ». Les critères morphologiques qui définissent la plaque vulnérable sont un large cœur lipidique et nécrotique, recouvert par une chape fibreuse fine.

L'infiltration de cellules inflammatoires et la protéolyse matricielle participent à la vulnérabilité de la plaque. Les lymphocytes T activés au sein de la plaque stimuleraient la production des MMPs par les macrophages. Ces enzymes dégradant la matrice pourraient ainsi être responsables de la dégradation de la chape fibreuse, et donc de la rupture. L'apoptose des macrophages et des CML participe également à l'évolution d'une plaque d'athérome en plaque à risque, puisque ce phénomène augmente la taille du cœur nécrotique et forme des corps apoptotiques qui sont pro-coagulants.

Un autre facteur critique de l'instabilité de la plaque est l'hémorragie intraplaque. Elle est étroitement associée à la néo-angiogenèse, formant des néo-vaisseaux immatures qui sont fragiles et susceptibles à la rupture [59][60]. Ces néo-vaisseaux favorisent ainsi l'infiltration des éléments du sang dont les cellules inflammatoires et les globules rouges, qui s'accumulent dans la plaque. Parmi ces composants, de récentes études montrent que les neutrophiles enrichissent la plaque en protéases, la rendant très vulnérable. De plus, les globules rouges contribuent à l'expansion du cœur nécrotique puisque leurs membranes sont riches en cholestérol libre [61] [62]. La rétention de cholestérol libre dans les cellules

et tissus peut conduire à la formation de cristaux. Il a d'ailleurs été montré que les membranes de globules rouges co-localisaient avec les cristaux dans les plaques athéromatotiques [63]. Les cristaux de cholestérol ont pendant longtemps été considérés comme un composant passif de la plaque, exposant à un risque d'embolie en cas de relargage, mais ne contribuant pas à la rupture de la plaque. Cependant, des études initiées par Abela ont montré qu'en cristallisant, le cholestérol augmente de volume en formant de fines aiguilles qui peuvent perforer des tissus fins, comme l'intima [64]. Ces résultats, observés in vitro puis sur des lésions humaines, suggèrent que la cristallisation du cholestérol participe à la fragilisation de la plaque et au risque de rupture.

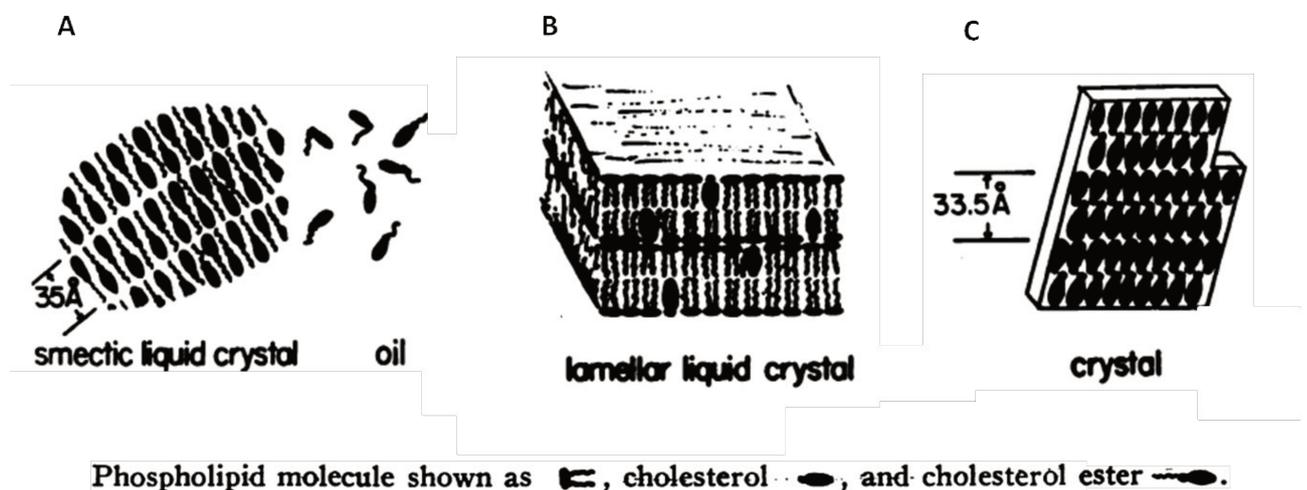
# Les cristaux de cholestérol

## I. Les cristaux de cholestérol dans la plaque d'athérosclérose

### 1. Propriétés optiques des structures lipidiques retrouvées dans les lésions

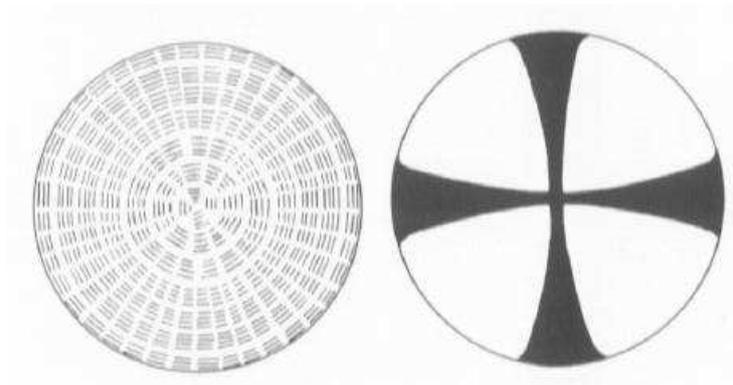
L'athérome est initié par l'accumulation focale de lipides, qui sont principalement du cholestérol sous forme libre (CL) et estérifiée (CE) et des phospholipides. Ces lipides interagissent entre eux pour former des structures qui diffèrent dans leur composition et leurs propriétés optiques (Figure 11).

Les gouttelettes lipidiques, majoritairement composées d'esters de cholestérol, sont présentes sous forme de liquide ou cristal liquide selon l'ester prédominant. Au niveau des membranes cellulaires, on retrouve des cristaux liquides lamellaires formés par les phospholipides dans lesquels sont incorporés du CL et CE. Lorsqu'il n'est pas solubilisé par les phospholipides, le CL cristallise sous forme solide dans l'environnement aqueux [65].



**Figure 11. Etats physiques des lipides retrouvés dans les lésions athéromateuses.** (A) Cette phase contenant majoritairement des esters de cholestérol peut être liquide ou cristal liquide selon l'ester qui prédomine. Elle forme des gouttelettes lipidiques (B) Les cristaux liquides lamellaires, qui composent les membranes cellulaires, incorporent des phospholipides et du cholestérol libre et estérifié. (C) Le cholestérol libre est cristallin dans un environnement aqueux. (Adapté de Katz et al [65])

En lumière transmise par microscopie à champ large, les formes liquide et cristal-liquide apparaissent de la même façon, sous la forme d'inclusions sphériques de tailles variables. Les deux états se distinguent en lumière polarisée [66]. Comme la forme liquide est isotrope, le rayon lumineux polarisé le traverse sans changer de direction et n'est pas divisé ni ralenti, elle apparaît alors sous forme de sphère homogène. A l'inverse, la forme cristal-liquide est anisotrope et se manifeste donc par une biréfringence, c'est-à-dire le dé-doublement du rayon lumineux. Les cristaux liquides apparaissent alors comme des figures symétriques lumineuses, constitués de quadrants. Structurellement, cet état de la matière est à mi-chemin entre le liquide et le solide cristallin, il combine l'orientation moléculaire d'un cristal à la fluidité d'un liquide [67] (Figure 12). Quant aux cristaux solides de cholestérol, ils sont identifiés par leur forme et leur biréfringence vive et constante, même à des températures élevées [65]. Morphologiquement, ces cristaux prennent l'aspect de plaques ou d'aiguilles.

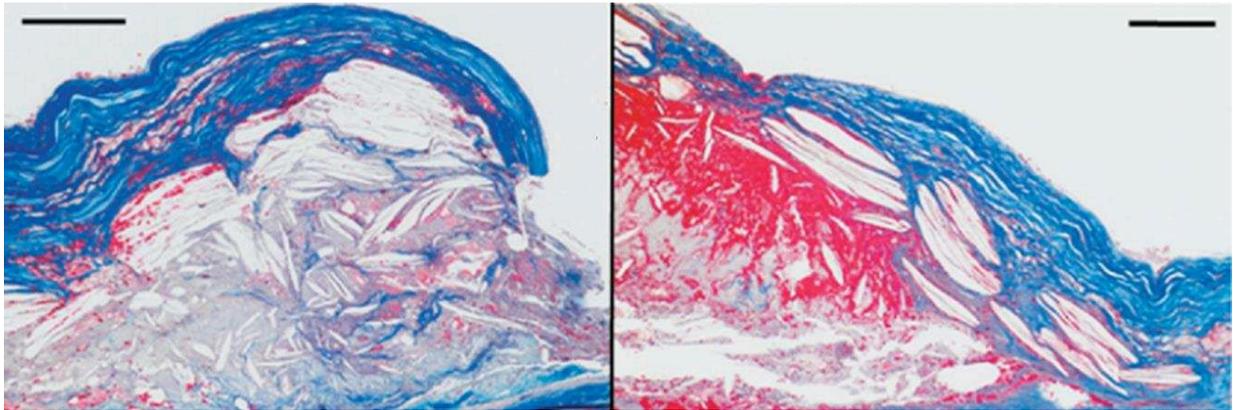


**Figure 12. Représentation de la structure des inclusions riches en esters de cholestérol.** A gauche, l'image illustre un exemple de l'orientation des molécules d'esters de cholestérol dans une inclusion lipidique. L'observation de cette structure en lumière polarisée, illustrée à droite, dévoile une figure géométrique composée de quadrants. (Adapté de Hata et al [66])

## 2. Détection des cristaux solides de cholestérol

Malgré l'intérêt grandissant sur l'origine des cristaux de cholestérol, il est difficile d'analyser les cristaux dans les tissus par des techniques standards. Une des principales difficultés est leur solubilité dans les solvants organiques, tels que l'alcool et les solutions typiquement utilisés en histologie pour la fixation, le déparaffinage, et la ré-hydratation. De ce fait, dans les préparations histologiques standards, les seules traces de cristaux de cholestérol sont des fentes biconvexes vides, produites par la dissolution des cristaux larges (Figure 13). Il existe à l'inverse une possibilité de cristallisation

artefactuelle du cholestérol durant la préparation du tissu. Stewart a montré que sous congélation, des cristaux solides se formaient à partir d'inclusions de lipides cristalline-liquides présentes dans des artères athéromateuses fraîches. Ainsi, des cristaux artefactuels peuvent apparaître dans les coupes congelées, qui sont souvent utilisées pour l'analyse de tissus athéromateux [68]



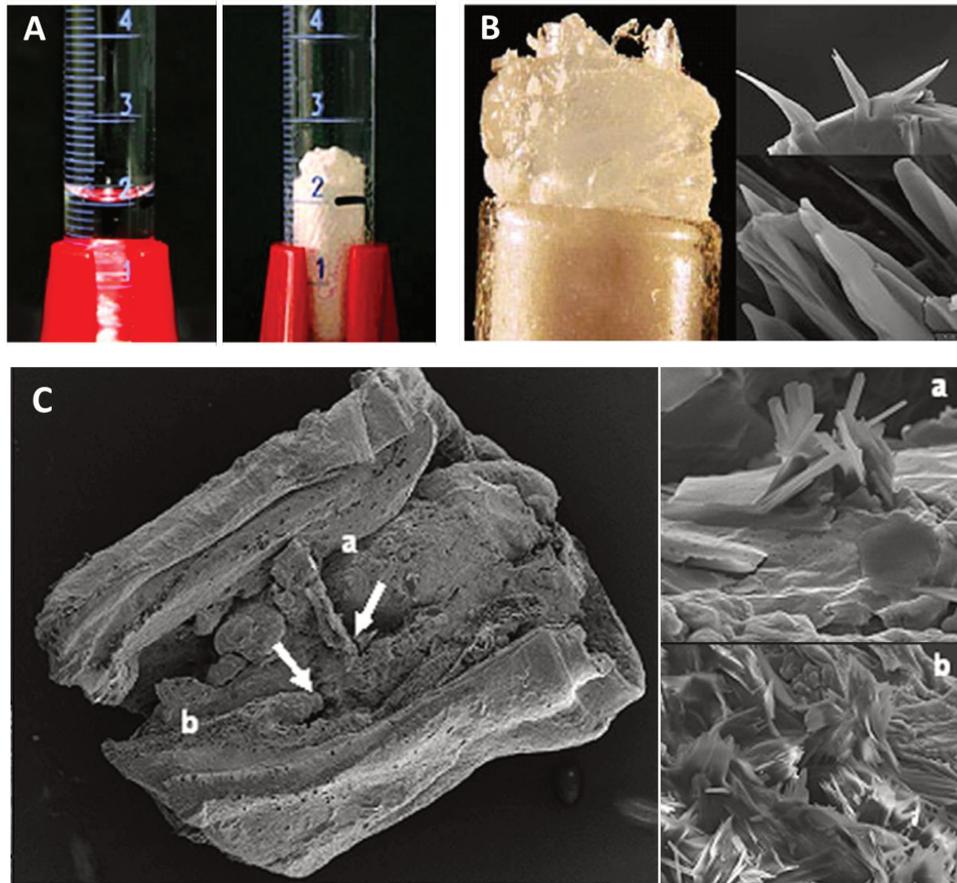
**Figure 13. Traces de cristaux de cholestérol sur une coupe histologique de plaque carotidienne (marquage Trichrome Masson).** Sur une coupe déparaffinée, les cristaux de cholestérol dissous par les solvants se présentent comme des fentes vides (échelle = 200  $\mu$ m). (Tiré de Abela et al [69])

### 3. Implication des cristaux de cholestérol dans la rupture de plaque

Alors qu'ils ont longtemps été considérés comme un composant passif de la plaque, des évidences récentes suggèrent que les cristaux de cholestérol pourraient favoriser la progression de l'athérosclérose, et ce dès le début de la formation de l'athérome.

En 2005, Abela et son équipe ont montré qu'en cristallisant, le cholestérol augmente de volume et forme de fines aiguilles qui peuvent perforer des membranes biologiques fines (Figure 14). Ces résultats, obtenus *in vitro*, suggèrent que la cristallisation du cholestérol a le potentiel d'induire des dégâts mécaniques [70]. La même équipe a étudié cette hypothèse à partir de segments d'artères coronaires et carotidiennes de patients ayant présenté des événements cardiovasculaires ou neurologiques, respectivement. L'observation de ces tissus en microscopie électronique a montré la présence de cristaux de cholestérol regroupés au niveau des sites de rupture de plaque, et perforant la chape fibreuse et l'intima [69]. Ces observations ont été rendues possibles par la déshydratation sous vide des tissus, afin d'éviter l'utilisation de solvants dans le processus de préparation des tissus. Ces

études sont les premières à proposer que les cristaux de cholestérol pourraient déclencher la rupture de plaque.



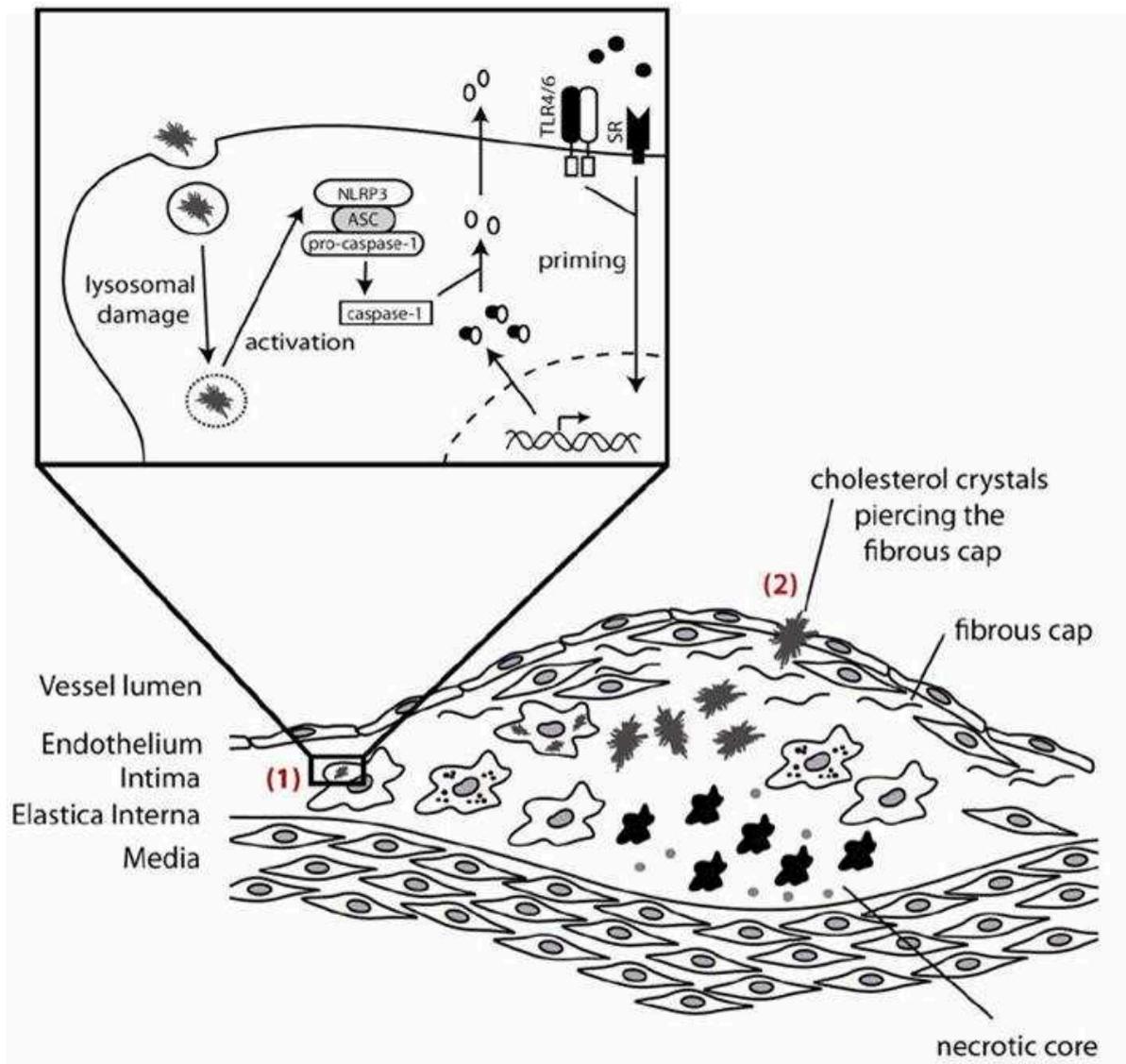
**Figure 14. Cristallisation du cholestérol et formation d'aiguilles. (A) et (B)** En cristallisant dans un tube gradué, le cholestérol augmente de volume et forme de fines aiguilles. **(C)** Chez les patients ayant présenté des syndromes coronariens aigus, l'observation des plaques rompues montre les cristaux perforant l'intima au niveau des sites de rupture. (Tiré de Abela et al [64])

Par la suite, d'autres auteurs se sont intéressés au rôle des cristaux de cholestérol dans le déclenchement de la réponse inflammatoire associée au développement de la plaque d'athérosclérose [71][72]. Deux études indépendantes ont montré que les cristaux de cholestérol pouvaient induire l'activation de l'inflammasome Nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing (NLR) family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) dans les macrophages en présence de lipopolysaccharides (LPS).

La voie de l'inflammasome, initiée par le récepteur NLRP3, conduit à l'activation de la caspase-1, ce qui aboutit à la maturation et la sécrétion de la cytokine inflammatoire IL1- $\beta$ . Latz et Rajamaki ont

décrit une même voie d'activation de NLRP3, due aux dommages lysosomaux : les cristaux induisent la rupture des lysosomes, qui répandent leur contenu protéolytique dans le cytosol [73][74]. L'étude de Latz montre également que les cristaux de cholestérol sont détectés dès les stades précoces de l'athérosclérose dans un modèle de souris ApoE<sup>-/-</sup>. Toutefois, il est à noter que ces derniers résultats se basent sur l'observation de coupes congelées, pouvant entraîner une cristallisation artefactuelle du cholestérol. Dans l'ensemble, ces deux études identifient les cristaux de cholestérol comme une source potentielle d'inflammation dans les lésions.

A partir des données connues, Abela a émis l'hypothèse d'un modèle de rupture de plaque, comportant deux phases d'activités inflammatoires (Figure 15). Dans le premier stade, les cristaux de cholestérol se forment dans les cellules spumeuses, et déclenchent une réponse inflammatoire locale. Ils activent la voie de l'inflammasome NLRP3, et conduisent à l'apoptose des cellules spumeuses qui libèrent alors des lipides extracellulaires. Un cercle vicieux se met en place, les macrophages, attirés au site de l'inflammation, deviennent à leur tour spumeux, et forment un pool de lipides. Le cœur nécrotique ainsi formé constitue un environnement propice à la cristallisation du cholestérol. Dans le deuxième stade, les cristaux de cholestérol induisent la rupture de la chape fibreuse et de l'intima, entraînant une réponse inflammatoire systémique. La production locale de IL-6 par les lymphocytes survient en réponse à la blessure intimale, et circulent jusqu'au foie où elle signale la production de la protéine C réactive hs-CRP, un marqueur de l'inflammation (aigue) qui a été lié au risque cardiovasculaire [64].



**Figure 15. Modèle de rupture de plaque induite par les cristaux de cholestérol.** (1) Les cristaux de cholestérol internalisés dans les macrophages induisent la formation de l'inflammasome NLRP3, activant la caspase-1 et résultant en l'apoptose des cellules sumeuses et la libération subséquente de lipides extracellulaires. (2) Dans les plaques avancées, les cristaux déclenchent la rupture mécanique de la chape fibreuse, conduisant à une réponse inflammatoire systémique. (Tiré de Grebe et al [71])

#### 4. Facteurs physiques influant sur l'état de cristallisation du cholestérol

Lorsque le cœur nécrotique se forme dans l'espace confiné de la paroi artérielle, il devient sujet à des variations locales physiques et chimiques. Différents paramètres tel que la saturation, la température,

la pression, et le pH, pourraient individuellement ou en combinaison déclencher la cristallisation du cholestérol au sein de la lésion [75].

La saturation en cholestérol est un pré-requis à la cristallisation, et un déclencheur majeur de la rupture de plaque. Dans des modèles *in vitro*, la quantité de cholestérol en solution est un facteur critique dans sa cristallisation.

L'effet de la température est un facteur connu de la formation de cristal. A une température diminuée, le volume d'expansion des cristaux de cholestérol et leur vitesse de formation est plus rapide. Dans une étude *in vitro*, Vedre a observé une augmentation de la cristallisation même avec un léger changement des températures physiologiques (34-37°C). Il émet la possibilité qu'une variation de 1°C serait suffisante pour déclencher la cristallisation, en particulier en association avec d'autres facteurs physiques.

L'hydratation du cholestérol est également associée à une expansion des cristaux. La forme prédominante du cholestérol détecté dans les plaques d'athérosclérose est le cholestérol monohydrate, comme l'ont montré de récentes études de diffraction à rayons X. L'hydratation pourrait en effet conférer au cholestérol des propriétés similaires à l'eau, entraînant une croissance et expansion comme pour l'eau se transformant en glace. Dans des modèles *in vitro* de cristallisation de cholestérol intracellulaire, les cristaux formés ont également les caractéristiques du cholestérol monohydrate.

Quant au pH, il peut varier dans la plaque suite à l'inflammation et au déplacement d'électrolytes. Il a été montré *in vitro* qu'une augmentation de pH favorisait la cristallisation, mais étant donné que les plaques inflammées semblent plus acides, il est difficile d'établir un lien avec la formation de cristaux *in vivo*.

## **II. Métabolisme intracellulaire du cholestérol**

Le cholestérol est un lipide essentiel à la viabilité des cellules des mammifères, jouant un rôle essentiel dans la structure et la perméabilité membranaire. Toutefois, des niveaux élevés de cholestérol ont des conséquences néfastes et peuvent favoriser des pathologies comme l'athérosclérose. Les cellules ont alors développé des mécanismes complexes pour réguler la distribution du cholestérol dans les cellules.

### **1. Stockage et efflux du cholestérol**

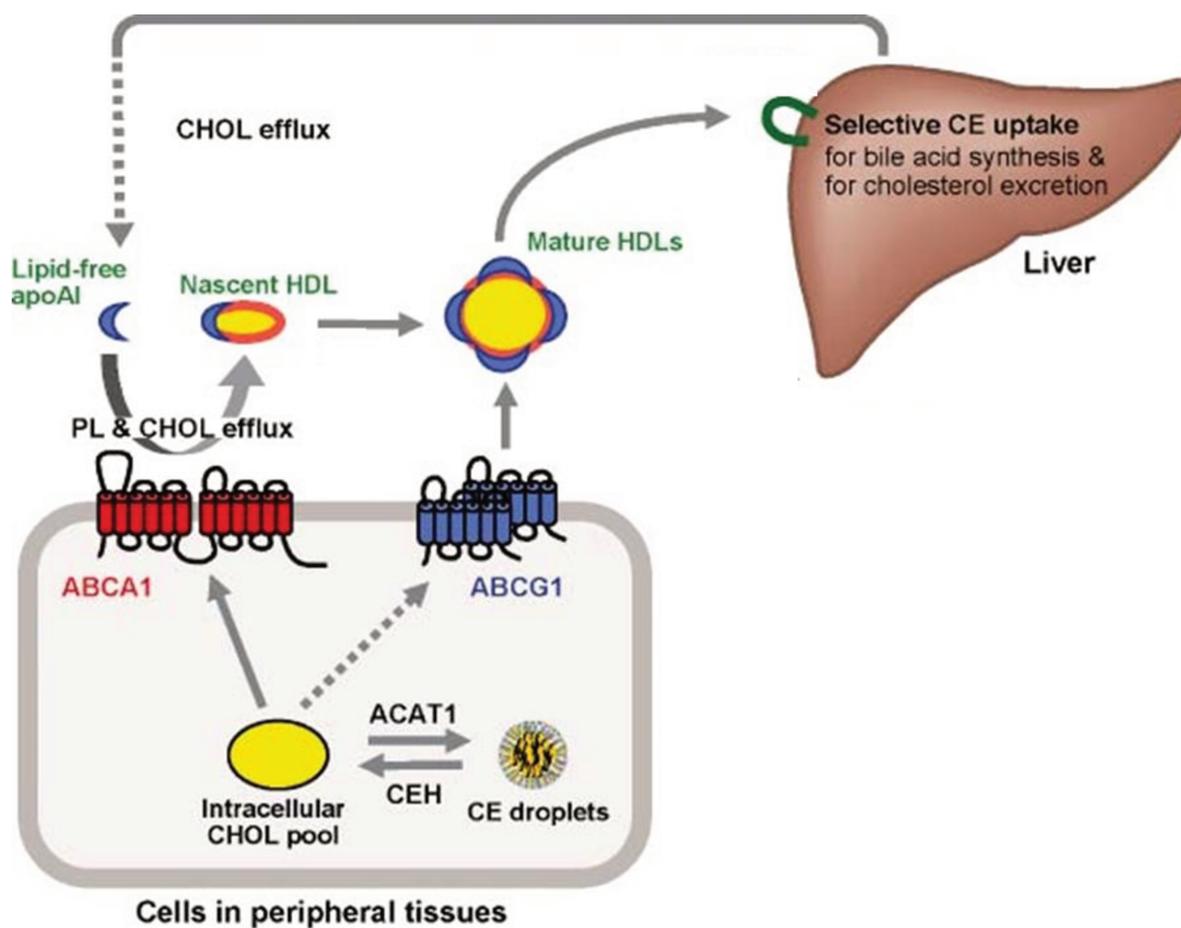
Les cellules récupèrent le cholestérol exogène principalement par la captation de LDL venant de la circulation sanguine. Les LDL entrent dans la cellule par endocytose via les récepteurs aux LDL, et sont hydrolysés dans les lysosomes, ce qui libère du cholestérol libre. Ce cholestérol libre est délivré

à d'autres organites : à la membrane plasmique, pour entrer dans sa composition en s'insérant dans la bicouche lipidique ou pour l'efflux, ou au réticulum endoplasmique pour son estérification.

Deux protéines, Niemann-Pick disease type C1 et C2 (NPC1 et NPC2) sont essentielles au déplacement du cholestérol vers les organites cibles. Ces protéines ont été nommées d'après la maladie rare de Niemann-Pick de type C, qui est caractérisée par une accumulation du cholestérol libre dans les lysosomes des cellules du foie et du cerveau. Cette maladie cause la plupart du temps une neurodégénérescence. Bien que leur mécanisme d'action ne soit pas clair, NPC1 et NPC2 aideraient au transfert du cholestérol en dehors du système lysosomal [76].

L'accumulation de cholestérol libre peut être toxique pour les cellules. Lorsque celui-ci est en excès, il est converti en esters de cholestérol par l'acyl-CoA acyl-transférase (ACAT). Les esters de cholestérol sont stockés sous forme de gouttelettes lipidiques dans le cytosol, et peuvent être libérés sous l'action de la cholestérol ester hydrolase (CEH). Ce cycle cholestérol/ester de cholestérol a lieu rapidement, ce qui permet le stockage du cholestérol qui peut être libéré pour être acheminé vers d'autres compartiments.

L'efflux de cholestérol est essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire. Les cellules peuvent stocker, mais ne peuvent pas dégrader le cholestérol. Dans les cellules des tissus périphériques, l'excès de cholestérol nécessite donc d'être déplacé et transporté jusqu'au foie pour son recyclage et son excrétion. Ce processus est appelé le transport inverse du cholestérol. Les HDL servent d'accepteurs du cholestérol libéré par les cellules extra-hépatiques, leur taux est ainsi inversement corrélé au risque cardiovasculaire. L'efflux du cholestérol a lieu par deux mécanismes : la diffusion passive, et le mécanisme médié par l'apolipoprotéine apo-A1. Lors de la diffusion passive, le cholestérol est déplacé par gradient de la membrane cellulaire aux HDL. L'autre mécanisme est médié par l'apo-A1, la protéine majeure des HDL, et conduit à l'assemblage de HDL naissantes avec des phospholipides et du cholestérol. La protéine ABCA1, localisée à la membrane plasmique, joue un rôle essentiel dans ce processus. D'autres facteurs, notamment le transporteur ABCG1, sont nécessaires à la maturation de ces HDL [77] (Figure 16).



**Figure 16. Métabolisme intracellulaire du cholestérol.** Le cholestérol libre en excès est estérifié par l'ACAT et stocké sous forme de gouttelettes lipidiques. Le cholestérol estérifié peut être libéré par la CEH. L'efflux de cholestérol est médié par ABCA1 et ABCG1. (Tiré de Chang et al [77])

## 2. Formation des cellules spumeuses

La balance entre l'influx de cholestérol, le stockage et l'efflux est nécessaire pour éviter l'accumulation de lipides dans les cellules, et le développement de l'athérome. Dans des conditions athérogènes, l'internalisation du cholestérol est augmentée suite à l'augmentation de l'expression des récepteurs aux LDL (CD36 et SR-B1), alors que son efflux est diminué en raison de l'expression réduite de ABCA1 et ABCG1. A cela s'ajoute une estérification excessive due à l'élévation des taux d'ACAT1 et la diminution des taux de CEH. Ainsi, les esters de cholestérol s'accumulent dans les macrophages et CML sous forme de gouttelettes lipidiques, ce qui donne l'apparence de cellules spumeuses [78].

### 3. Mort des cellules spumeuses et induction de l'autophagie

Aux stades tardifs de l'athérosclérose, la mort des cellules spumeuses fragilise la plaque et favorise sa rupture. De nombreuses études identifient l'excès de cholestérol libre comme la principale cause de mort cellulaire, puisqu'il a été montré induire une toxicité dans des macrophages et des CML en culture.

D'un point de vue morphologique, les cellules chargées en cholestérol libre présentent aussi bien des signes d'apoptose que de nécrose. Dès les temps précoces du chargement en CL, une fraction des cellules montre les caractéristiques biochimiques de l'apoptose, tels que l'externalisation de la phosphatidylsérine et la fragmentation de l'ADN. Plus tardivement, des signes de nécrose apparaissent, incluant la rupture de membranes plasmique et le gonflement des organites [79].

Plusieurs mécanismes de cytotoxicité induite par le cholestérol libre ont été proposés. Lorsque le taux de CL est élevé, l'augmentation du ratio CL/phospholipides entraîne une rigidité des membranes cellulaires. Cette perte de fluidité inhibe la fonction de protéines essentielles résidant dans la membrane, comme par exemple les transporteurs de glucose ou les pompes ATPase Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>, ce qui conduit à la mort cellulaire.

D'autre part, l'accumulation de CL peut déclencher une réponse apoptotique qui implique l'induction de la voie Fas/Fas ligand, indépendamment des effets des CL sur la membrane plasmique. En plus de cette voie, une voie d'apoptose passant par la libération de cytochrome c par la mitochondrie a été observée. Une autre possibilité inclue les effets toxiques directs des CL sur les membranes mitochondriales, activant des voies de signalisation pro-apoptotiques. Cette dernière hypothèse a été proposée par Xu Kedi dans un modèle de CML surchargées en cholestérol. L'étude montre que les CL endommagent la structure et la fonction de certains organites cellulaires comme la mitochondrie et le réticulum endoplasmique. La dysfonction mitochondriale augmente la génération de ROS, ce qui activerait une voie d'apoptose médiée par la mitochondrie [23] [80].

Parmi les autres mécanismes potentiels impliqués dans la mort cellulaire, on observe la cristallisation du cholestérol intracellulaire. Des cristaux de cholestérol en forme d'aiguilles se forment lorsque le CL atteint un niveau élevé. Ces cristaux ont été observés aussi bien dans des macrophages en culture surchargés en cholestérol, que dans des cellules spumeuses isolées directement de lésions athéromateuses. Les cristaux de cholestérol intracellulaires endommagent probablement les cellules en rompant physiquement l'intégrité des structures intracellulaires.

Durant les processus d'accumulation de CL, l'activation de l'autophagie devient impliquée dans un mécanisme de survie qui prévient la mort cellulaire. L'autophagie est un processus catabolique permettant d'éliminer les organites et autres composants cytoplasmiques défectueux, et de libérer des éléments essentiels, comme les acides aminés, qui peuvent être ré-utilisés. Elle est notamment activée

en condition de stress bio-énergétique, comme une déprivation des cellules en micronutriments. Xu et son équipe montrent que le chargement en CL déclenche l'autophagie dans les CML, observée par l'accumulation de vacuoles d'autophagie et la conversion du microtubule associated protein 1 light chain (LC3-I) en sa forme conjuguée LC3-II. Cette autophagie, qui prévient la mort des CML, est inhibée par la 3-méthyladenine (3-MA) [81].

### **III. Formation de cristaux in vitro**

Bien que l'origine des cristaux de cholestérol ne soit pas connue, il a été proposé qu'ils se forment soit à partir de lipides accumulés dans les cellules spumeuses, soit à partir de lipides extracellulaires piégés dans la matrice de la lésion. Dans le premier cas, un phénomène de nucléation (l'apparition des premiers germes de cristal) surviendrait dans les cellules à partir d'une forte concentration de lipides, conduisant à la formation de cristaux. Alternativement, les lipides déposés par les LDL et les cellules spumeuses mourantes pourraient cristalliser dans le milieu de la lésion.

En 1994, l'équipe de Tangilara est la première à montrer la formation de cristaux de cholestérol in vitro [82]. Dans un modèle de macrophages chargés en CE, ils observent une accumulation de CL dans les lysosomes, générés par l'hydrolyse des CE. Au bout de 48 heures, à des concentrations élevées, le CL cristallise, formant des cristaux ayant l'apparence et les caractéristiques physiques de cholestérol monohydraté. Les cristaux sont ensuite relargués par les cellules et retrouvés dans le milieu de culture. Au microscope à fort grossissement, une membrane entourant les cristaux est observée, contenant des débris et des produits de réaction de la phosphatase acide, caractéristiques des lysosomes. Ces résultats suggèrent que la formation des cristaux de cholestérol a lieu dans les lysosomes enrichis en cholestérol.

Par la suite, Keinell Weiber a étudié la formation des cristaux dans des macrophages murins enrichis en lipides [83]. Dans leur modèle, l'ACAT est inhibée afin de faire pencher la balance en faveur de l'hydrolyse du cholestérol et engendrer une accumulation de CL. Comparé aux cellules non traitées, les cellules traitées à l'ACAT contiennent une large quantité de CL, révélés par un marquage à la filipine. Lorsqu'une concentration massive de CL intracellulaire est atteinte, l'apparition de cristaux en forme d'aiguilles et de plaques a été observée. Une fois que la nucléation a lieu, le cristal est rapidement expulsé de la cellule ou devient trop grand pour être contenu dans la cellule. Au bout d'un certain temps d'incubation, le nombre de cristaux reste constant alors que leur taille moyenne continue d'augmenter. Ceci montre que les cristaux extracellulaires continuent d'ajouter des molécules de cholestérol à leur surface. Les auteurs ont alors émis la possibilité que les cristaux pourraient provenir de l'intérieur des cellules, pour être ensuite expulsés, et continuer à grandir par l'ajout de cholestérol provenant de débris cellulaires et/ou de CL dérivés des LDL.

Ces études in vitro ont reproduit la formation de cristaux de cholestérol libre dans des modèles de macrophages spumeux. Elles montrent que l'accumulation de CL dans les lysosomes enrichis en lipides favorise la cristallisation. Cette accumulation intracellulaire de CL serait aidée par l'inhibition de l'ACAT, qui perturbe la balance entre le CE et le CL.

# Le syndécan-1

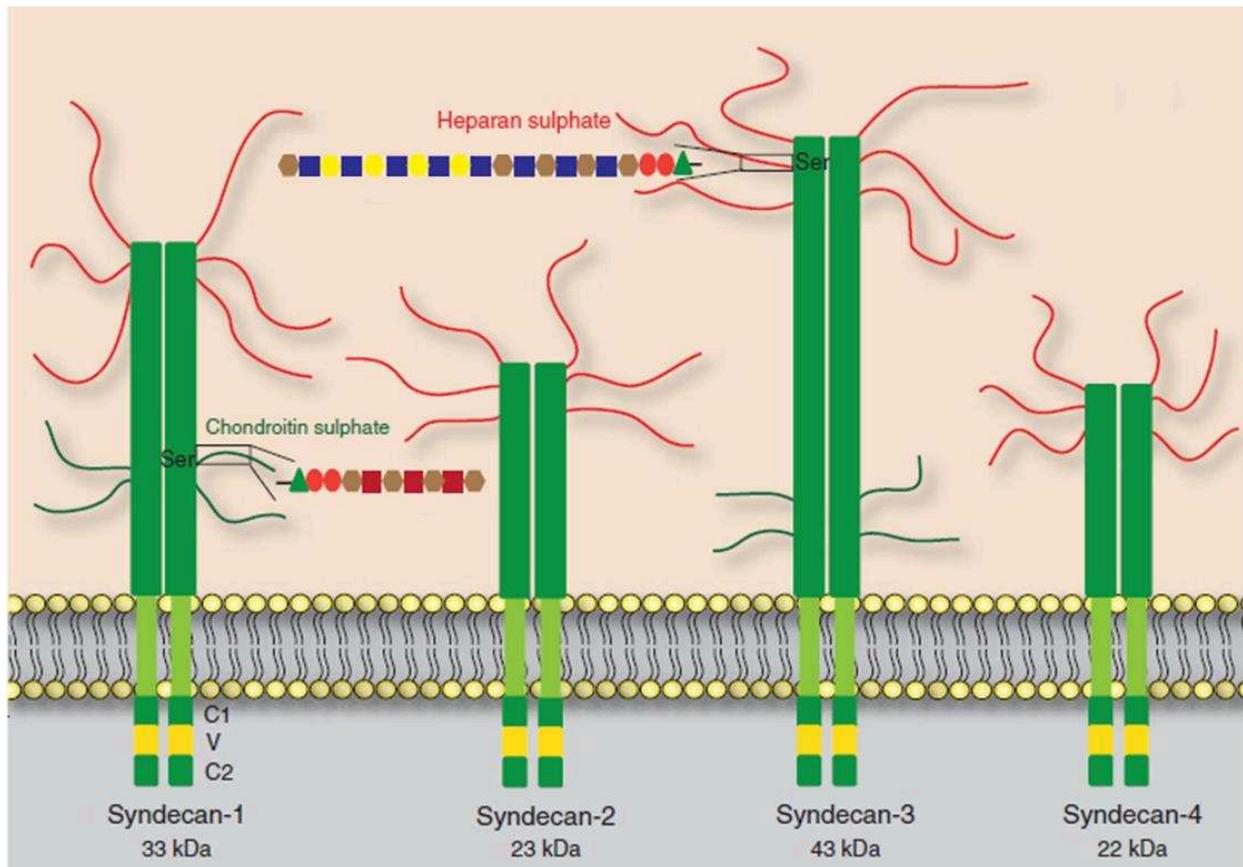
---

## I. La famille des syndécans

Les interactions cellule-MEC sont requises lors du développement normal, mais également impliquées lors de processus physiologiques et pathologiques, tels que la réparation tissulaire, la migration, l'apoptose. Les principaux récepteurs impliqués dans ces interactions sont les intégrines et les protéoglycans associés aux cellules. Parmi les protéoglycans, les syndécans ont émergé comme des acteurs majeurs régulant la signalisation et le phénotype cellulaire [84].

### 1. Structure

Les syndécans forment une famille de protéines transmembranaires constituées d'un domaine extracellulaire portant des chaînes heparane sulfate et chondroïtine sulfate. Alors que les invertébrés n'expriment qu'un type de syndécan, quatre syndécans différents sont retrouvés chez les vertébrés (syndécan-1, -2, -3, -4). Chaque membre de la famille des syndécans a un profil d'expression spatial et temporel distinct. Dans les tissus adultes, le syndécan-1 est principalement exprimé par les cellules épithéliales et les cellules plasmatiques, bien qu'il soit également exprimé à un niveau plus faible dans d'autres types cellulaires. Le syndécan-2 est retrouvé dans les cellules endothéliales et mésenchymateuses, alors que l'expression du syndécan-3 est restreinte aux cellules dérivées de la crête neurale. Le syndécan-4 est exprimé de manière ubiquitaire mais à un niveau plus faible comparé aux autres syndécans [85]. Structurellement, chaque syndécan est constitué d'un ectodomaine portant des chaînes de GAGs, d'un domaine transmembranaire, et d'un court domaine cytoplasmique conservé (Figure 17).



**Figure 17. La famille des 4 syndécans.** Les syndécans sont des protéoglycans transmembranaires constitués d'un ectodomaine lié à des chaînes de GAGs, et d'un domaine intracellulaire. Le domaine intracellulaire comprend les régions C1 (juxta-membranaire) et C2 (C-terminale), entourées d'une région V variable. Les syndécans diffèrent par leur taille et leur composition en GAGs. (Manon Jensen, FEBS Journal 2010)

L'ectodomaine porte des chaînes de GAGs associées au cœur protéique au niveau de résidus sérines. Excepté ces sites d'attachement, la séquence en amino-acides de l'ectodomaine varie considérablement entre les membres de la famille de syndécans. L'héparane sulfate est le principal GAG présent chez les quatre syndécans, bien que les syndécans -1 et -3 comportent également des chaînes chondroïtine sulfate. Les GAGs sont composés d'un enchaînement de 50 à 150 disaccharides répétés, qui sont soit le N-acetylglucosamine et l'acide uronique dans les chaînes héparane sulfate, soit le N-acetylgalactosamine et l'acide uronique dans les chaînes chondroïtine sulfate. La variabilité des chaînes de GAGs résulte de leur longueur, de leur charge, de la composition en sucres, et du degré de modifications (sulfatation). De la composition des chaînes héparane sulfate résulte l'interaction des syndécans avec divers facteurs solubles et composants de la MEC [86].

Contrairement à l'ectodomaine, le domaine transmembranaire est fortement conservé entre les quatre membres de la famille des syndécans. Composé de 25 résidus d'acides aminés hydrophobes, il contient un motif GxxxG qui est responsable de la dimérisation/oligomérisation des syndécans. La liaison de ces homo-multimères a la particularité d'être résistante au détergent anionique SDS (sodium dodecyl sulfate) [87]. Cette oligomérisation non-covalente apparaît cruciale dans l'habilité des syndécans à transmettre des signaux de la MEC au cytosol de la cellule [88].

Le domaine cytoplasmique, bien que de petite taille, comprend plusieurs régions importantes. Il est divisé en deux régions conservées C1 et C2, séparées par une région variable (V).

Le domaine C1, immédiatement adjacent à la membrane plasmique cellulaire, est identique chez les quatre membres des syndécans [89]. Il est connu pour être impliqué dans la dimérisation des syndécans et dans la liaison à certaines protéines intracellulaires, notamment la cortactin et la Src-kinase qui sont impliqués dans la croissance cellulaire [90], et l'eitrine qui interagit avec le cytosquelette [91]. Le domaine conservé C-terminal C2, contient un site de liaison (PDZ) et deux résidus tyrosine. Les protéines qui interagissent avec ce site de liaison PDZ incluent : la synténine, la synectine, la synbindine, et la protéine kinase dépendante du complexe calcium calmoduline. Ces interactions exercent des effets divers. Par exemple, la synténine est impliquée dans le recyclage des syndécans à la membrane plasmique [83], alors que la liaison de la synectine au syndécan-4 inhibe la migration cellulaire [92]. La région V, bien que conservée entre espèces, est spécifique à chaque syndécan. Elle a été particulièrement décrite chez le syndécan-4 à cause de ses caractéristiques particulières. La région V du syndécan-4 contient en effet un site de liaison au phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) qui est impliqué dans la dimérisation. De plus, la liaison au PIP2 module l'activation de la Protéine Kinase C alpha (PKC $\alpha$ ), une enzyme qui joue un rôle clé dans la signalisation du syndécan-4. Peu de données sont disponibles concernant le rôle de la région V chez les autres syndécans, bien qu'elles participent probablement à leur spécificité fonctionnelle et d'interaction.

De par leur structure, les syndécans exercent diverses fonctions. Généralement, ils agissent en tant que co-récepteurs, facilitant l'interaction des ligands avec leur récepteur primaires. C'est le cas des syndécan-1 et -4, qui présentent le FGF-2 à son récepteur à tyrosine kinase FGFR et stabilisent le complexe ainsi formé [93]. Les syndécans peuvent également transmettre des signaux intracellulaires en réponse à l'engagement avec la MEC. Etant donné leurs interactions multiples avec des kinases, GTPases, et molécules du cytosquelette, ils exercent des rôles importants dans divers phénomènes cellulaires telles que l'adhérence, la migration, l'organisation du cytosquelette, et la différenciation. Par ailleurs, il a été décrit que le syndécan-1 et le syndécan-4 sont capables de générer une signalisation propre. En effet, l'internalisation de la protéase-nexine 1 par le syndécan-1 dans les fibroblastes stimule une voie de signalisation Ras-Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERK).[94]

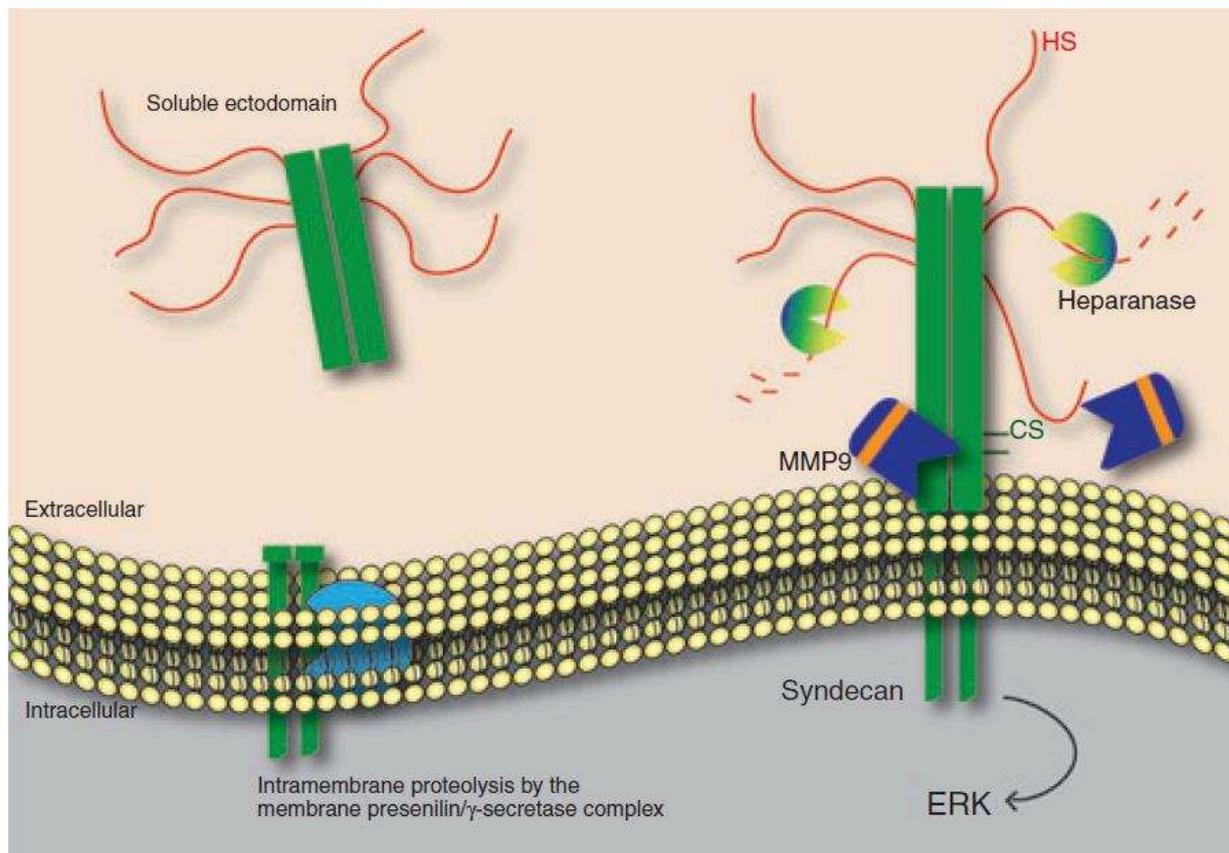
Quant au syndécan-4, il agit comme un co-récepteur de la chimiokine Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES)/CCL5, et active une voie de signalisation PKC $\alpha$  par l'intermédiaire de son domaine intracellulaire, ce qui aboutit à la migration de cellules endothéliales in vitro [95].

## 2. Régulation de l'activité par le shedding

Les syndécans subissent un clivage protéolytique, au niveau de la région juxta-membranaire, nommé « shedding » (Figure 18). Bien que l'ectodomaine des syndécans soit constitutivement sheddé en condition physiologique, ce processus peut être accéléré en réponse à certains stimuli, comme les facteurs de croissance, les chimiokines, le stress cellulaire [86]. Ce shedding génère des ectodomains solubles qui peuvent agir comme des effecteurs paracrine ou autocrine, ou inhiber de façon compétitive les syndécans intacts en se liant aux ligands extracellulaires de l'environnement péricellulaire. Etant donné que les syndécans sont d'importants co-récepteurs, notamment pour les récepteurs d'adhérence et les récepteurs de facteurs de croissance, la perte de l'ectodomaine peut également aboutir à une terminaison de la signalisation [96]. La partie restante liée à la membrane, incapable de lier les ligands, est prise en charge par le complexe presenilin/  $\gamma$ -secretase, ce qui aboutit à sa protéolyse.

Le shedding de l'ectodomaine est un processus régulé qui requiert l'action directe d'enzymes, les sheddases. Les évidences indiquent l'implication de plusieurs MMP dans le clivage des syndécans. La matrilysin (MMP-7) clive le syndécan-1, les gélatinases MMP-2 et MMP-9 peuvent cliver les syndécans -1,-2 et -4, alors que les métalloprotéases associés à la membrane MT1-MMP et MT3 MMP3 sont connus pour cliver le syndécan-1. Le syndécan-4 est clivé par les sérines protéases, la plasmine et la thrombine. La famille des disintegrin et metalloproteinase ADAM participe également au shedding, notamment ADAM17 qui est connu pour cliver les syndécan-1 et -4. Alors que les sheddases tels que les MMP et ADAM libèrent des ectodomains solubles, les endosulfatases et héparanases modifient la structure et la disponibilité des chaînes héparane sulfate, inhibant leur habilité à lier certains ligands [97].

Plusieurs évidences indiquent que le clivage des syndécans est impliqué dans divers processus physiopathologiques, incluant la réparation tissulaire, le cancer, et les maladies infectieuses. Un taux circulant élevé d'ectodomains du syndécan-1 est notamment retrouvé chez les patients ayant fait un sepsis, ainsi que dans certains types de cancer [98]. L'importance du shedding a particulièrement été observée chez les patients atteints de myélome, un cancer de la moelle osseuse, où le taux élevé de syndécan-1 sheddé est associé à un mauvais pronostic [99].



**Figure 18. Le clivage des syndécans.** Les syndécans sont sheddés par des enzymes, comme par exemple la MMP-9 qui clive au niveau juxta-membranaire. Ce shedding libère des ectodomains solubles. L'héparanase clive uniquement les chaînes héparane sulfate. (Tiré de Manon Jensen et al [96])

## II. Rôle du syndécan-1 en physiopathologie

Le syndécan-1 (également appelé CD138) a le potentiel d'interagir avec une grande variété de ligands, parmi lesquels des facteurs de croissance, cytokines et molécules de la MEC impliqués dans la réparation vasculaire, l'hypoxie, l'angiogenèse, la fonction immunitaire [100]. Cependant, les souris déficientes en syndécan-1 sont viables et fertiles, et ne présentent pas de pathologies majeures. Des phénotypes particuliers émergent lorsque ces souris sont mises au contact de conditions ou d'agents pathogènes. Par exemple, alors que les souris déficientes en syndécan-1 développent un tissu épithélial normal, la réparation tissulaire en réponse à une blessure de la peau est affectée [101]. Il est alors possible que les autres syndécans compensent de façon fonctionnelle la perte de syndécan-1 lors du développement, mais pas lors de phénomènes post-développemental telle qu'une condition

pathologique. Ce phénomène de compensation n'a toutefois pas été clairement démontré. Néanmoins, les études utilisant des modèles animaux indiquent que le syndécan-1 exerce un rôle important dans divers processus pathologiques incluant l'inflammation, le cancer, ainsi que certaines maladies cardiovasculaires.

## **1. Inflammation**

L'inflammation est une réponse fondamentale de l'hôte suite à un agent pathogène pouvant causer une lésion du tissu. La réponse inflammatoire implique une étape de recrutement des leucocytes au site de la lésion, durant laquelle les leucocytes circulants adhèrent à l'endothélium puis migrent vers le tissu. Une des principales fonctions du syndécan-1 dans l'inflammation est de réguler négativement l'adhérence des leucocytes et leur migration, possiblement en inhibant l'interaction entre les intégrines des leucocytes et les récepteurs d'adhérence des cellules endothéliales, ICAM-1 et VCAM-1. Cet effet a été démontré dans plusieurs modèles de maladies inflammatoires, incluant la dermatite allergique de contact ou la colite [102].

Le syndécan-1 régule également la génération et l'activité des gradients de chimiokines, qui dirigent la migration des leucocytes vers le site de lésion. La coopération entre le syndécan-1 et les chimiokines a notamment été montrée dans un modèle de fibrose pulmonaire. En effet, dans cette pathologie, les cellules épithéliales sécrètent d'une part des chimiokines qui se lient au syndécan-1, et d'autre part la métalloprotéase matrilysine. Cette dernière clive le syndécan-1, libérant ainsi les complexes ectodomaine-chimiokines qui créent alors le gradient chimiotactique [103]. Une autre étude, s'intéressant aux gradients de l'IL-8, montre une conséquence du shedding différente. Dans ce modèle *in vitro*, les complexes chimiokine Il-8/syndécan-1 sont immobilisés sur l'endothélium et guident la migration trans-endothéliale des neutrophiles. Dans ce cas, en décrochant les complexes syndécan-1/IL-8, le shedding du syndécan-1 inhibe la migration [104]. Une fois que les agents pathogènes sont éliminés, il est impératif d'arrêter l'inflammation avant qu'elle ne soit délétère pour les tissus. Dans un modèle de choc endotoxique chez la souris, il a été montré que le shedding du syndécan-1 facilite la résolution de l'inflammation, en déplaçant les chimiokines séquestrées dans le tissu. Plusieurs mécanismes ont été proposés. D'une part, le shedding permettrait de relarguer les chimiokines attachés au syndécan-1 de la surface cellulaire. D'autre part, il libèrerait des ectodomains libres qui déplacent les chimiokines liées aux syndécan-1 de surface [85].

## **2. Cancer**

L'expression du syndécan-1 est dérégulée dans plusieurs types de cancers, incluant le cancer de la prostate, du sein, du pancréas, de l'ovaire, et du colon. Une faible expression du syndécan-1 dans les tissus est associée à un mauvais pronostic au niveau des cancers des voies aérodigestives supérieures

(cavités orale et nasale, pharynx, larynx), des poumons [105], et colorectal [106], alors qu'un niveau élevé de syndécan-1 sheddé dans le sérum est associé à un mauvais pronostic dans le cancer du poumon et le myélome [99]. Ces résultats indiquent que le syndécan-1, comme d'autres protéoglycans, a d'importantes fonctions dans la biologie de la tumeur. Les études suggèrent d'ailleurs que le syndécan-1 module plusieurs étapes clés de la tumorigenèse, telle que la prolifération des cellules cancéreuses, l'apoptose, l'angiogenèse, et la dissémination des métastases [107].

#### **a. Croissance des cellules cancéreuses et apoptose**

Le syndécan-1 affecte la tumorigenèse en régulant des médiateurs de la survie et de la prolifération des cellules tumorales. Il fonctionne notamment comme un co-récepteur dans la voie de signalisation Wnt, qui induit la tumorigenèse mammaire. Dans le myélome, l'interaction du syndécan-1 avec le facteur de croissance Hepatocyte Growth Factor (HGF) potentialise la voie de signalisation du récepteur à activité tyrosine kinase Met, qui est impliqué dans la croissance des cellules myélomateuses [108]. Le syndécan-1 a également un effet paracrine sur l'activation de la voie Met, par l'intermédiaire de ses ectodomains clivés qui présentent le HGF aux ostéoblastes, conduisant à l'inhibition de la formation osseuse. Certaines études suggèrent que le syndécan-1 inhibe l'apoptose des cellules tumorales [109]. Dans d'autres cas, il a été montré que le syndécan-1 stimule l'apoptose, notamment dans des cellules de cancer du sein [110]. En fonction du microenvironnement tumoral, l'activité des chaînes héparane sulfate serait modifiée pour favoriser ou atténuer la croissance des tumeurs.

#### **b. Invasion cellulaire et métastase**

La métastase des cellules cancéreuses implique des phénomènes d'adhérence cellulaire, de migration et de dégradation de la MEC. Il a été montré que le syndécan-1 favorise l'adhérence de ces cellules à la matrice et retarde leur migration. Dans une étude de cellules de carcinomes par exemple, la perte de syndécan-1 entraîne une augmentation de l'invasion des cellules sur collagène [107]. La coopération du syndécan-1 avec les intégrines stabilise les adhésions focales et le cytosquelette d'actine, résultant en une locomotion réduite. La perte du syndécan-1 de surface favoriserait alors l'acquisition d'un phénotype métastatique des cellules cancéreuses.

#### **c. Angiogenèse tumorale**

L'angiogenèse est le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux déjà formés. C'est un processus physiologique normal qui a lieu lors du développement, mais qui est également sollicité en conditions pathologiques lors de la croissance des tumeurs. En effet, lorsqu'une tumeur atteint une certaine taille, sa croissance ralentit puisqu'elle n'est plus suffisamment alimentée

par la circulation sanguine. Les cellules cancéreuses stimulent alors l'angiogenèse tumorale afin de générer de nouveaux vaisseaux permettant l'apport de nutriments et d'oxygène. Le syndécan-1, qui se lie à des facteurs pro-angiogéniques tels que FGF-2 et VEGF, peut favoriser l'angiogenèse en présentant ces ligands à leurs récepteurs sur les cellules endothéliales. Il a également été montré une implication des ectodomains solubles du syndécan-1 sur l'angiogenèse. Le niveau de syndécan-1 clivé dans l'environnement tumoral est associé à une angiogenèse élevée et à un mauvais pronostic du myélome. Dans le myélome, le shedding du syndécan-1 facilite l'invasion endothéliale et l'angiogenèse subséquente [111]. La liaison des ectodomaines du syndécan-1 aux intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  apparaît nécessaire à sa fonction pro-angiogénique, puisque la synstatine, un peptide inhibiteur qui mime la partie de l'ectodomaine liant les intégrines, empêche cette interaction et inhibe l'invasion des cellules endothéliales et la croissance tumorale in vivo [112].

### **3. Maladies infectieuses**

Une grande variété de pathogènes, incluant les virus, les bactéries et les parasites, utilisent les chaînes héparane sulfate de la surface cellulaire comme récepteurs d'attachement. Les études suggèrent que le syndécan-1 est impliqué dans plusieurs étapes de l'infection, incluant l'attachement initial et l'entrée subséquente de pathogènes dans les cellules hôtes, ainsi que l'inhibition des mécanismes de défense de l'hôte. Par exemple, le virus de l'hépatite E, ainsi que le virus HPV responsable du papillomavirus, se lient au syndécan-1 pour s'attacher à leur cellule hôte. Certaines bactéries, telles que *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus*, sont connues pour induire le shedding du syndécan-1. Dans le cas de *P. aeruginosa*, le shedding du syndécan-1 augmente la virulence bactérienne dans les cellules épithéliales de poumon. De même, *S. aureus* exploite la capacité des ectodomains du syndécan-1 à inhiber l'action des neutrophiles pour promouvoir l'infection de la cornée [85].

### **4. Syndécan-1 et pathologie cardio-vasculaire**

#### **a. Fibrose cardiaque**

Souvent associée à l'hypertension ou l'infarctus du myocarde, la fibrose est un des mécanismes clés du remodelage pathologique. Elle se caractérise par l'accumulation excessive de protéines de la MEC, résultant en une rigidité du myocarde. Ce remodelage matriciel altère les fonctions de contraction (systole) et de relâchement (diastole) du cœur, aboutissant à terme à l'insuffisance cardiaque. Les mécanismes mis en jeu ne sont pas élucidés mais certains facteurs tels que l'angiotensine II, le TGF- $\beta$ , et le Connective Tissue Growth Factor (CTGF) sont associés à l'augmentation de synthèse du collagène et d'autres protéines matricielles impliqués dans ces changements structurels.

Schellings et al ont identifié le syndécan-1 comme étant un médiateur essentiel dans la fibrose cardiaque induite par l'angiotensine II. En effet, chez la souris traitée à l'angiotensine II, l'expression du syndécan-1 est augmentée et prédomine dans les régions profibrotiques du cœur. Chez la souris déficiente en syndécan-1, le développement de la fibrose et la dysfonction cardiaque sont atténués, cet effet étant associé à une diminution de l'expression du CTGF. Ainsi, le syndécan-1 serait un important régulateur du développement de la fibrose cardiaque par son effet sur l'expression du CTGF [113].

#### **b. Anévrismes de l'aorte abdominale**

Les anévrismes de l'aorte abdominale (AAA) sont définis par une dilatation anormale de l'aorte abdominale. Classiquement, l'athérosclérose est considérée comme la cause la plus fréquente de l'AAA, bien que d'autres facteurs, génétiques ou environnementaux, soient associés au développement de la maladie. Les caractéristiques histopathologiques de l'AAA incluent une fragmentation de l'élastine, l'infiltration de cellules inflammatoires, et la dégradation de la média.

Dans un modèle expérimental d'AAA par perfusion d'élastase ou infusion d'angiotensine II, Wen montre que l'expression du syndécan-1 associé aux macrophages est augmentée dans la paroi artérielle durant le développement de l'anévrisme [114]. Chez les souris knock-out, la déficience en syndécan-1 favorise la formation de l'anévrisme et est associée à une augmentation de la dégradation de l'élastine, et un recrutement augmenté de cellules inflammatoires dans la paroi artérielle. Les macrophages exprimant le syndécan-1 modifient l'environnement en chimiokines, conduisant à une diminution de l'infiltration des lymphocytes T. Le syndécan-1 aurait une fonction protectrice importante dans la formation des anévrismes qui serait en partie liée à son effet modulateur des réponses inflammatoires [115].

#### **c. Artériogénèse post-ischémique**

L'artériogénèse est le remodelage d'une artère déjà formée en réponse au flux sanguin. Ce processus est une réponse compensatoire importante dans l'occlusion artérielle causée par l'athérosclérose. Une étude de 2015 montre que le syndécan-1 affecte l'artériogénèse en réponse à une ischémie des membres inférieurs et que sa présence dans l'environnement tissulaire local est requise pour un développement normal des artères [116].

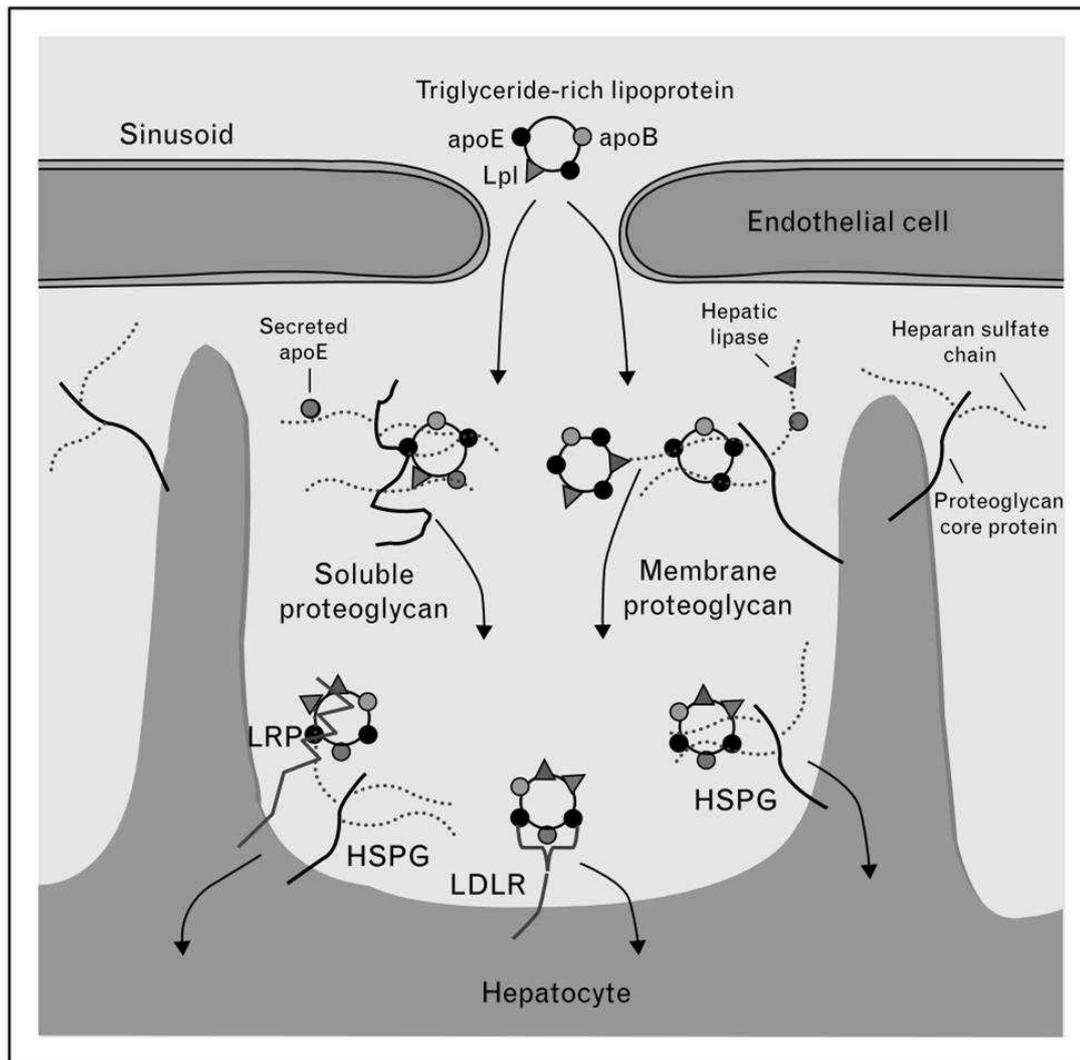
### **5. Syndécan-1 et métabolisme des lipoprotéines**

L'accumulation de lipoprotéines riches en triglycérides (TRLs) dans le sang, est un facteur de risque des maladies cardiovasculaires. Ces TRLs circulantes proviennent de l'alimentation (chylomicrons) ou de lipides synthétisés de novo par le foie (VLDL). Dans la circulation, les triglycérides des

chylomicrons et des VLDL sont hydrolysées par la lipoprotéine lipase (LPL), qui est immobilisé à la surface des cellules endothéliales. Les acides gras libérés sont alors récupérés par les tissus environnants et utilisés pour la production d'énergie ou le stockage. Les restes de lipoprotéines circulantes, dont le cœur a été appauvri en triglycérides, sont éliminés de la circulation et métabolisés dans le foie par l'intermédiaire de récepteurs d'endocytose [117]. Plusieurs récepteurs, dont les protéoglycans à chaînes héparane sulfate et le récepteur au LDL, avec le récepteur docking SR-B1, contribuent au catabolisme de ces restes de lipoprotéines.

La démonstration d'une implication des protéoglycans à chaînes héparane sulfate (HSPGs) dans la clairance des TRLs a été initié par K.J. Williams et R.W. Mahley [118] [119]. Leurs résultats ont mis en évidence une diminution de l'internalisation des lipoprotéines par des cellules déplétées pharmacologiquement en GAGs, et sur des cellules CHO déficientes en enzymes de synthèse des chaînes héparane sulfate. Par la suite, les études ont été étendues à l'identification du syndécan-1 comme étant le protéoglycan majeur impliqué dans la clairance des TRLs. Dans une publication récente, Stanford a montré que la souris déficiente en syndécan-1 présente une clairance retardée des TRLs [117]. Ce défaut n'étant pas augmenté chez la souris double déficiente en syndécan-1 et en N-Deacetylase/N-Sulfotransférase 1 (NDST1), l'enzyme requise pour l'assemblage des chaînes héparane sulfate sur tous les HSPGs hépatique, le syndécan-1 apparait comme le principal protéoglycan impliqué. Par ailleurs, le croisement de souris mutantes à la fois pour l'enzyme NDST1 et pour le récepteur au LDL (LDLR) résulte en une accumulation plus élevée de TRLs par rapport aux souris mutées uniquement pour le LDLR, suggérant que les HSPGs agiraient indépendamment du LDLR. Parmi les protéines associées aux lipoprotéines, l'apoB, l'apoE, l'apoA-V, la lipase hépatique, et le LPL ont une affinité pour les chaînes héparane sulfate [120]. Récemment, une étude a ainsi montré que l'apoE et l'apoAV sont les particules dominantes impliquées dans la liaison des TRLs aux HSPGs chez la souris [121]. La voie d'endocytose médiée par le syndécan-1 diffère considérablement de l'internalisation médiée par le LDLR. Alors que l'endocytose par le LDLR passe par une voie rapide dépendante de la clathrine avec un temps de demi-vie des récepteurs à la surface de 5-10 minutes, l'internalisation médiée par le syndécan-1 nécessite un clustering et se ferait par la voie d'un raft lipidique à une cinétique lente ( $t_{1/2}=20-60$ minutes).

En plus d'agir comme un récepteur, le syndécan-1 pourrait également faciliter indirectement l'internalisation des TRLs dans le foie. En effet, le syndécan-1 localisé à la surface des hépatocytes ou sécrété dans l'espace de Disse (entre le vaisseau sanguin et l'hépatocyte), pourrait piéger les TRLs afin de les passer à d'autres comme le LDLR ou la Lipoprotein-related Receptor Protein (LRP) [122] (Figure 19).



**Figure 19. Protéoglycans à chaînes héparane sulfate et métabolisme des lipoprotéines.** Après hydrolyse par la LPL, les TRLs entrent dans l'espace de Disse où ils interagissent avec les HSPGs. L'endocytose des lipoprotéines se fait par le LDL R, par les HSPGs, ou par le LRP. (Tiré de Bishop et al [120])

## 6. Syndécan-1 et physiologie de la CML

Les CML vasculaires présentent une continuité de phénotypes qui peuvent être altérés lors du remodelage vasculaire. Les études antérieures rapportent que les changements de l'environnement cellulaire modifient le phénotype de la CML via des interactions avec une variété de récepteurs d'adhérence. Alors que les syndécans ont émergé comme des régulateurs complexes et puissants de la fonction cellulaire, leur rôle dans la physiologie de la CML n'est pas bien connu.

Lors d'une lésion artérielle, les CML de la média migrent vers l'intima où elles prolifèrent et élaborent la MEC. Dans l'artère du lapin, Wang a observé que le syndécan-1 est surexprimé dans la néo-intima

formée à la suite d'une lésion induite par cathéter à ballonnet [123]. Dans ce contexte, la formation de néo-intima serait en partie due au stress mécanique subi par la paroi artérielle, et qui est associée à la contrainte exercée par le ballonnet. De même, une corrélation existe entre les sites de prédisposition à l'athérosclérose et les zones de turbulences sanguines. Au niveau des branches de divisions et bifurcations, les contraintes mécaniques cycliques dues à la pulsation du flux sanguin seraient un important stimulus de l'athérosclérose. Julien a étudié l'expression du syndécan-1 en réponse à différents profils de forces, représentatives des contraintes mécaniques subies par les CML in vivo. Alors qu'une contrainte statique induit peu de variation d'expression du syndécan-1, l'application de contraintes cycliques induit une surexpression du syndécan-1 ainsi que l'augmentation de son shedding [124].

Par la suite, Fukai a étudié l'effet du syndécan-1 sur la formation d'une néo-intima, à partir d'un modèle de souris où l'artère carotidienne a été ligaturée. Chez la souris déficiente en syndécan-1, une large lésion néo-intimale se développe alors que la souris sauvage n'en présente pas ou peu. Comparé aux CML contrôle, la prolifération des CML de souris déficientes est augmentée en réponse à divers facteurs de croissance, tel que PDGF-BB et FGF2. Cet effet est inhibé par l'extinction de l'expression de PDGFR- $\beta$ , ce qui suggère que le syndécan-1 pourrait limiter l'épaississement intimal dans les artères lésées en supprimant l'activation de la CML par PDGFR- $\beta$  [125].

En 2014, une étude de Chaterji montre que la déficience en syndécan-1 altère le phénotype de la CML en le conduisant vers un état dédifférencié. Les CML isolées de souris knock-out ont en effet une prolifération augmentée, et présentent une réduction de l'expression des marqueurs de fonction contractile, telle que l'actine et la calponine, associée à une augmentation de l'expression du facteur tissulaire comparé aux cellules des souris sauvages. Stimulées par le TNF- $\alpha$ , ces CML ont une expression de IL-6 et MCP-1 doublée par rapport aux CML contrôles, suggérant une sensibilité plus forte aux stimuli inflammatoires. L'inhibition des interactions entre le syndécan-1 et les intégrines  $\alpha v \beta 3$  et  $\alpha v \beta 5$  par l'utilisation d'un peptide inhibiteur, la synstatine, apparaît avoir des effets similaires au knock out du syndécan-1 sur la CML, indiquant que l'activité du syndécan-1 serait liée à ces intégrines [126].

Dans l'ensemble, ces résultats identifient le syndécan-1 comme un modulateur du phénotype de la CML, capable de réguler divers aspects de la biologie de la CML, incluant la contraction et l'inflammation. En maintenant l'état différencié de la CML, la présence du syndécan-1 pourrait avoir un effet vasculo-protecteur dans un contexte de pathologie et de lésion vasculaire.

# Objectifs de la thèse

---

Comprendre les mécanismes cellulaires conduisant au développement de l'athérosclérose est essentiel afin d'identifier des stratégies limitant la progression de la maladie. Pendant longtemps, les revues décrivant les étapes initiales de l'athérosclérose se concentraient sur le rôle de l'endothélium et des cellules inflammatoires. Le rôle des CML était considéré plus tardivement, lorsqu'après avoir migré dans l'intima elles sécrètent de la MEC pour stabiliser la plaque. Mais les études montrent que les CML sont présentes dans l'intima dès les premiers stades de l'athérosclérose, et même avant, dans les régions susceptibles de développer des lésions. Ces CML, qui ont subi une modulation phénotypique, présentent diverses fonctions qui favorisent la genèse et le développement des lésions.

Ce projet de thèse porte sur la modulation phénotypique de la CML, et sur l'implication de ces cellules dans l'évolution des lésions d'athérosclérose. Il s'articule en deux parties.

La première partie s'intéresse au processus de modulation phénotypique de la CML lors des stades précoces de l'athérosclérose. Nous avons voulu déterminer le rôle d'un protéoglycan particulier, le syndécan-1, dans ce phénomène. Alors que le rôle des protéoglycans de la MEC dans l'athérosclérose a été bien décrit, notamment au niveau de la rétention des LDL dans l'espace sous-endothélial, l'implication des protéoglycans portés par les cellules n'est pas connue. Parmi les récepteurs présents à la surface des CML, le syndécan-1 est un protéoglycan important dans la physiologie de ces cellules. Il a été montré être un modulateur du phénotype de la CML, puisque sa déficience chez la souris conduit la CML vers un phénotype dé-différenciée, avec une diminution de l'expression des protéines contractiles et une augmentation de la prolifération. Il a par ailleurs la capacité d'interagir avec les lipoprotéines et a été identifié comme un acteur majeur de la clairance hépatique chez la souris. Son rôle dans l'athérosclérose n'ayant pas été élucidé, un des objectifs de la thèse a été de caractériser son expression dans les stades précoces de l'athérosclérose. Nous avons également cherché à étudier son influence sur certaines fonctions des CML, en particulier l'internalisation des LDL ainsi que l'expression des marqueurs de fonction contractile et des protéines de la MEC.

Parallèlement à ces travaux, une deuxième partie porte sur la formation des cristaux de cholestérol dans la plaque, un phénomène arrivant plus tardivement. Les études montrent que ces cristaux sont directement impliqués dans la rupture de plaque puisqu'ils peuvent induire une rupture mécanique de la chape fibreuse, ou déclencher des voies inflammatoires fragilisant la plaque. Bien que la présence des cristaux dans les plaques avancées ait été bien décrite, leur origine n'a pas été élucidée. L'objectif de ce projet est donc de déterminer le stade d'apparition et les mécanismes de formation de ces

cristaux. Afin d'éviter la dissolution des cristaux ou la cristallisation artefactuelle, nous avons travaillé principalement sur des coupes d'aortes fraîches, non paraffiné et non congelé. Par ailleurs, l'implication des CML sur la formation des cristaux a été explorée.

Dans les deux parties du projet, l'étude s'appuie sur l'utilisation d'échantillons humains provenant de la biobanque de l'unité. Les tissus sont des échantillons d'aortes de patients sains, et présentant des stries lipidiques et plaques fibrolipidiques, ce qui en fait un matériel particulièrement adapté à l'observation des phénomènes survenant aux stades précoces de l'athérosclérose. Les mécanismes pathologiques impliquant les CML ont été étudiés sur des CML primaires différenciées, obtenus à partir de prélèvement d'aortes saines et caractérisées afin de vérifier qu'elles expriment bien les marqueurs de protéines contractiles.

# RESULTATS



## **Partie I**

### **Expression du syndécan-1 dans les lésions précoces d'athérosclérose humaine et implication dans la modulation du phénotype de la CML**

#### **Introduction**

Les cellules musculaires lisses (CML) sont prépondérantes dans l'intima des lésions précoces d'athérosclérose. Contrairement aux CML de la média qui sont différenciées et contractiles, certaines CML de l'intima ont subi une transition phénotypique et acquièrent diverses fonctions qui favorisent le développement des lésions. Cette transition est sous l'influence de certains facteurs solubles comme le TGF- $\beta$ 1, qui est un puissant inducteur de leur état contractile. Les CML dé-différenciées présentent, quant à elles, une augmentation de la prolifération et de la migration, associée à une capacité accrue de synthétiser de la matrice extracellulaire. Il a par ailleurs été montré qu'une fraction de ces CML internalise les lipoprotéines de basse densité (LDL) et participe à la formation de cellules spumeuses. La transition phénotypique est un événement critique dans les stades précoces de l'athérogenèse, mais les mécanismes contribuant à ces modifications n'ont pas été clairement définis.

Le syndécan-1 est un protéoglycan transmembranaire qui se lie à divers ligands, régulant les interactions entre les cellules et leur environnement. Présent à la surface des CML, il a été identifié comme un intervenant potentiellement important dans le comportement des CML lors du remodelage de la paroi artérielle. Des études ont en effet montré que le syndécan-1 est surexprimé par les CML lors de l'application de contraintes mécaniques cycliques *in vitro* [124], ainsi que chez le lapin après angioplastie par ballonnet, où il inhibe la formation de la néo-intima [125]. En 2014, les travaux de Chaterji ont montré que le syndécan-1 maintenait l'état différencié de la CML en favorisant l'expression des gènes de marqueurs contractiles (SM  $\alpha$ -actine, myosine) [126]. De plus, le syndécan-1 a été identifié comme étant un récepteur majeur pour la clairance hépatique des lipoprotéines chez la souris [117]. Compte tenu de ces différentes observations, nous avons émis l'hypothèse que ce protéoglycan pourrait-être régulé dans la plaque d'athérosclérose, et qu'il pourrait moduler l'état de différenciation ainsi que l'internalisation des lipoprotéines par ces cellules.

L'expression du syndécan-1 a été analysée dans les lésions athéromateuses humaines aux niveaux messenger et protéique. Nous avons observé que le syndécan-1 est surexprimé dans les stries lipidiques

et les lésions fibrolipidiques, et particulièrement par les CML localisées dans l'épaississement intimal et la chape fibreuse. Son impact sur le phénotype de la CML a été analysé à l'aide d'une stratégie basée sur la transduction lentivirale afin d'obtenir des cellules surexprimant le syndécan-1 de manière stable. Nos résultats indiquent que le syndécan-1 n'a pas d'implication dans l'internalisation des LDL par les CML, mais qu'il contribue à la modulation de l'expression de la SM  $\alpha$ -actine, de la calponine et de la smootheline, ainsi que du collagène de type I, induite par le TGF- $\beta$ 1.

**Syndecan-1 is overexpressed in early atheromatous aortas and is involved in smooth muscle cell phenotypic changes**

Sophie VO<sup>1,2</sup>, Catherine DESCHILDRE<sup>1</sup>, Liliane LOUEDEC<sup>1</sup>, Nathalie CHARNAUX<sup>1,2</sup>, Benjamin RICHARD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Inserm Unit 1148, Laboratory for Vascular Translational Science, 75018 Paris, France

<sup>2</sup>UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris-Cité, 93017 Bobigny, France

Sources of support: Institut National de la Recherche Médicale, Ecole doctorale Galilée, Université Paris 13

*Article en préparation*

Corresponding author: RICHARD Benjamin

Inserm U1148 LVTS

Hôpital Xavier Bichat

46, rue Henri Huchard, 75018 Paris, France

Phone: +33 (1) 40 25 86 15

Email: benjamin.richard@univ-paris13.fr

## Abstract

During atherogenesis, some vascular smooth muscle cells (vSMCs) switch from a contractile phenotype to a proliferative phenotype, characterized by increased proliferation and migration, loss of contractile markers, and extracellular matrix production. Syndecan-1 is a heparan sulfate proteoglycan that has been shown to modulate vSMCs phenotype and affect the response to arterial injury, but its function in atherosclerosis is unknown. Here, we investigated syndecan-1 expression in human atheromatous tissue and its effect on vSMC phenotypic modulation.

We observed in human tissue samples that syndecan-1 expression is increased in vSMCs of early human atheromatous *versus* healthy aortas. Quantification of protein levels by ELISA showed a significant increase of syndecan-1 levels in both intima and media of fatty streaks and fibrolipidic lesions compared to healthy aorta. To determine the effect of syndecan-1 overexpression on human vSMCs phenotype, we constructed a lentiviral vector containing the coding sequence of human syndecan-1. Lentiviral transduction of cultured vSMCs induced a stable and robust overexpression of syndecan-1, confirmed at the mRNA and protein levels. Immunocytochemistry and flow cytometry experiments indicated an increase in syndecan-1 cell surface for about 80% of transduced cells. Flow cytometry experiments showed that in contrast to mouse hepatocytes, syndecan-1 is not a major receptor of low density lipoproteins (LDL) uptake by human vSMCs. Real time PCR was used to define the role of syndecan-1 on vSMC phenotypic modulation induced by transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1). We found that syndecan-1 amplifies the up-regulation of type I collagen, smooth muscle  $\alpha$ -actin, calponin and smoothelin expression induced by TGF- $\beta$ 1.

Altogether, these results show that syndecan-1 overexpression in early atheromatous aortas is mostly restricted to vSMCs. Our results further suggest that syndecan-1 amplifies TGF- $\beta$ 1 effect on the maintenance of vSMCs specific markers gene expression, while on the other hand promoting the increase of type I collagen expression in the early phase of the disease.

**List of abbreviations:**

CTGF: Connective Tissue Growth Factor

ECM: Extracellular Matrix

LDL: Low Density Lipoprotein

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

SM MHC: Smooth Muscle Myosin Heavy Chain

SM  $\alpha$ -actin: Smooth Muscle alpha-actin

vSMC: Vascular Smooth Muscle Cell

TGF- $\beta$ 1: Transforming Growth Factor-beta 1

TGFBR: Transforming Growth Factor-beta Receptor

Key words: atherosclerosis, vascular smooth muscle cell, syndecan-1

## INTRODUCTION

Atherogenesis involves a variety of cell types in the vessel wall, including endothelial cells, lymphocytes, monocytes, and vascular smooth muscle cells (vSMCs). While the role of endothelial and inflammatory cells in the early stages of atherogenesis has been largely documented, the implication of vSMCs was preferentially studied in advanced lesions, due to their role in fibrous cap formation as they migrate to the neointima and stabilize the plaque by secreting matrix proteins. However, early histological studies had shown that vSMCs are preponderant in regions prone to the development of atherosclerosis whereas few are present in resistant regions, and recent findings indicate that vSMCs are in fact involved in all steps of the disease [1][2][3].

Evidence indicates that intimal vSMCs differ from medial healthy vSMCs and have atherogenic properties that promote the initiation of plaques [4][5]. While medial vSMCs predominantly express proteins involved in the contractile function, intimal vSMCs express lower levels of differentiation markers such as smooth muscle alpha-actin (SM  $\alpha$ -actin), calponin, smooth muscle myosin heavy chain (SM MHC), and transgelin. This phenotypic switch is associated with the ability of vSMCs to perform a variety of functions. These de-differentiated vSMCs have higher proliferative and migratory levels, and a greater synthetic capacity for extracellular matrix (ECM), proteases, and cytokines. Furthermore, vSMCs can express receptors for lipid uptake, and transform, like macrophages, into foam cells which participate in the accumulation of lipid within the plaque [6]. Whereas all these functions contribute to atherogenesis, the contributions of the factors influencing vSMC pathological behavior are not fully understood.

It has been proposed that vSMCs are plastic cells that reversibly switch between the contractile (differentiated) non proliferative state and the synthetic (de-differentiated) proliferative phenotype in response to various atherogenic stimuli, local cytokines and growth factors, mechanical forces, reactive oxygen species, and lipids [5]. Among these factors, transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) is known to be a potent inducer of the differentiated phenotype by increasing vSMC contractile

markers and regulating cell proliferation and migration. These processes may also be modulated by components of the ECM, such as the proteoglycan perlecan [7]. While the role of ECM proteoglycans has been largely described in the context of atherosclerosis [8] [9] [10], little is known about transmembrane proteoglycans.

Recent observations identified syndecan-1 as a modulator of vSMC behavior in pathology. Syndecan-1 is a transmembrane heparan and chondroitin sulfate proteoglycan belonging to a family of four syndecans (syndecan-1 to -4). Syndecan-1 binds various ligands, like components of the ECM, cytokines and growth factors [11] and has critical roles during development, wound healing and pathogenic conditions, by controlling cell proliferation, differentiation, adhesion and migration [12]. Although our knowledge concerning its role in atherosclerosis remains limited, syndecan-1 has emerged as an important modulator of cellular processes in vascular biology [13]. Previous works have shown that syndecan-1 is overexpressed in rabbit neointima after vascular injury and limits vSMC proliferation [14]. In mice, syndecan-1 deficiency promotes vSMC proliferation in response to platelet derived growth factor (PDGF), thrombin and fibroblast growth factor-2 [7]. In addition, silencing syndecan-1 in cardiac fibroblasts inhibits TGF- $\beta$ 1 signaling [15]. More recently, Chaterji and colleagues observed that the loss of syndecan-1 in mice enhances basal vSMCs proliferation, while decreasing gene expression of differentiation markers [16], supporting the idea that syndecan-1 could prevent vSMCs dedifferentiation. Syndecan-1 has also the ability to bind lipoproteins and has been identified as a major receptor for their hepatic clearance in mice [17]. Altogether, these observations suggest that syndecan-1 could be an important modulator of vSMC functions during atherogenesis.

We therefore assessed whether syndecan-1 was regulated during the early stages of atherogenesis and whether it could modulate the behavior of vSMCs. Our study demonstrates that syndecan-1 is overexpressed in vSMCs of early human atheromatous aortas, in particular in fatty streaks, and in the fibrous cap of fibro-lipidic lesions. Lentiviral-mediated syndecan-1 overexpression in cultured human vSMCs suggested that vSMC syndecan-1 is not involved in low density lipoprotein (LDL) uptake, but

modulates type I collagen and vSMC differentiation markers expression in response to TGF- $\beta$ 1 stimulation.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Preparation of human tissue samples**

Normal aortas were obtained from organ transplant donors with the authorization of the French Biomedicine Agency (PFS09-007). Immediately after reception, the fresh aortic rings were opened longitudinally, their outer adventitia was partially removed to ease sectioning, and small tissue pieces were separately cut. Macroscopic characterization was performed to separate healthy areas, fatty streaks, and fibrolipidic lesions. Aortic tissue preparation consisted in an immediate dissection to separate intimal, medial, and adventitial layers followed by either direct freezing or enzymatic digestion for vSMCs primary cultures. To obtain sections for immunostaining, healthy and early atheromatous samples were fixed in 3.7 % paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned at 6  $\mu\text{m}$ .

### **Measurement of syndecan-1 and syndecan-4 levels in tissue samples**

Frozen tissues from healthy and early atheromatous aortas were pulverized using liquid nitrogen freezer mill (6870 SPEX Certiprep 6750). Protein extraction was performed by incubating powder in RIPA buffer (10 mg/500  $\mu\text{L}$ ) for 30 min at 4°C, and supernatant was collected after centrifugation at 13 000 g for 15 min. Titrations of syndecan-1 and syndecan-4 in human samples were determined by ELISA (SEB966Hu and SEB939Hu, Cloud-Clone) following the manufacturer's instructions. For RNA extraction, approximately 50-100 mg of crushed powder were homogenized in Trizol Reagent (Invitrogen). Total RNA was extracted and purified using RNeasy extraction kit (Qiagen), and 1  $\mu\text{g}$  was reverse transcribed with RT Maxima First Strand kit (K1642, Thermo Scientific). Real-time PCR was performed on complementary cDNA using a Light Cycler (Roche). Levels of mRNA were normalized to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (hPRT). Primers sequences were listed in table 1.

### **Measurement of syndecan-1 level in tissue conditioned media**

For preparation of conditioned media, intimal lesions and media from aortas were separated by dissection, cut into small pieces (5 mm<sup>3</sup>) and separately incubated in RPMI-1640 medium (Gibco Invitrogen, Paisley, UK) for 24 hours at 37°C (6 mL per g of wet tissue). The tissue conditioned media containing soluble factors were then collected and stored at -80°C until used. Syndecan-1 content was determined by ELISA (SEB966Hu, Cloud-Clone) following the manufacturer's instructions.

### **Immunostaining of human aortas**

Tissue sections were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min, and epitope retrieval was performed by heating sections in Target Retrieval Solution (Dako). When using 3,3'-diaminobenzidine (DAB), peroxidase activity was quenched with 3% hydrogen peroxide in water for 10 min. Sections were then incubated with biotin-blocking system (Dako), followed by Dako protein block solution. Immunostaining of syndecan-1, syndecan-4, and vSMCs, was performed using goat polyclonal antibody to syndecan-1 (AF2780, R&D Systems, 5 µg/mL) and syndecan-4 (AF2918, R&D Systems, 5 µg/mL), and mouse monoclonal antibodies to SM MHC (ABT293, Millipore, 5 µg/mL) and smooth muscle  $\alpha$ -actin (SM  $\alpha$ -actin ) (1A4, Dako, 2 µg/ml). All sections were incubated on night at 4°C with the primary antibody diluted in PBS, followed by the appropriate secondary antibodies. Negative controls were the corresponding isotypes. For immunofluorescence, sections were incubated with biotinylated anti-goat antibody (Santa Cruz, 4 µg/ml), and rabbit anti-mouse alexa fluor (Molecular probe) for 1 hour at room temperature. The amplification reaction was detected using streptavidin alexa fluor conjugate (Molecular Probes, 2 µg/ml) for 30 min. Nuclei were stained by DAPI. Slides were then mounted with fluorescence mounting medium (Dako) for microscopy. The resulting fluorescence was observed with a Zeiss Axiovert microscope. For immunohistochemistry, sections were revealed with biotinylated secondary antibody, followed by DAB staining (Dako). Nuclei were stained by Mayer's hematoxylin. Slides were dehydrated and mounted with Eukitt mounting medium.

### **Primary culture of human aortic vSMCs**

Medial samples of normal aortas were incubated in collagenase 0.1% and elastase 0.1% solution (3 hours, 37°C) to obtain primary cultures of human aortic vSMCs. vSMCs were routinely cultured in SMC medium (Promocell) containing 5% fetal calf serum, primocin (100 µg/mL), plasmocin (5 µg/mL), insulin (5 mg/mL), and growth factors (human epidermal and fibroblast growth factors, 0.5 and 2 µg/mL, respectively). For all experiments, vSMCs were cultured on fibronectin (50 µg/mL), and grown to confluence. Passages 3 to 5 were used.

### **Lentiviruses production**

Parental plasmid containing syndecan-1 coding sequence (Origen) was amplified by PCR (Taq High fidelity, Invitrogen) and ligated into the pTRIP lentiviral (gift from Pierre Charneau). HEK 293T cells were maintained in Dulbecco modified Eagle's medium, high glucose (Life Technologies) supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin, streptomycin and ampicillin. Stocks of pTRIP infectious particles were prepared in HEK 293T cells by co-transfection using calcium phosphate. Transfected vectors were the corresponding expressing vector, a packaging plasmid 8.71, and a vesicular stomatitis virus G protein (VSVG) envelope plasmid. Two days after transfection, the cell supernatant containing recombinant lentiviral vectors was harvested and concentrated by ultracentrifugation. The amount of lentiviral particles was evaluated by measuring HIV-1 Gag p24 with an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay, and by their ability to induce a 10- to 20-fold syndecan-1 mRNA overexpression in vSMCs. Aliquots of vector stocks were stored at -80°C until use.

### **vSMC transduction and treatment with TGF-β1**

For vSMC transduction, a mix of lentiviruses diluted in complete cell medium with polybren (8 µg/mL) was added to the cells. After 24 hours, the mix was replaced by fresh complete medium. Experiments were performed 48 hours after initial transduction. Syndecan-1 overexpression was

confirmed by RT-PCR, immunoblot, and flow cytometry (see below). After 4 hours of serum deprivation, vSMCs were treated with TGF- $\beta$ 1 (C8667, Sigma, 30  $\mu$ g/mL) diluted in serum-free medium.

### **Characterization of transduced-vSMCs**

*Western blot.* Protein were extracted by cell lysis in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40) containing a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich), followed by centrifugation at 5000 g for 5 min at 4°C. Concentrations were measured using a BCA Pierce Protein assay (Interchim). Proteins were separated by electrophoresis on 4-15 % Mini-Protean Precast gel (Biorad), and immunoblots were performed using the goat polyclonal anti-syndecan-1 antibody (AF 2780, R&D) followed by horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) at a 1:50000 dilution. Immunoreactivity was visualized by chemiluminescence (ECL, Amersham).

*Flow cytometry analysis.* Cells grown on 6-wells plate were detached by EDTA 0.5 mM for 5 min and resuspended in PBS. Cells were then incubated with the anti-syndecan-1 antibody (R&D, 5  $\mu$ g/mL) for 30 min, followed by rabbit anti-goat Alexa Fluor 488 (Thermofischer, 4 $\mu$ g/mL) for 20 min at room temperature, and analyzed on a LSRII flow cytometer (BD Biosciences). Photomultipliers for FSC, SSC and fluorescent canals were adjusted on unstained cells. Data were analyzed on DIVA software (BD Biosciences).

*Immunocytofluorescence.* Cells were fixed with 4% formaldehyde in PBS for 20 min and permeabilized or not in 0.1% Triton X-100 for 5 min. Non-specific binding was blocked by incubation with 3 % Bovine Serum Albumine (BSA) for 1 hour. Immunostaining was performed using anti-syndecan-1 antibody (R&D, 5  $\mu$ g/ml), followed by rabbit anti-goat Alexa Fluor 555 secondary antibody (Thermo Fischer, 4  $\mu$ g/mL). Nuclei were stained by DAPI.

Analysis of gene expression was performed 24 hours after transduction by RT-PCR (see below).

### **LDL isolation and incubation with vSMC**

LDL were isolated from a pool of plasma from healthy volunteers. Plasma was adjusted to a density of 1.22 by adding solid KBr. The solution was then distributed into centrifuge tubes (Beckman) and a density gradient was made by adding KBr solution with a density of 1.063. The tubes were ultracentrifuged in a Beckman ultracentrifuge (CTZ08B02) equipped with a MLA-55 rotor, at 120000 g for 5 hours at 10°C. The yellow upper fraction containing LDL, VLDL and chylomicrons was collected and adjusted to a density of 1.25. To isolate LDL, a density gradient was made by adding KBr solution with a density of 1.006, followed by an ultracentrifugation as above. The intermediate fraction containing LDL was collected and concentrated in a 10 kDa centricon (Millipore), by centrifugation at 1000 g for 30 min. Thereafter, the LDL solution was dialyzed in a solution of PBS and EDTA 1 mM using membrane dialysis (Spectrumlabs). Protein concentration was determined by the method of Lowry and al. [18].

The isolated LDL (1 mg/ml) were variably oxidized, either by irradiation with 254 nm ultraviolet light for 2 hours, or by incubation in PBS containing 5 µM copper sulfate at 37°C for 4 hours terminated by the addition of EDTA 100 µM. OxLDL preparations were dialyzed extensively at 4°C against PBS containing 0.5 mM EDTA. The extent of oxidation was determined by measuring the amount of thiobarbituric acid-reactive species (TBARS), using malondialdehyde (MDA) standard.

For LDL staining, LDL were incubated overnight at 37°C with 10 µg/mL of the fluorescent probe Dil (Molecular Probes). vSMCs were starved during 4 hours and then incubated with increasing concentrations of labeled LDL diluted in serum-free medium (0, 50, 100 µg/ml) for 1 hour. Unbound LDL were removed by 3 washes in PBS, LDL internalization by syndecan-1 transduced cells was analyzed by immunofluorescence and flow cytometry, as described previously.

### **Analysis of gene expression by RT-PCR**

vSMCs seeded in 6-wells plates were homogenized in Trizol Reagent (Invitrogen). Total RNA was extracted and purified using Trizol reagent (Invitrogen), and RT-PCR was performed as above.

**Table 1**

	<b>Forward Primer Sequence (5'-3')</b>	<b>Reverse Primer Sequence (5'-3')</b>
<b>HPRT1</b>	AGTTGAGAGATCATCTCCAC	TTGCTGACCTGCTGGATTAC
<b>Syndecan-1</b>	TGTACCGCATGAAGAAGAAGG	GTTTGGTGGGCTTCTGGTAG
<b>Syndecan-4</b>	GGCAGGAATCTGATGACTTTG	GCCGATCATGGAGTCTTCC
<b>Collagen I</b>	GGGATTCCCTGGACCTAAAG	GGAACACCTCGCTCTCCA
<b>SM-actin</b>	AGACTTCCGCTTCAATTC	CTGTTAGGACCTTCCCTC
<b>Calponin</b>	AACCCAAAATTGGCACCAG	TGGCCTCAAAAATGTCGTG
<b>Smoothelin</b>	TGAGGAGCTGATGACTATT	CTGATCCAGCATCTTGTC
<b>Transgelin</b>	GTCCGAACCCAGACACAAGT	AATGCACTCACAAGGCTTCC
<b>TGFBR1</b>	GCAGACTTAGGACTGGCAGTAAG	AGAACTTCAGGGGCCATGT
<b>TGFBR2</b>	ATGAGGAAAGAGGCTCCATGT	TGCAAAAGCAAGTGCAATGT

### **Statistical analysis**

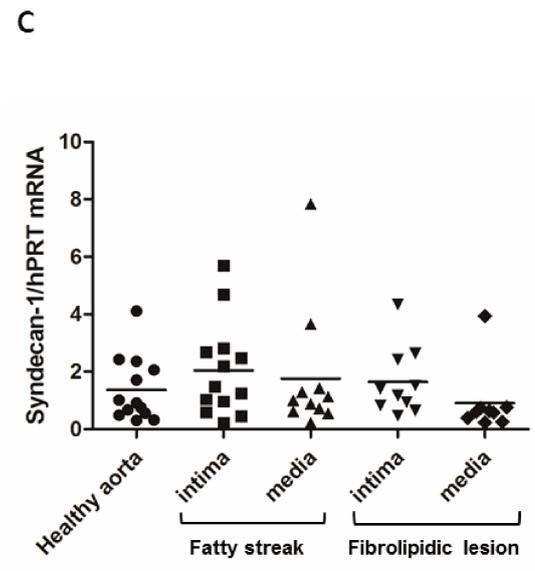
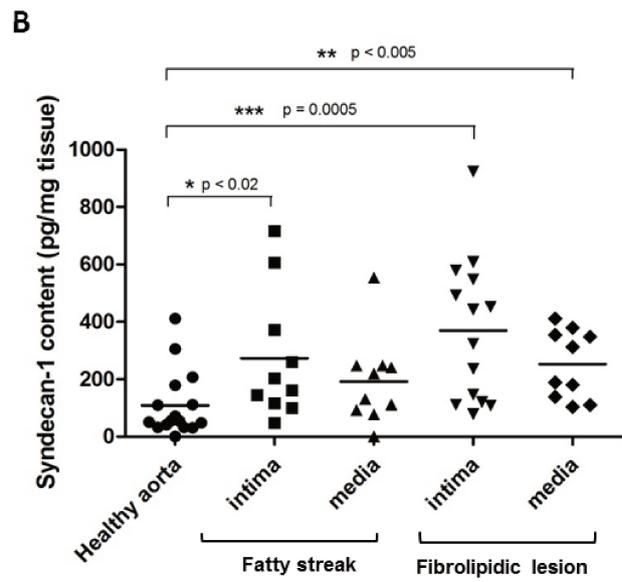
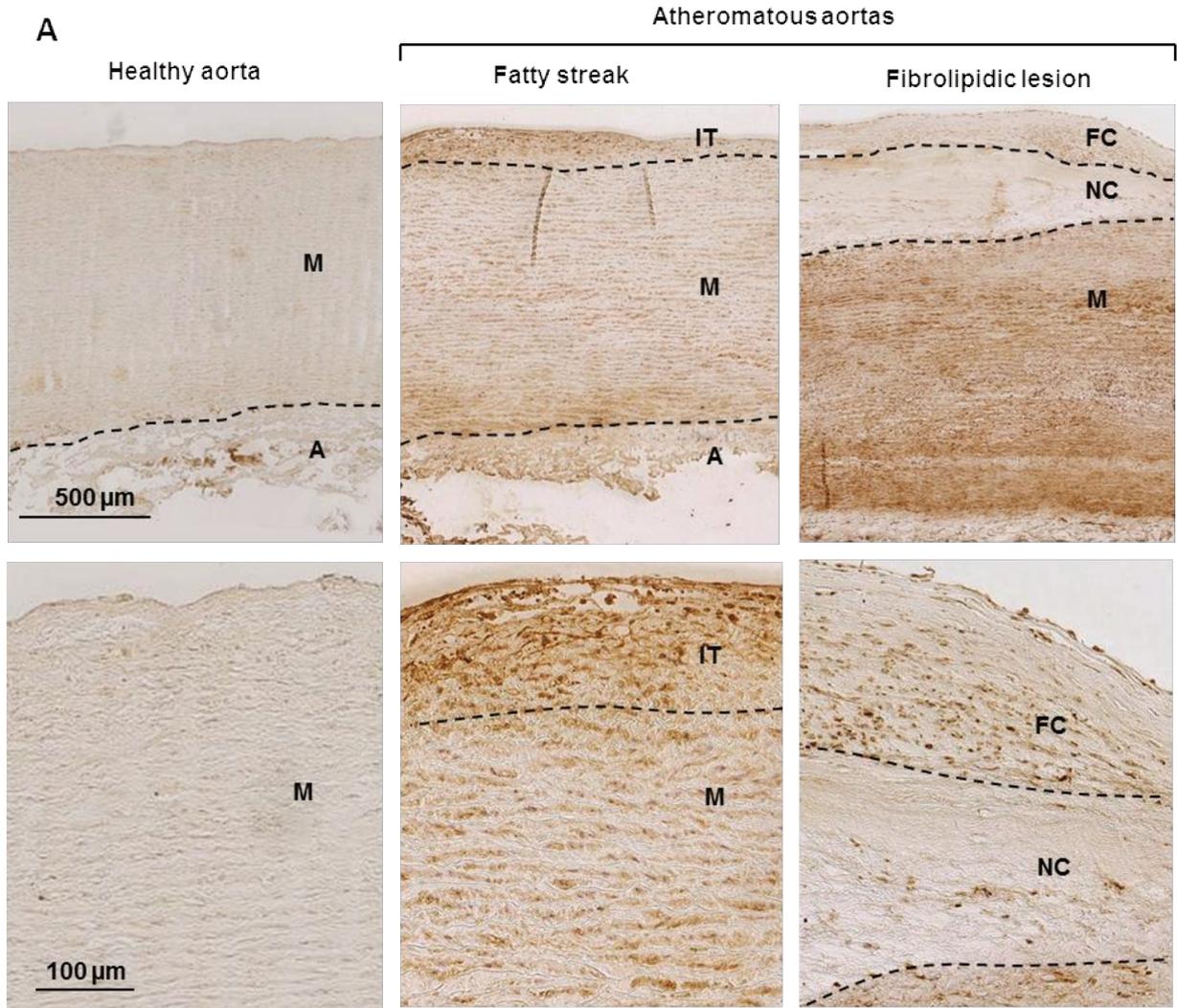
Statistical analyses were calculated using the Prism Software. Values are expressed by mean  $\pm$  SEM and statistical differences were determined using the Mann-Whitney test and the Student's t-test. A value of  $p < 0.05$  was considered significant.

## RESULTS

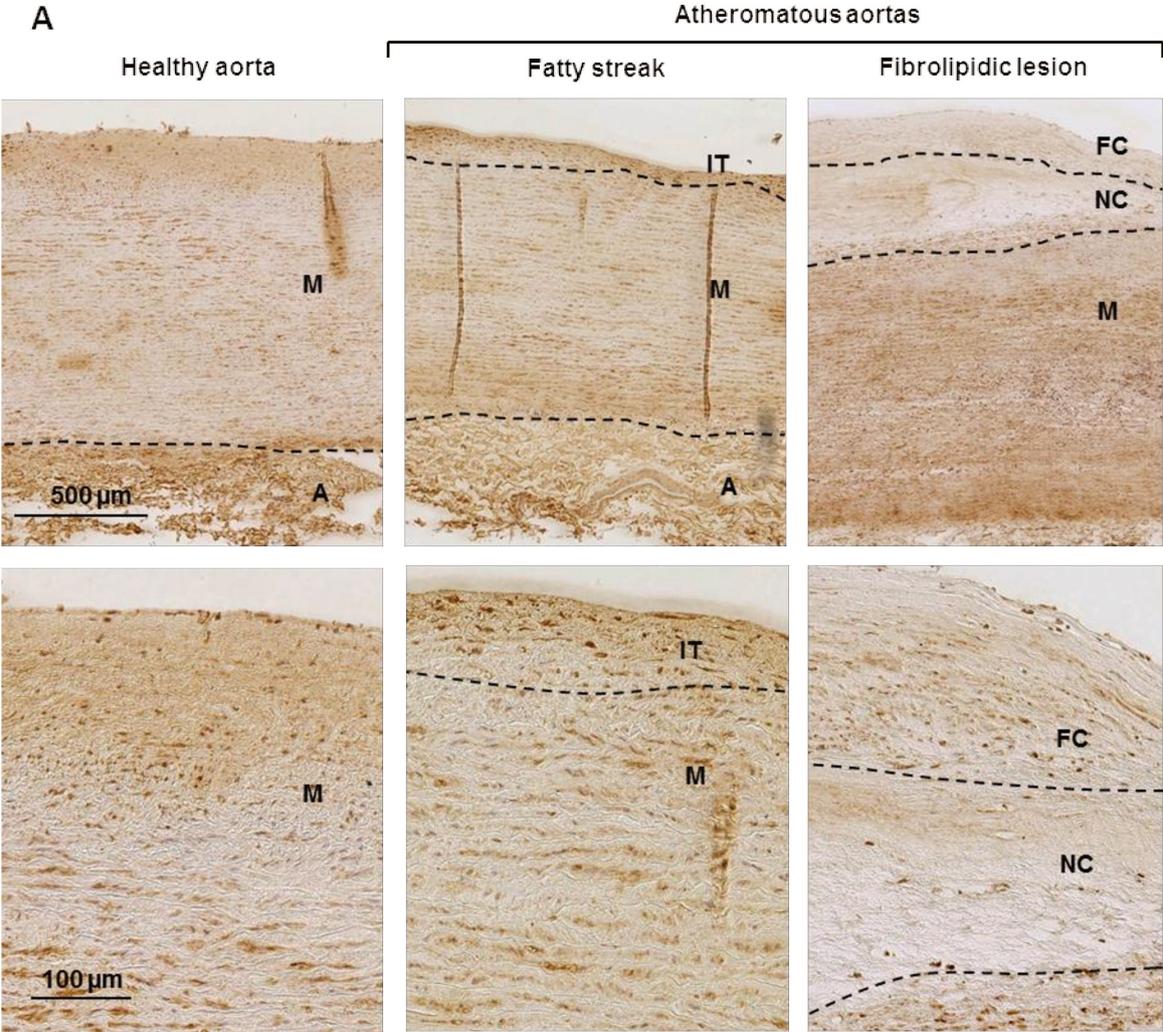
### **Syndecan-1 protein is increased in early human atheromatous aortas**

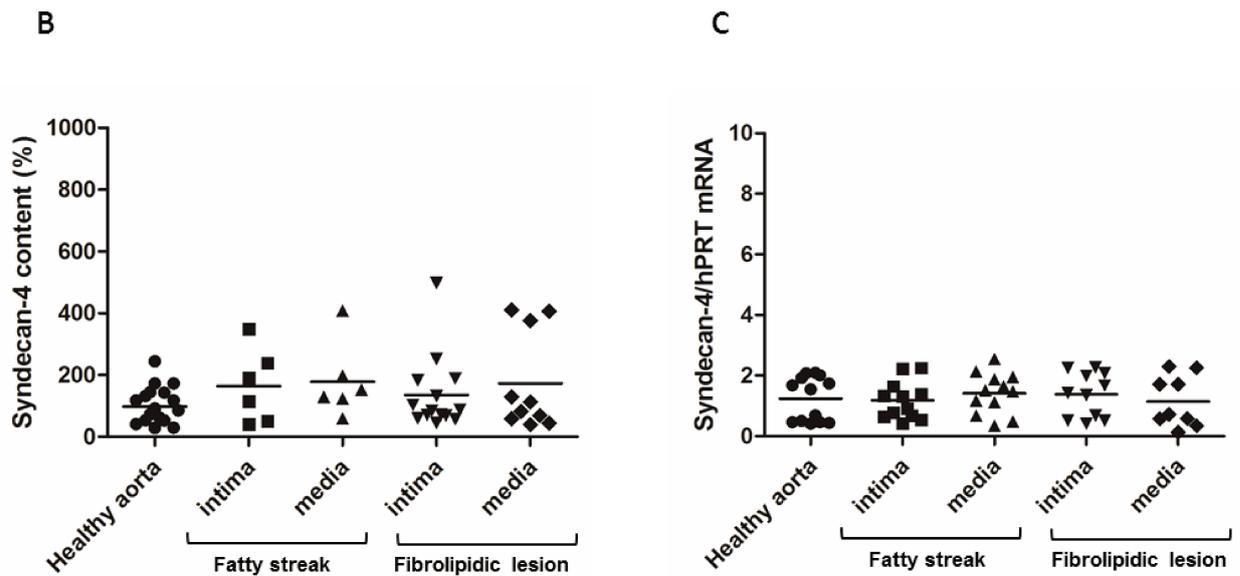
To study syndecan-1 expression in the initial steps of atherosclerosis, human aortic segments with early atheromatous lesions were analyzed by immunohistochemistry. Aortic samples devoid of microscopic signs of lesions were classified as healthy. While fatty streaks were characterized by intimal thickening, more advanced fibro-lipidic lesions displayed a large necrotic core associated with a fibrous cap. Staining of healthy aortas revealed a weak signal of syndecan-1 within the healthy aortic wall. In fatty streaks, syndecan-1 signal was increased both within the intimal thickening (IT) and the media (M). An increase of syndecan-1 was also detected in both the media and the fibrous cap (FC) of fibro-lipidic lesions, as well as some cells located within the necrotic core (NC) (Figure 1A). Supporting the immunohistochemical staining, analysis of syndecan-1 protein content by ELISA confirmed an increase in both intimal (2.5 fold) and medial (1.5 fold) layers of fatty streaks, and in intimal (3.5 fold) and medial (2.5 fold) layers of fibro-lipidic lesions, compared with healthy tissue (Figure 1C). However, no difference in syndecan-1 mRNA expression was observed between the samples (Figure 1B). We assessed whether these regulations were specific to syndecan-1 by measuring syndecan-4 levels in human tissue. In comparison, analysis of syndecan-4 protein and mRNA respectively by immunohistochemistry, ELISA, and RT-PCR, showed no significant differences between healthy and atherosclerotic samples (Figure 2A, B and C). These results indicated that syndecan-1 is specifically increased at the protein level during the first steps of atherogenesis.

In order to estimate the level of shedding in our samples, syndecan-1 ectodomain concentration was measured by ELISA in tissue conditioned media. Release of syndecan-1 ectodomain was not significantly different in healthy and atheromatous conditioned media (Supplemental Figure 1).



**Figure 1. Syndecan-1 expression in atheromatous aortas. (A)** Immunohistochemistry of human healthy and early atheromatous aortas. Syndecan-1 (brown) is located in intimal thickening of fatty streak, and in fibrous cap of fibrolipidic lesions. A total of 9 healthy aortas, 10 fatty streaks, and 8 fibrolipidic lesions, each from a different patient, were stained. M: Media; A: adventice; IT: Intimal Thickening; FC: Fibrous Cap; NC: Necrotic Core. **(B)** Correspondingly, syndecan-1 protein content per mg tissue is increased in intimal (x2.5) and medial (x1.5) layers of fatty streaks, and in intimal (x3.5) and medial (x2.5) layers of fibrolipidic lesions, compared to healthy aorta by ELISA. **(C)** Real time PCR analyses of syndecan-1 indicated no significant difference between healthy and atheromatous aortas.

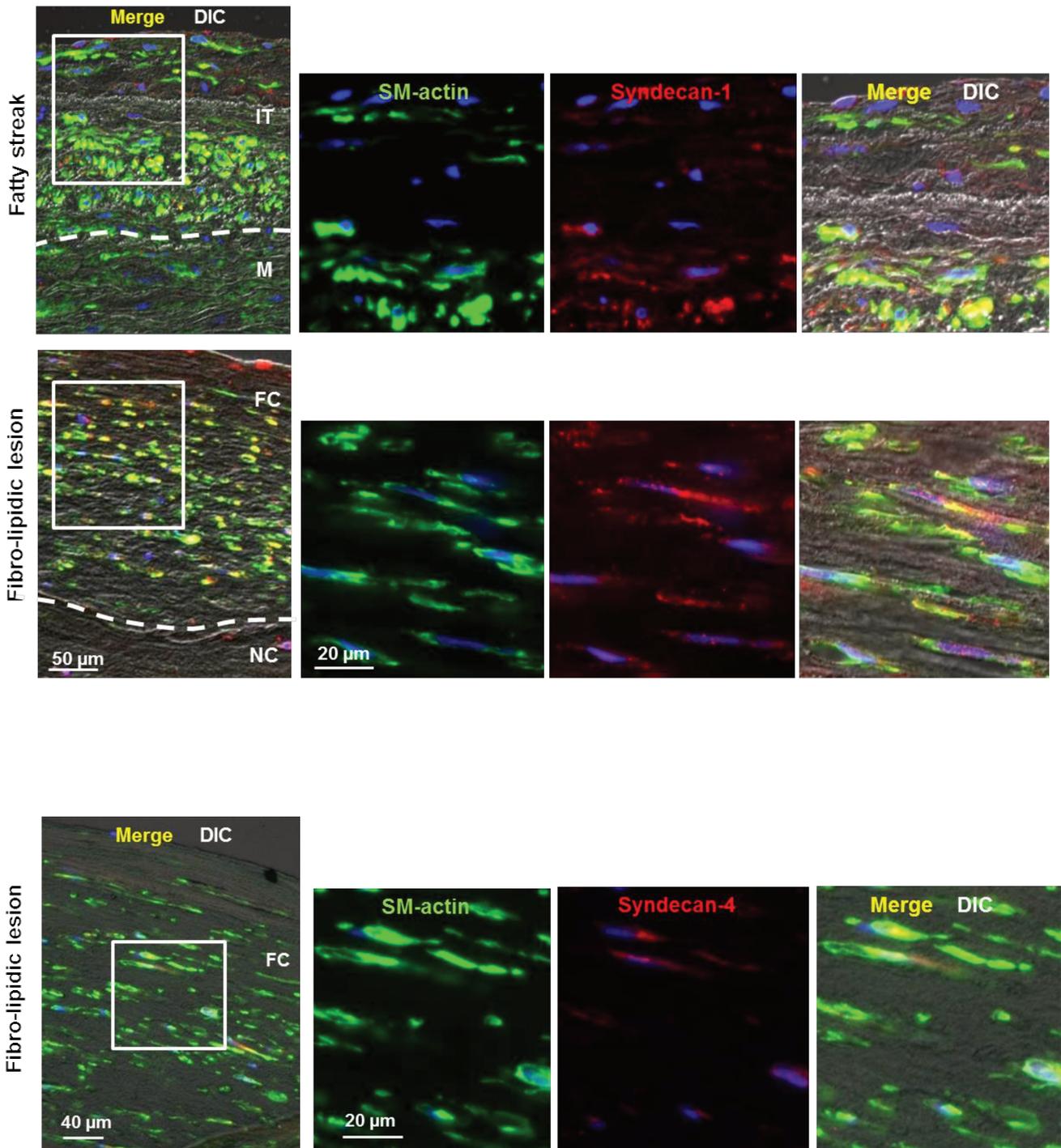




**Figure 2. Syndecan-4 expression in atheromatous aortas.** **A**, Immunohistochemistry of human healthy and early atheromatous aortas. Syndecan-4 staining (brown) is located within the different layers of healthy and pathological aortas. A total of 5 healthy aortas, 4 fatty streaks, and 4 fibrolipidic lesions, each from a different patient, were stained. M: Media; A: adventice; IT: Intimal Thickening; FC: Fibrous Cap; NC: Necrotic Core. **(B)** ELISA titrations and **(C)** real time PCR indicated no significant difference of syndecan-4 expression in human tissue samples.

### Syndecan-1 co-localizes with vSMCs in intimal lesion and fibrous cap of early atheromatous lesions

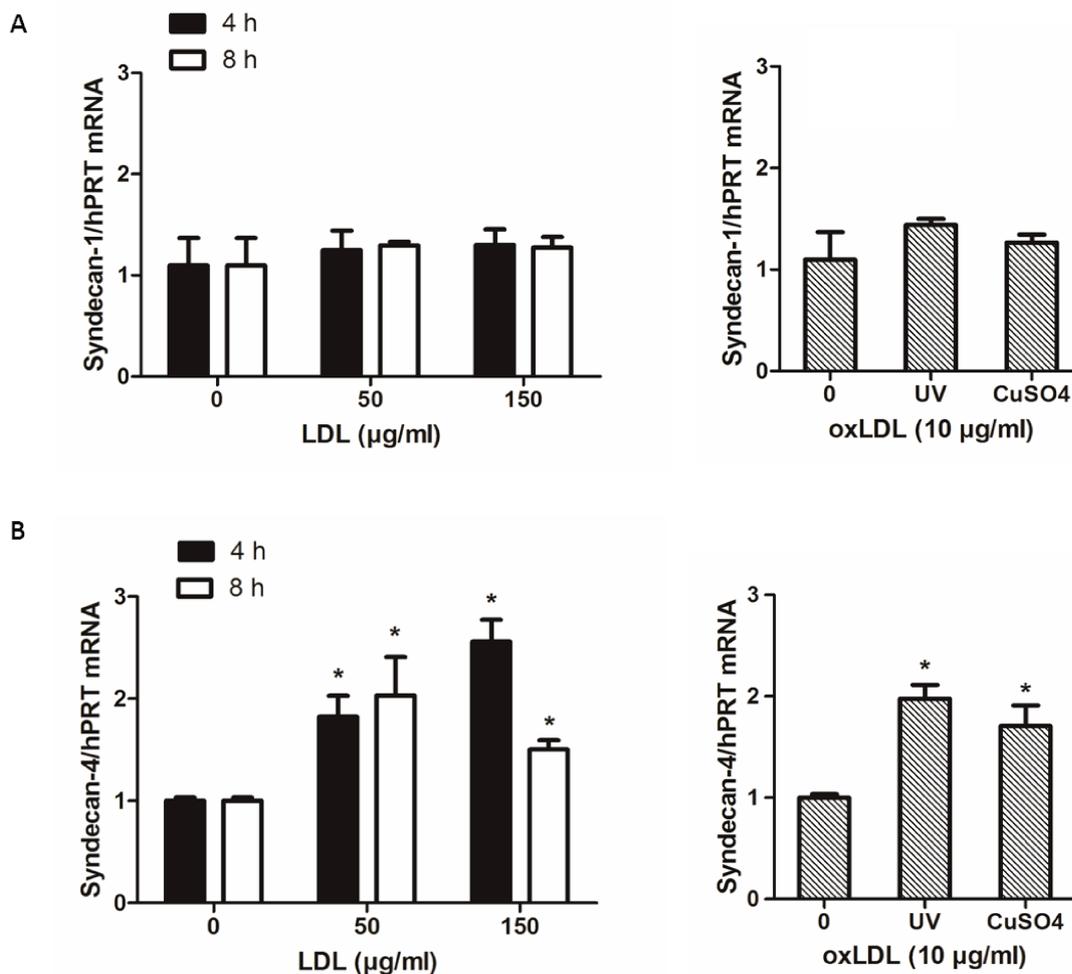
In order to identify syndecan-1-overexpressing cells in early atheromatous tissue, immunofluorescence staining was performed on aortic sections. Cells positive for both SM  $\alpha$ -actin and syndecan-1 were largely found in intimal lesions of fatty streaks and in fibrous cap of fibro-lipidic lesions (Figure 3A). While some cells presented a spindle-shaped form characteristic of differentiated vSMCs, some others were rhomboid and exhibited a typical morphology of de-differentiated cells. Similar results were obtained with SM MHC (Supplemental Figure 2) and syndecan-4 expressing cells were also found to be SM  $\alpha$ -actin positive (Figure 3B). These observations identify vSMCs as syndecan-1-overexpressing cells in early atheromatous lesions.



**Figure 3. Syndecan-1 co-localizes with vSMC SM  $\alpha$ -actin in atherosclerotic aortas. (A)** Fluorescence immunohistochemistry of early atherosclerotic aortas revealing a co-localization of syndecan-1 (red) and SM  $\alpha$ -actin (green) in intimal thickening of fatty streaks (n=4), and in fibrous cap of fibro-lipidic lesions (n=4). **(B)** Syndecan-4 staining (red) showed few cells co-localizing with SM  $\alpha$ -actin in fibro-lipidic lesion (n=3). Nuclei are stained with DAPI (blue). DIC: Differential Interference Contrast.

### LDL has no effect on syndecan-1 mRNA expression in cultured vSMCs

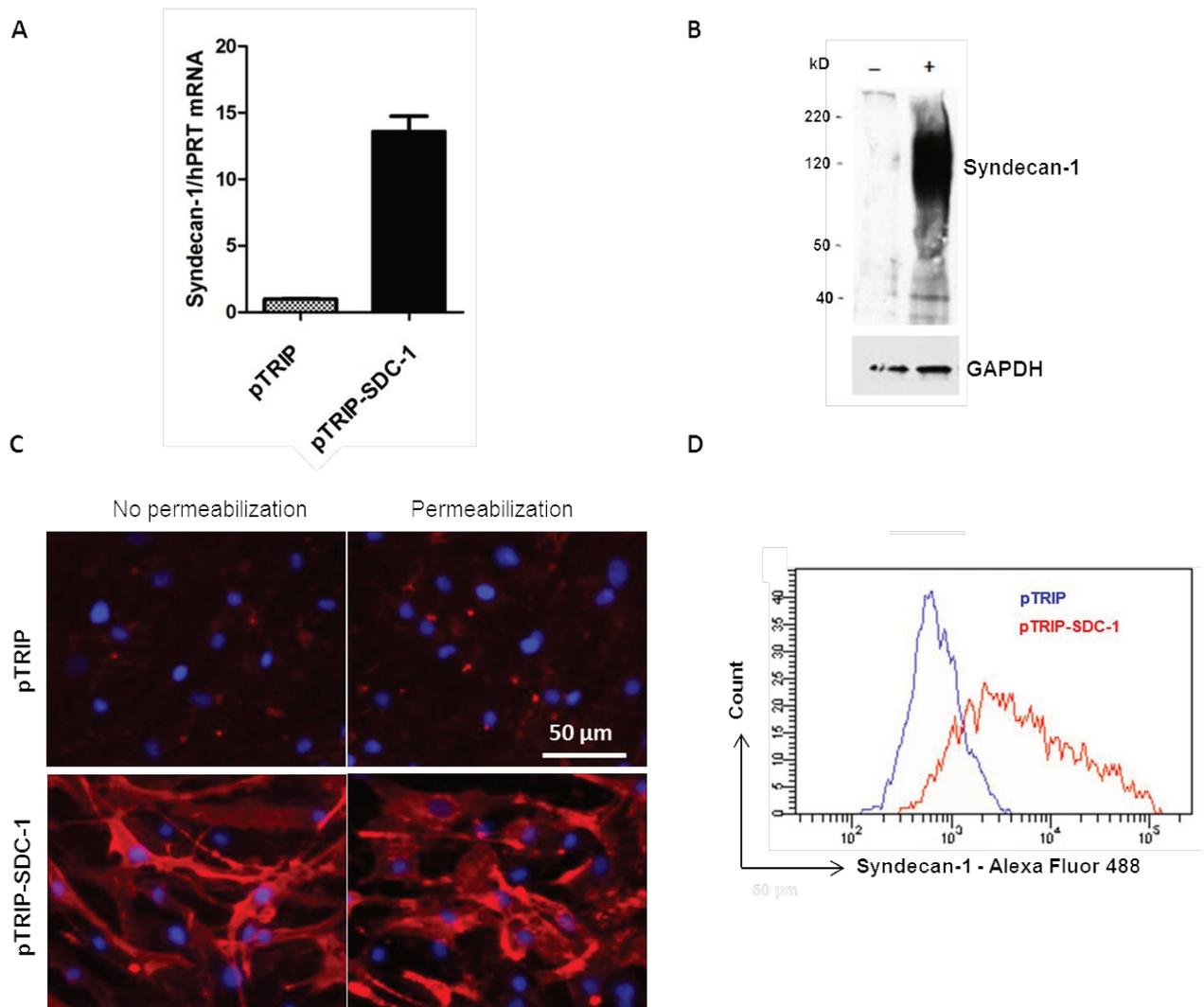
Native and oxidized LDL are known to be present in the environment of early lesions and to play a crucial role in the initiation and progression of atherogenesis. We assessed whether in pro-atherogenic condition, syndecan-1 expression could be increased by LDL in cultured primary human vSMCs. Treatment of vSMCs with native or oxidized LDL did not modify syndecan-1 mRNA expression (Figure 4A). In contrast, a significant increase in syndecan-4 mRNA expression was found after 4 and 8 hours stimulation in the presence of 50 and 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  native LDL (Figure 4B, left) and in the presence of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oxidized LDL (figure 4B, right). These results agree with Houston et al who showed that oxidized linoleic acid, the major oxidizable fatty acid in LDL, raised the expression of syndecan-4 in rat aortic SMCs [19].



**Figure 4. Syndecan-1 and syndecan-4 expressions are differently regulated by native and oxidized LDL in cultured vSMCs. (A)** Stimulation of vSMCs with native (0, 50, 150 µg/ml for 4 or 8 hours) and UV- or CuSO<sub>4</sub>-oxidized (10 µg/ml for 2h30 and 4 hours, respectively) LDL did not affect syndecan-1 mRNA expression. **(B)** Syndecan-4 mRNA expression was significantly increased in vSMCs after native LDL or UV- and CuSO<sub>4</sub>-oxidized LDL stimulation. \*statistically significant difference with untreated SMCs (p<0.05). (n=3)

#### **Lentiviral transduction induces an efficient syndecan-1 over-expression in cultured vSMCs**

To investigate the role of syndecan-1 in vSMCs, we developed an overexpressing approach based on lentiviral transduction. Cultured human primary vSMCs were either transduced with a lentivirus containing the syndecan-1 coding sequence (pTRIP-SDC-1), or the corresponding empty vector as control (pTRIP). Transduction of vSMCs with pTRIP-SDC-1 resulted in a significant overexpression of transcripts and core proteins (Figure 5). RT-PCR analysis revealed a 14-fold increase in syndecan-1 mRNA transcript in transduced cells, compared with control (Figure 5A). Overexpressed syndecan-1 proteins contained glycosaminoglycan chains, as evidenced by the high molecular weight smear observed by immunoblotting (Figure 5B) where the molecular weight of syndecan-1 protein associated with glycosaminoglycans was around 120 kDa, as expected. Immunofluorescence experiments showed that nearly 80 % of pTRIP-SDC-1-transduced vSMCs exhibited a strong staining of syndecan-1, which seemed located both at the plasma membrane and within the cytoplasm (Figure 5C). Syndecan-1 overexpression at the cell surface was confirmed by flow cytometry (Figure 5D). To assess potential compensatory mechanisms in the cells due to syndecan-1 overexpression, RT-PCR was also performed for syndecan-4. No difference in syndecan-4 mRNA level was observed after pTRIP-SDC-1 transduction of vSMCs (Supplemental Figure 3).



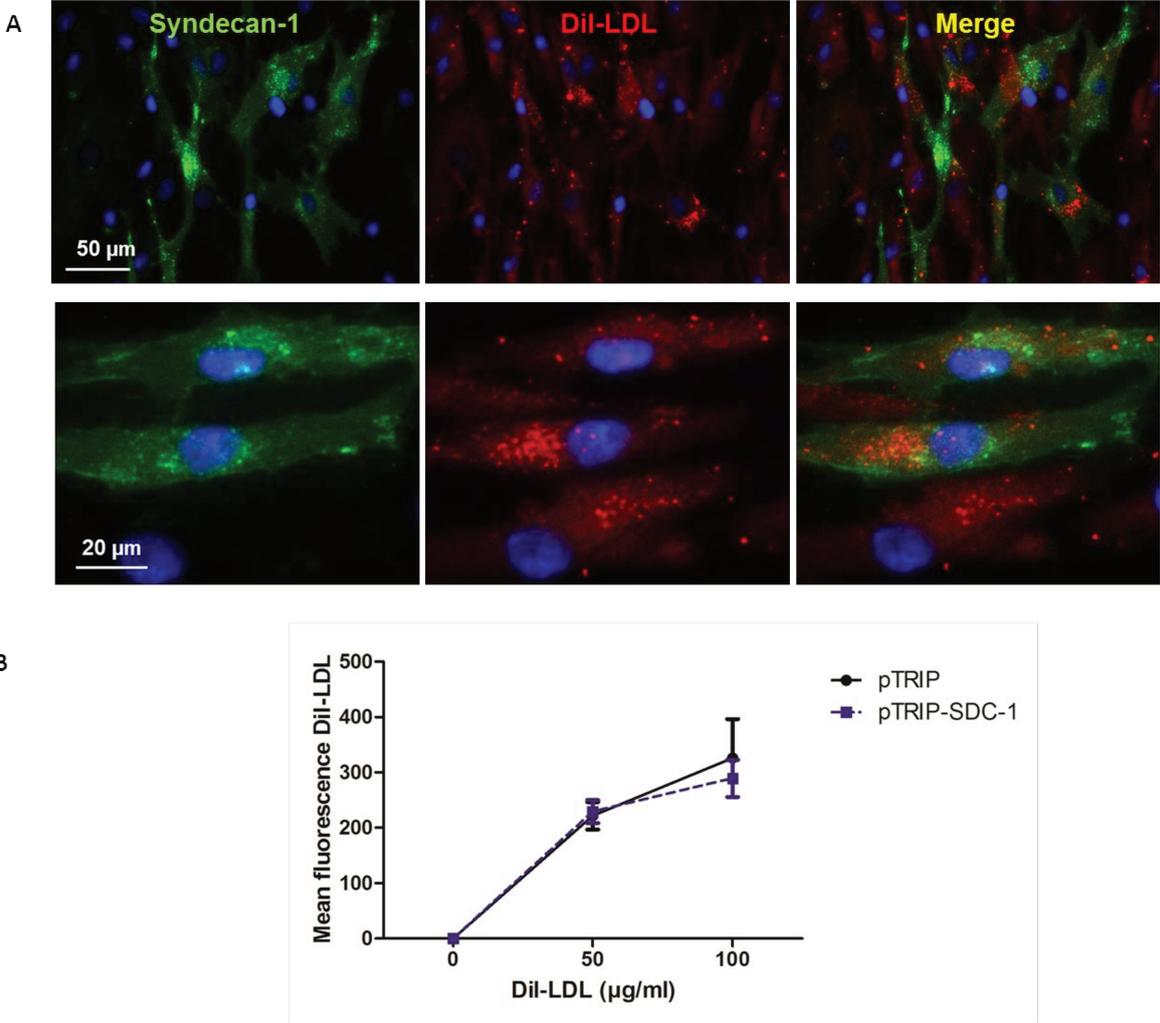
**Figure 5. Overexpression of syndecan-1 after lentiviral transduction of human primary vSMCs.**

**(A)** Transduction of vSMCs with pTRIP–SDC-1 leads to a 14 fold-overexpression of mRNA expression, compared with empty pTRIP vector. **(B)** Immunoblotting of syndecan-1-transduced vSMCs revealed a smear (100-220 kD) corresponding to syndecan-1 with glycosaminoglycan chains. **(C)** Fluorescence immunocytochemistry showed that syndecan-1 (red) is overexpressed and located at the plasma membrane and in intracellular vesicles of pTRIP-SDC-1-transduced vSMCs. **(D)** FACS analysis showed an increase in membrane syndecan-1 expression in vSMCs after lentiviral transduction.

### Syndecan-1 effect on LDL internalization by vSMC

Given the crucial role of syndecan-1 in hepatic lipoprotein clearance in mice [17], we analyzed the effect of syndecan-1 overexpression on LDL uptake by vSMCs. pTRIP- or pTRIP- SDC-1- transduced

vSMCs internalized Dil-LDL in a dose dependent manner as measured by flow cytometry (Figure 6B). Immunofluorescent staining of syndecan-1 showed no co-localization between syndecan-1 and Dil-LDL and no difference of Dil-LDL uptake could be observed upon syndecan-1 overexpression (Figure 6A). Flow cytometry analysis did not reveal any difference of Dil-LDL uptake between control and SDC-1-overexpressing cells (Figure 6B). These results indicated that in contrast to murine hepatocytes, syndecan-1 is not a major receptor of LDL in vSMCs.

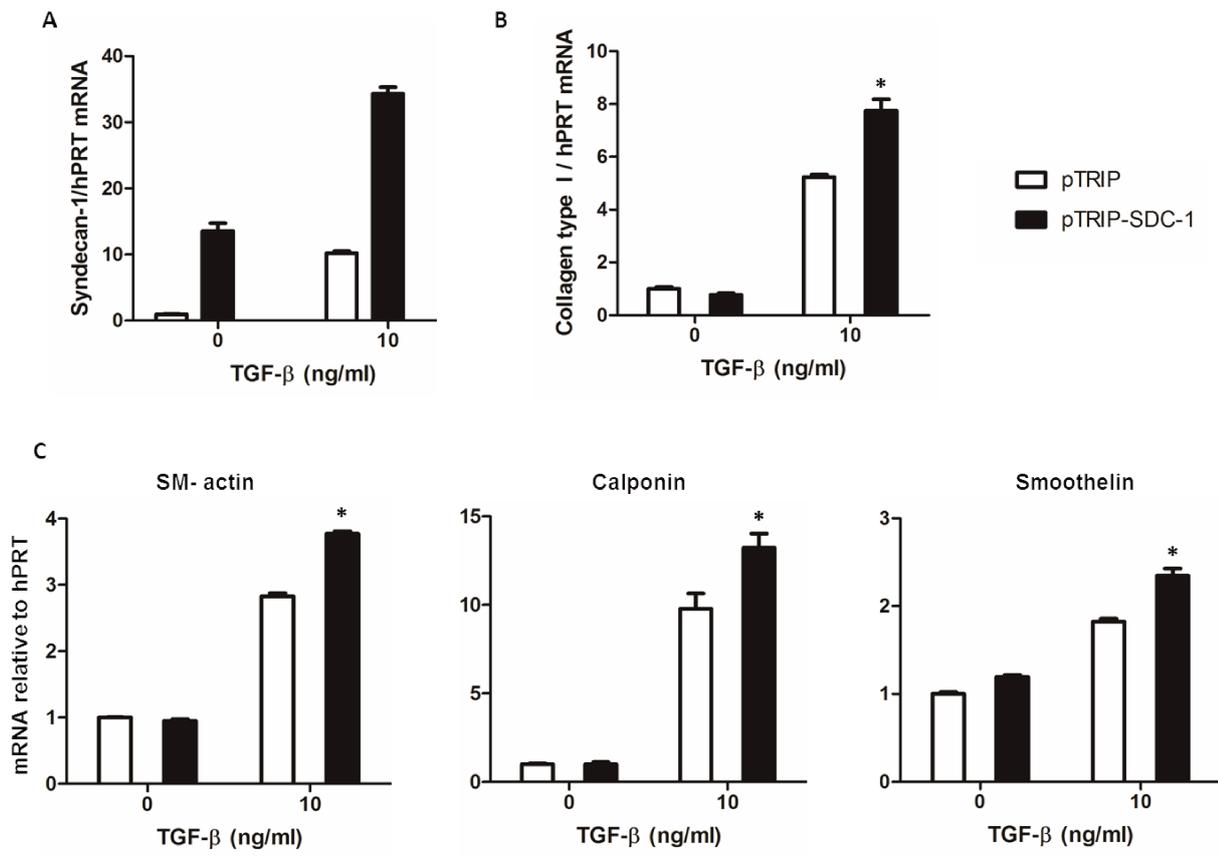


**Figure 6. Internalization of Dil-LDL by pTRIP and pTRIP-SDC-1-transduced vSMCs.** pTRIP-SDC-1-transduced vSMCs were treated with 50 or 100 µg/mL Dil-LDL for 1 hour and stained with an anti-syndecan-1 antibody. **(A)** No-colocalization between Dil-LDL (red) and syndecan-1 (green) fluorescence could be observed. Images are

representatives of 3 experiments, each with different concentrations of LDL (50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). **(B)** Flow cytometry experiments showed a dose dependent uptake of Dil-LDL by cultured vSMCs, which was not significantly different between pTRIP and pTRIP-SDC-1 transduced cells. (n=3)

### **Syndecan-1 regulates type I collagen and vSMC markers expression induced by TGF- $\beta$ 1**

TGF- $\beta$ 1 is synthesized by several cardiovascular cell types involved in atherogenesis including endothelial cells, monocytes/macrophages and T cells [20] and is thought to exert anti-atherogenic actions. TGF- $\beta$ 1 is known to drive vSMC differentiation by promoting contractile specific markers expression and concomitantly to enhance type I collagen synthesis. Previous studies reported that loss of syndecan-1 altered vSMC phenotype in mice and increased tissue factor expression [126] [125]. In contrast, transduction of vSMCs with pTRIP-SDC-1 did not modify the expression of vSMC markers (Figure 7) and tissue factor (Supplemental Figure). Treatment of control cells with 10 ng/mL TGF- $\beta$ 1 for 24 hours resulted in a significant increase in SM  $\alpha$ -actin (x2.8), calponin (x9.8), smoothelin (x1.8), and type I collagen (x5.2) mRNA (Figure 7 A, B and C). Transduced vSMCs presented a 14-fold increase of syndecan-1 expression. As previously reported [130], TGF- $\beta$ 1 treatment induced a 10-fold overexpression of syndecan-1. A combination of lentiviral transduction and TGF- $\beta$ 1 resulted in a 32-fold increase for 10 ng/ml of TGF- $\beta$ 1, corresponding to both endogenous and lentiviral syndecan-1 transcripts (Figure 6A). Syndecan-1 overexpression raised significantly the response of vSMCs towards TGF- $\beta$ 1, therefore amplifying the up-regulation of SM  $\alpha$ -actin, calponin, smoothelin, and type I collagen, induced by 10 ng/ml of TGF- $\beta$ 1 (Figure 7 A, B and C). These observations were not due to a difference in TGF- $\beta$  receptors types I (TGFBR1) and II (TGFBR2) expression by transduced cells (Supplemental Figure 4).



**Figure 7. Syndecan-1 amplifies type I collagen and vSMC contractile markers expression induced by TGF-β1.** pTRIP or pTRIP-SDC-1-transduced SMCs were treated with 10 ng/ml TGF-β1 for 24 hours and genes expressions were analyzed by RT-PCR. **(A)** Syndecan-1 expression was up-regulated after pTRIP-SDC-1 transduction and/or TGF-β1 treatment. **(B)** Type I collagen and **(C)** SM- α-actin, calponin, and smoothelin expressions were up-regulated by TGF-β1 and further increased in pTRIP-SDC-1-transduced cells. \* $p < 0.05$ , significant difference compared with pTRIP-transduced with 10 ng/mL TGF-β1. Data are representative of 2 independent experiments done in triplicate.

## DISCUSSION

Syndecan-1 is an important modulator of events related to cell migration and proliferation, growth factor signaling, and matrix remodeling. Its expression is tightly regulated in tissues in various pathological processes including vascular diseases [23][21]. However, the expression and role of syndecan-1 in atherosclerosis remains an open study field. We therefore characterized syndecan-1 expression during the early stages of human atheroma formation, and investigated its role on vSMC phenotypic transition. Our results show that syndecan-1, in contrast to syndecan-4, is overexpressed by vSMCs of intimal fatty streaks and fibrolipidic lesions, compared with healthy aortas.

During the initial stages of atherosclerosis, vSMCs undergo a phenotypic switch, characterized by the migration from the media to the intima, and the loss of contractile function associated with the transition to a synthetic phenotype [24]. During this process, vSMC identification is difficult as they lose specific markers of contractile function and exhibit many other genes relative to phagocytic function or synthetic activity. In early atheromatous aortas, we identified cells located in intimal lesions as vSMCs as they express SM  $\alpha$ -actin and myosin. Myosin, in particular, is considered by many studies as the most discriminating marker for the vSMCs, and its expression seems to be highly restricted to these cells [25]. In contrast, whereas SM  $\alpha$ -actin is an excellent differentiation marker, it is known to be expressed in a wide variety of non-vSMC cell types under certain circumstances [26]. As the vSMCs found in intimal lesions still express contractile markers, we assume that they maintained some characteristics of differentiated cells and are not fully de-differentiated. These vSMCs seem to be at an intermediate state between contractile and synthetic phenotype, and perhaps in a process of phenotypic transition.

In the context of atherosclerosis, a variety of factors can potentially induce syndecan-1 expression on vSMCs. Our experiments revealed that native or oxidized LDL treatments had no effect on syndecan-1 mRNA expression by cultured human vSMCs. In contrast, syndecan-4 mRNA appeared to be overexpressed by treated cells whereas the protein was not increased in human early lesions. This

observation could be explained at least in part, by syndecan-4 shedding, as it has been reported by Houston and colleagues [19].

Other soluble factors present in early lesions may induce syndecan-1 expression. Among potential candidates, growth factors including TGF- $\beta$ 1 and platelet derived growth factor (PDGF) [27] [21], and angiotensin II [15] are known to regulate syndecan-1 expression in various cell types. Similar to a previous study, we observed an increase in syndecan-1 gene expression in vSMCs after TGF- $\beta$ 1 treatment, suggesting that this growth factor might participate in syndecan-1 overexpression in atherosclerotic lesions. Furthermore, mechanical strain is known to affect syndecan-1 expression in vSMCs. A previous study noted a sustained increase in syndecan-1 gene expression after an imposed increase in cyclic stress [27]. Whether these factors contribute to syndecan-1 overexpression by vSMC in early atherosclerosis remains to be investigated.

Previous works from other laboratories have identified syndecan-1 as a potential modulator of vSMC phenotype. Chatterji has recently demonstrated that the loss of syndecan-1 in knock-out mice enhances SMC proliferation, and downregulates genes expression of differentiation markers [16]. In the current study, we have elaborated an in vitro model of SMC overexpressing syndecan-1 in order to define syndecan-1 functional role on vSMC phenotypic transition. Using lentiviral transduction, we obtained vSMCs that overexpress at the membrane a mature form of syndecan-1, containing glycosaminoglycan chains. We confirmed that transduction of vSMCs by an empty lentiviral vector did not affect their phenotype.

As previous studies report the important role of syndecan-1 in lipoprotein metabolism, we analyzed the effect of syndecan-1 overexpression on LDL internalization by SMCs. During atherogenesis, the ability to internalize LDL is a critical process that determines SMC foam cells formation. Our experiments revealed however that in our model syndecan-1 has no effect on this process.

To further explore syndecan-1 effect on SMC characteristics, we examined the expression of SM  $\alpha$ -actin, calponin, myosin, and collagen I, in vSMCs transduced with control or syndecan-1-containing-plasmid, after stimulation with TGF-  $\beta$ 1. Calponin localizes in the SMC contractile apparatus where it

binds to actin, modulating actin-myosin interactions that are responsible for contraction [28]. TGF- $\beta$ 1 is a multifunctional cytokine that is known to induce the upregulation of both contractile markers and extracellular matrix genes in vSMCs [29]. Our data revealed a possible amplification of syndecan-1 on the upregulation of SM  $\alpha$ -actin, calponin, myosin, and collagen I, induced by TGF- $\beta$ 1. Consistent with previous results, syndecan-1 seemed to facilitate a differentiated phenotype by increasing the expression of contractile markers induced by TGF-  $\beta$ 1. On the other hand, it appeared to upregulate the synthesis of type I collagen as well. Thus, our results suggest that syndecan-1 amplifies the bifunctional effects of TGF- $\beta$ 1 and might contribute to drive vSMCs towards contractile or synthetic phenotype and to adapt vSMC response to different pathological conditions.

Although the mechanisms for these effects have not been elucidated, several possibilities should be considered. Syndecan-1, with its complex structure, combines many properties. The extracellular domain bears glycosaminoglycan chains which can attach signaling molecules and guide them to receptors on the membrane [30]. It also contains a transmembrane domain with a short cytoplasmic tail, which may directly trigger intracellular signals. In a model of angiotensin II-induced cardiac fibrosis, Schellings demonstrated that syndecan-1 is involved in the promotion of Smad signaling by TGF- $\beta$ 1. Syndecan-1 exaggerated the increase of type I collagen and connective tissue growth factor (CTGF) by cardiac fibroblasts after TGF- $\beta$ 1 stimulation, amplifying the fibrotic response. This was accompanied with an increase in Smad2 phosphorylation [15]. In the context of atherosclerosis, TGF- $\beta$  /Smad signaling also contributes to collagen accumulation by SMC and fibrous lesion development [31]. As we showed that syndecan-1 amplifies collagen gene expression induced by TGF- $\beta$ 1 in vSMCs, our results suggest that syndecan-1 could be implicated in this fibrotic response. Whether Smad signaling pathway is involved in this effect remains to be elucidated.

Furthermore, Chaterji showed that syndecan-1 regulates SMC expression of differentiation markers through Akt, Protein kinase C- $\alpha$ , and S6RP pathways. In addition, syndecan-1 effect depends on interactions with integrins  $\alpha\beta$ 3 and  $\alpha\beta$ 5. Treatment with synstatin peptide, which inhibits these interactions, leads to decreased expression of SM  $\alpha$ -actin, calponin and smoothelin, while increasing

expression of inflammatory cytokines and adhesion receptors. Therefore, syndecan-1 may influence multiple signaling pathways to modulate diverse aspects of vSMC biology, including contraction, inflammation, and ECM secretion.

In summary, we reported that syndecan-1 expression within the aortic wall is increased during early atherosclerosis. Syndecan-1 is abundantly detected in intimal vSMCs, and could be a potent modulator of vSMC phenotype during atherogenesis. Our results indicated that syndecan-1 promotes contractile markers gene expression, while favoring type I collagen gene expression. Given the pathological role of vSMC in the early stages of atherosclerosis, defining the mechanisms leading to vSMC dedifferentiation is crucial. The overexpression of syndecan-1 during lesion development provides further insights into this receptor being involved in vSMC phenotypic transition.

### **Acknowledgements**

The authors thank the surgeons of the departments of cardiac and vascular surgery of the BICHAT Hospital for providing tissues. We thank Angélique LEVOYE and Pierre CHARNEAU for providing the lentiviral plasmid and technical support, Jean-Baptiste MICHEL and Véronique OLLIVIER for tissues and cultured vSMCs. We also thank Véronique AROCAS, Yacine BOULAFTALI, Richard BAYLES and Benoit HO-TIN-NOE for the scientific advices.

### **Funding**

This work was supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, the University Paris 13 and INSERM (Institut National de la Recherche Médicale).

### **Disclosures**

None.

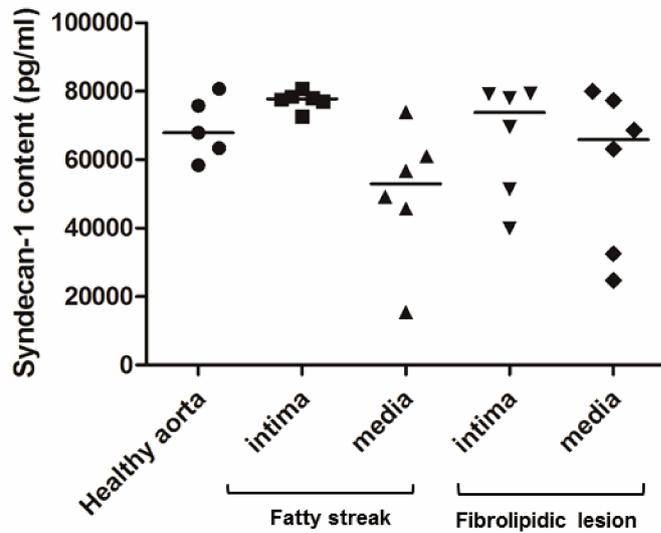
## LITERATURE CITED:

- [1] P. Lacolley, V. Regnault, A. Nicoletti, Z. Li, and J. B. Michel, "The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: A cell that can take on multiple roles," *Cardiovasc. Res.*, vol. 95, no. 2, pp. 194–204, 2012.
- [2] I. Tabas, G. Garcia-Cardena, and G. K. Owens, "The cell biology of disease: Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis," *J. Cell Biol.*, vol. 209, no. 1, pp. 13–22, 2015.
- [3] Shankman, "KLF4 Dependent Phenotypic Modulation of SMCs Plays a Key Role in Atherosclerotic Plaque Pathogenesis," *Nat. Med.*, vol. 73, no. 4, pp. 389–400, 2015.
- [4] H. Hao, G. Gabbiani, and M. L. Bochaton-Piallat, "Arterial smooth muscle cell heterogeneity: Implications for atherosclerosis and restenosis development," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 23, no. 9, pp. 1510–1520, 2003.
- [5] G. K. Owens, G. K. Owens, M. S. Kumar, M. S. Kumar, B. R. Wamhoff, and B. R. Wamhoff, "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease.," *Physiol. Rev.*, vol. 84, no. 3, pp. 767–801, 2004.
- [6] S. Allahverdian, P. S. Pannu, and G. a. Francis, "Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation," *Cardiovasc. Res.*, vol. 95, no. 2, pp. 165–172, 2012.
- [7] P. Tran, K. Tran-lundmark, R. Soininen, K. Tryggvason, J. Thyberg, and U. Hedin, "Increased Intimal Hyperplasia and Smooth Muscle Cell Proliferation in Transgenic Mice With Heparan Sulfate – Deficient Perlecan," *Circ. Res.*, pp. 550–558, 2004.
- [8] Y. Nakashima, T. N. Wight, and K. Sueishi, "Early atherosclerosis in humans: Role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans," *Cardiovasc. Res.*, vol. 79, no. 1, pp. 14–23, 2008.
- [9] I. Tabas, K. J. Williams, and J. Borén, "Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: Update and therapeutic implications," *Circulation*, vol. 116, no. 16, pp. 1832–1844, 2007.
- [10] P. Fogelstrand and J. Borén, "Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis," *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–7, 2012.
- [11] Y. Choi, H. Chung, H. Jung, J. R. Couchman, and E. S. Oh, "Syndecans as cell surface receptors: Unique structure equates with functional diversity," *Matrix Biol.*, vol. 30, no. 2, pp. 93–99, 2011.
- [12] E. Tkachenko, J. M. Rhodes, and M. Simons, "Syndecans: New kids on the signaling block," *Circ. Res.*, vol. 96, no. 5, pp. 488–500, 2005.
- [13] A. N. Alexopoulou, H. a B. Multhaupt, and J. R. Couchman, "Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, no. 3, pp. 505–528, 2007.

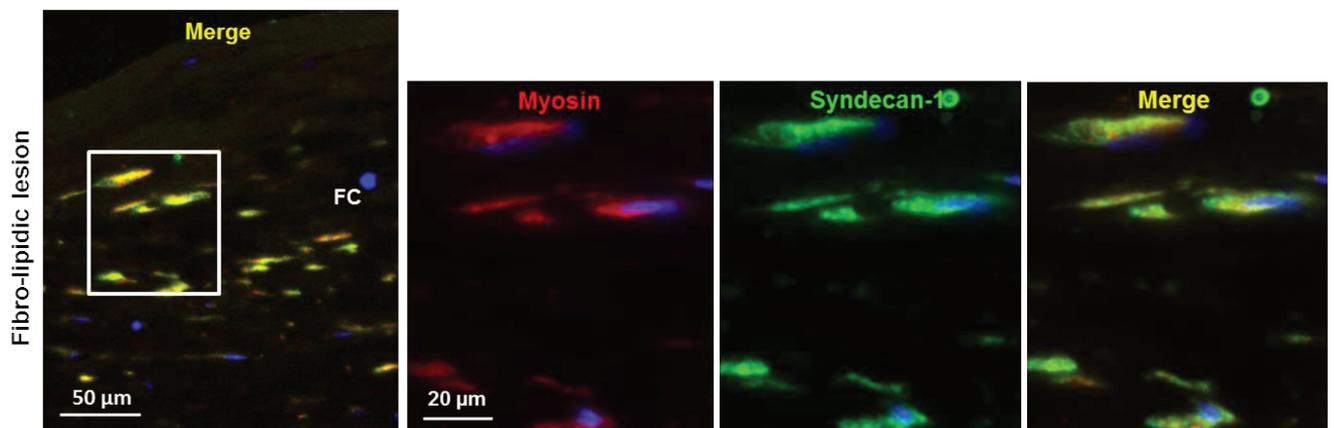
- [14] H. Wang, S. Moore, and M. Z. Alavi, "Expression of syndecan-1 in rabbit neointima following de-endothelialization by a balloon catheter," *Atherosclerosis*, vol. 131, no. 2, pp. 141–147, 1997.
- [15] M. W. M. Schellings, D. Vanhoutte, G. C. Van Almen, M. Swinnen, J. J. G. Leenders, N. Kubben, R. E. W. Van Leeuwen, L. Hofstra, S. Heymans, and Y. M. Pinto, "Syndecan-1 amplifies angiotensin II-induced cardiac fibrosis," *Hypertension*, vol. 55, no. 2, pp. 249–256, 2010.
- [16] S. Chaterji, C. H. Lam, D. S. Ho, D. C. Proske, and A. B. Baker, "Syndecan-1 regulates vascular smooth muscle cell phenotype," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, 2014.
- [17] K. I. Stanford, J. R. Bishop, E. M. Foley, J. C. Gonzales, I. R. Niesman, J. L. Witztum, and J. D. Esko, "Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 11, pp. 3236–3245, 2009.
- [18] R. J. Randall and a Lewis, "The folin by oliver," *Readings*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.
- [19] M. Houston, M. a Julien, S. Parthasarathy, and E. L. Chaikof, "Oxidized linoleic acid regulates expression and shedding of syndecan-4," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 288, no. 2, pp. C458–66, 2005.
- [20] A. Bobik, "Transforming growth factor- $\beta$ s and vascular disorders," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, no. 8, pp. 1712–1720, 2006.
- [21] N. Fukai, R. D. Kenagy, L. Chen, L. Gao, G. Daum, and A. W. Clowes, "Syndecan-1: An inhibitor of arterial smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, no. 9, pp. 1356–1362, 2009.
- [22] a. Schmidt, S. Lorkowski, D. Seidler, G. Breithardt, and E. Buddecke, "TGF- $\beta$ 1 generates a specific multicomponent extracellular matrix in human coronary SMC," *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 36, no. 7, pp. 473–482, 2006.
- [23] J. Wen, P. Wang, S. V. Smith, C. a. Haller, and E. L. Chaikof, "Syndecans are differentially expressed during the course of aortic aneurysm formation," *J. Vasc. Surg.*, vol. 46, no. 5, pp. 1014–1025, 2007.
- [24] A. C. Doran, N. Meller, and C. a. McNamara, "Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, no. 5, pp. 812–819, 2008.
- [25] J. Miano, E. Olson, M. Periasamy, K. Ligon, and P. Cserjesi, "Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis," *Circ. Res.*, vol. 75, pp. 803–812, 1994.
- [26] T. Yoshida and G. K. Owens, "Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity," *Circ. Res.*, vol. 96, no. 3, pp. 280–291, 2005.

- [27] Matheau A. Julien, C. a. Haller, P. Wang, J. Wen, and E. L. Chaikof, "Mechanical strain induces a persistent upregulation of syndecan-1 expression in smooth muscle cells," *J. Cell. Physiol.*, vol. 213, no. 2, pp. 440–444, 2007.
- [28] a J. J. North, M. Gimona, R. a a Cross, and J. V. V Small, "Calponin is localised in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells," *J.Cell Sci.*, vol. 107 ( Pt 3, pp. 437–444, 1994.
- [29] X. Guo and S.-Y. Chen, "Transforming growth factor- $\beta$  and smooth muscle differentiation.," *World J. Biol. Chem.*, vol. 3, no. 3, pp. 41–52, 2012.
- [30] X. Xian, S. Gopal, and J. R. Couchman, "Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix," *Cell Tissue Res.*, vol. 339, no. 1, pp. 31–46, 2010.
- [31] N. Kalinina, "Smad Expression in Human Atherosclerotic Lesions: Evidence for Impaired TGF- $\beta$ /Smad Signaling in Smooth Muscle Cells of Fibrofatty Lesions," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 8, pp. 1391–1396, 2004.

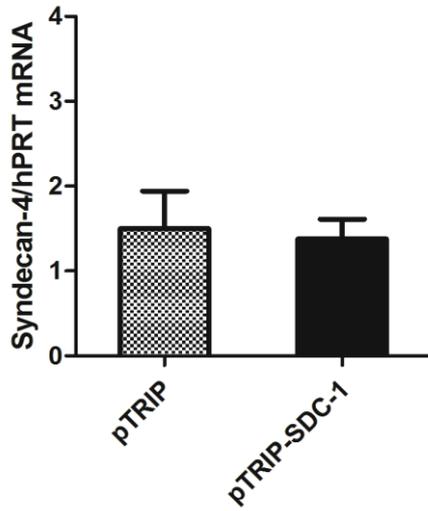
## SUPPLEMENTAL DATA



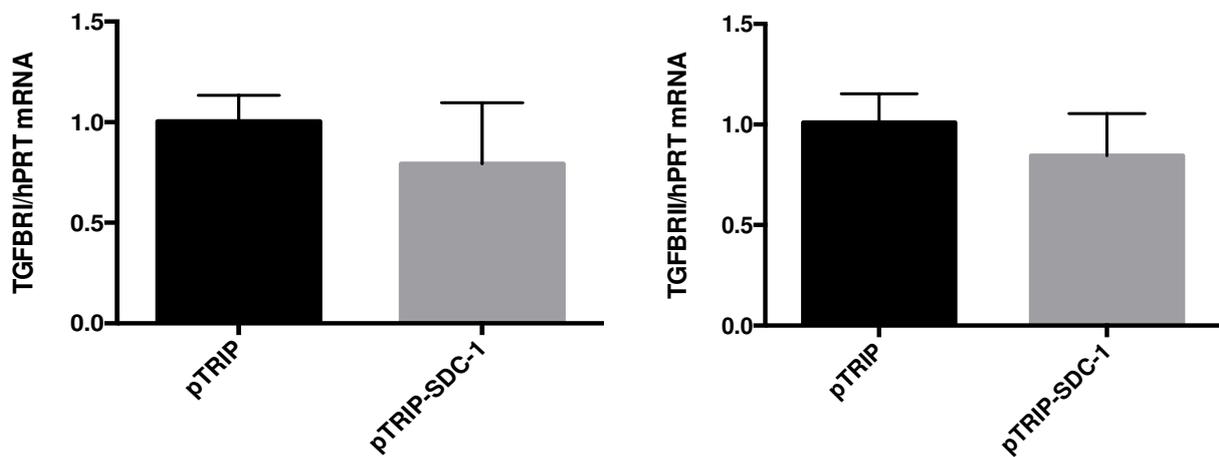
**Supplemental Figure 1. Quantification of syndecan-1 in conditioned media of healthy and atheromatous aortas.** Syndecan-1 protein content (pg/mL) was not significantly different between conditioned media from healthy and atheromatous aortas.



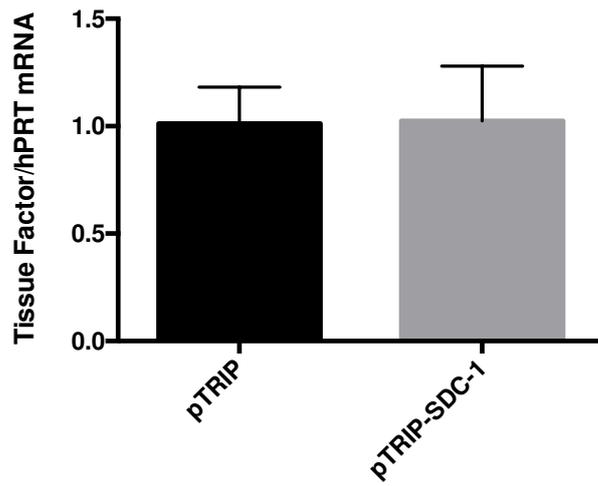
**Supplemental Figure 2. Syndecan-1 co-localizes with myosin in atheromatous aortas.** Fluorescence immunohistochemistry of early atheromatous aortas revealing a co-localization of syndecan-1 (green) and myosin (red) within the fibrous cap of fibrolipidic lesions (n=3).



**Supplemental Figure 3. pTRIP-SDC-1 transduction does not affect the expression of syndecan-4 mRNA in vSMCs.** RT-PCR analysis of syndecan-4 expression by vSMCs showed no significant difference between pTRIP- and pTRIP-SDC-1- transduced cells. (n= 4)



**Supplemental Figure 4. pTRIP-SDC-1 transduction does not affect the expression of TGFBR1 and TGFBR2 receptors mRNA in vSMCs.** RT-PCR analysis of TGFBR1 (left) and TGFBR2 (right) expression by vSMCs showed no significant difference between pTRIP and pTRIP-SDC-1 transduced cells. (n=2)



**Supplemental Figure 5. pTRIP-SDC-1 transduction does not affect the expression of tissue factor mRNA in vSMCs.** RT-PCR analysis of tissue factor expression by vSMCs showed no significant difference between pTRIP- and pTRIP-SDC-1- transduced cells. (n= 3)

## Conclusion

Le syndécan-1 est un régulateur important d'une variété de processus incluant la migration et la prolifération cellulaire, le remodelage matriciel, et la signalisation associée aux facteurs de croissance [89] [85]. Alors que les études montrent qu'il a un rôle critique dans certaines pathologies cardiovasculaires [114] [125], peu de données sont disponibles quant à son rôle dans l'athérosclérose. Dans cette étude, nous avons cherché à caractériser l'expression du syndécan-1 dans les lésions athéromateuses précoces, et à analyser son implication dans la transition phénotypique de la CML.

Nos résultats ont mis en évidence une augmentation de l'expression du syndécan-1 dans les stries lipidiques et les lésions fibro-lipidiques, comparés aux aortes saines. Dans ces lésions, le syndécan-1 est particulièrement exprimé par les CML localisées au niveau de l'épaississement intimal et de la chape fibreuse. Dans cet environnement lésionnel, une variété de facteurs pourrait potentiellement induire l'expression du syndécan-1 dans les CML. Nos résultats montrent que les LDL n'induisent pas de variation de l'expression du syndécan-1 dans les CML en culture. Toutefois, en accord avec une étude précédente, nous avons observé une surexpression du syndécan-1 dans les CML après stimulation par le TGF- $\beta$ 1, suggérant que le TGF- $\beta$ 1 pourrait être impliqué dans l'augmentation du syndécan-1 dans les lésions.

Etant donné le rôle critique du syndécan-1 en physiologie cellulaire, nous avons cherché à étudier son impact sur les modifications du phénotype de la CML. Un vecteur lentiviral a été élaboré afin de le surexprimer dans les CML en culture par transduction. La caractérisation des CML transduites révèle qu'elles surexpriment bien une forme mature du syndécan-1 à la membrane.

Comme le syndécan-1 a un rôle important dans le métabolisme des lipoprotéines, nous avons analysé l'effet de sa surexpression dans l'internalisation des LDL par les CML. Nos expériences révèlent cependant que le syndécan-1 n'a pas d'effet sur ce processus. L'expression des marqueurs de la fonction contractile et du collagène I a ensuite été analysée dans les CML surexprimant le syndécan-1. Nos résultats montrent que le syndécan-1 amplifie la sensibilité des CML aux effets du TGF- $\beta$ 1 sur l'expression de la SM  $\alpha$ -actine, de la calponine, de la smootheline et du collagène de type I. Ainsi, alors qu'il contribue à l'orientation de la CML vers un phénotype contractile, il pourrait également participer à la transition pro-fibrotique.

Bien que les mécanismes de ces effets n'aient pas été élucidés, les études précédentes montrent que le syndécan-1 peut réguler de multiples effecteurs de la signalisation associée au TGF- $\beta$ . En particulier, le syndécan-1 amplifie la voie TGF- $\beta$ /Smad dans un modèle de fibrose cardiaque induite par l'angiotensine II, entraînant l'augmentation de l'expression du collagène I par les fibroblastes cardiaques [113]. Cette même voie de signalisation TGF- $\beta$ /Smad est impliquée dans l'athérosclérose et le dépôt de collagène par les CML. L'implication du syndécan-1 sur la régulation de cette voie de signalisation reste donc à élucider. D'autre part, Chaterji évoque la régulation de la voie Akt/ Protein

Kinase C- $\alpha$  par le syndécan-1, qui modifie l'expression des marqueurs de fonction contractile. Le syndécan-1 aurait donc le potentiel de réguler diverses voies de signalisation impliquées dans la physiologie de la CML.

En résumé, nous avons mis en évidence une surexpression du syndécan-1 dans les CML intimes des lésions athéromateuses précoces. Nos résultats montrent que le syndécan-1 oriente la CML vers un phénotype contractile tout en favorisant la sécrétion de collagène de type I. Etant donné l'implication des CML dans l'évolution des lésions, il est essentiel de définir les mécanismes menant à leur dédifférenciation. Cette étude identifie ainsi un nouveau récepteur potentiellement impliqué dans les changements du phénotype de la CML lors de l'athérogenèse.



## **Partie II**

# **Origines de la cristallisation du cholestérol dans les lésions athéromateuses humaines**

Benoit Ho-Tin-Noé, Sophie Vo, Richard Bayles, Stephen Ferrière, Hayette Ladjal, Sondes Toumi, Catherine Deschildre, Véronique Ollivier, Jean-Baptiste Michel

### **Introduction**

Les cristaux solides de cholestérol sont fréquemment retrouvés dans les lésions avancées d'athérosclérose, et particulièrement dans les plaques rompues. Alors qu'ils ont longtemps été considérés comme un composant passif des lésions, des études récentes montrent qu'ils pourraient fragiliser la plaque et favoriser sa rupture. En particulier, l'équipe de G. S Abela a montré qu'en cristallisant, le cholestérol augmente de volume et forme de fines aiguilles qui peuvent perforer l'intima [70]. Ce phénomène a été observé in vitro et également sur des artères coronaires de patients ayant présenté un syndrome coronaire aigu [64]. Par ailleurs, d'autres publications ont suggéré que les cristaux pourraient induire l'activation de l'inflammasome NLRP3, entraînant la déstabilisation de la plaque [73]. Malgré un intérêt grandissant sur le rôle de ces cristaux dans la rupture de plaque, leur origine n'a pas été totalement élucidée. Une des principales limites réside dans la difficulté à les détecter dans les tissus, en raison de leur solubilité dans les solvants utilisés en histologie.

L'objectif de ce projet a été de déterminer le stade d'apparition et l'origine des cristaux de cholestérol solides dans les lésions athéromateuses humaines. Les analyses histologiques ont été réalisées sur des sections d'aortes humaines fraîches afin de s'affranchir des artefacts de cristallisation liés à la congélation des tissus. La présence de cristaux solides a été comparée entre des aortes saines et des coupes aortiques présentant des lésions précoces, par observation en lumière polarisée. En parallèle, des marquages histologiques ont été effectués afin de caractériser l'environnement où sont formés ces cristaux. Dans un deuxième temps, nous avons testé la capacité de CML en culture à générer des cristaux de cholestérol. L'influence du chargement en LDL et du métabolisme du cholestérol ainsi que la composition de la MEC sur ce processus a été étudiée.

## **Cholesterol crystallisation in human atherosclerosis**

**is triggered in smooth muscle cells during the transition from fatty streak to fibroatheroma**

### **Ho-Tin-Noé - Cholesterol crystallisation in human atheroma**

Benoît Ho-Tin-Noé<sup>1†\*</sup>, Sophie Vo<sup>1\*</sup>, Richard Bayles<sup>1</sup>, Stephen Ferrière<sup>1</sup>, Hayette Ladjal<sup>1</sup>, Catherine Deschildre<sup>1</sup>, Véronique Ollivier<sup>1</sup>, Jean-Baptiste Michel<sup>1</sup>.

From <sup>1</sup>Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratory for Vascular Translational Science, Inserm Unit 1148; 75018, Paris, France.

\*: the two authors contributed equally to this work.

*Article soumis à Circulation*

†Correspondence:

Benoît Ho-Tin-Noé, PhD.

INSERM U1148

Laboratory for Vascular Translational Science

Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard

75877 Paris Cedex 18 France

Tel : +33-1-40-25-86-03

Fax : +33-1-40-25-86-02

Email : [benoit.ho-tin-noe@inserm.fr](mailto:benoit.ho-tin-noe@inserm.fr)

**Word count:** 7618

**Subject terms:** Pathophysiology - Atherosclerosis - Smooth Muscle Proliferation and Differentiation

## Abstract

**Background.** Recent studies have shown that in addition to being major constituents of the atheromatous core, solid cholesterol crystals (CCs) promote atherosclerotic lesion development and rupture by causing mechanical damage and exerting cytotoxic and pro-inflammatory effects. These findings have suggested that targeting CCs might represent a therapeutic strategy for plaque stabilization. However, little is known about how cholesterol crystallization is initiated in human atherothrombotic disease. Here, we investigated these mechanisms. **Methods and Results.** We performed a thorough immunohistological analysis of non-embedded, minimally processed human aortic tissues, combining polarized light and fluorescence microscopy. We found that CC formation was initiated during the fatty streak to fibroatheroma transition in tight association with the death of intralésional smooth muscle cells (SMCs). Cholesterol-loaded human SMCs were capable of producing CCs *in vitro*, a process that was enhanced by type I collagen and by inhibition of autophagy and cholesterol esterification. The fibrous transition, which was characterized by a marked increase in type I collagen expression, was associated with changes in the expression of autophagy and cholesterol flux-related genes, including a decrease in the expression of the autophagic adapter p62, and an increase in that of the cholesterol intracellular transporter Niemann-Pick C1. Collagen was identified as a potent inducer of these changes in SMCs. **Conclusions.** Collagen-induced changes in cholesterol metabolism and autophagy flux in smooth muscle foam cells at the fibrolipid transition likely contribute to initiate cholesterol crystallization in human atherosclerosis. Also, our data are in support of a protective role of autophagy against CC formation.

## Introduction

Deposition and retention of cholesterol from lipoproteins and cell membranes in the arterial wall is the key initiating event of atherogenesis<sup>1</sup>. Cholesterol and lipid deposits trigger various local biological responses that promote the development and evolution of atheromatous lesions. These responses include invasion and proliferation of vascular smooth muscle cells (SMCs) into the tunica intima<sup>2</sup>, formation of foam cells of SMC and myeloid origin<sup>3</sup>, centripetal angiogenesis from adventitial vasa vasorum<sup>4</sup>, and recruitment of leukocytes<sup>5</sup>.

Early studies have shown that transitions in the physical state of lipids derived from retained lipoproteins and cell membranes, in particular cholesterol, occur during the course of atheromatous disease<sup>6</sup>. Analyses of lipids from fresh human atheromatous aortic samples by various methods have indeed shown that within atheromatous lesions, cholesterol is present in lipid phases of at least three types, with distinct physical states<sup>7-10</sup>. Intralésional cholesterol can thus be found in: (1) lamellar liquid-crystalline phospholipid vesicles and membranes, in which cholesteryl esters (CE) and unesterified (free) cholesterol (FC) can be incorporated to a limited extent, (2) oily liquid and liquid-crystalline droplets principally made of CE and triglycerides, covered with a surface of phospholipids and FC, or (3) solid crystals of FC. In contrast, in the healthy arterial wall, cholesterol is almost exclusively found as a component of lamellar liquid-crystalline cell membranes. While liquid and liquid-crystalline lipid droplets and vesicles appear in fatty streaks, the earliest visible atherosclerotic lesions, solid cholesterol crystals (CCs) are generally considered as a prominent feature of advanced plaques<sup>7, 8, 10, 11</sup>. The fact that lesion content in CCs increases along with lesion advancement has long suggested an implication of CCs in the progression of atherosclerosis and, more generally, that transitions in the physical state of lipids also contribute to the deleterious effects of retained lipids.

In recent studies, the group of George S. Abela has demonstrated that transformation of cholesterol from liquid to solid crystals increases its volume, potentially leading to expansion of the lipid core, and that forming CCs can induce intimal injury, as indicated by the presence of sharp CCs perforating

the cap of ruptured human coronary plaques<sup>12-14</sup>. Furthermore, recent experimental results obtained *in vitro* have shown that CCs are potent activators of the NLRP3 inflammasome, a pathway whose activation contributes to lesion development in hypercholesterolemic mice<sup>15</sup>. Therefore, it appears that in addition to being a major constituent of the atheromatous core, the most thrombogenic component of human plaques<sup>16</sup>, CCs could also promote plaque growth and evolution towards rupture by both mechanical and cell-mediated mechanisms. These findings, showing that CCs are far from being inert components of plaques, have suggested that preventing cholesterol crystallization or its deleterious consequences might represent a potential therapeutic strategy for atheromatous disease and plaque stabilization<sup>17</sup>. This current focus somewhat reminisces past interests in dissolving CCs to facilitate reversal of atherosclerotic lesions<sup>18</sup>. Surprisingly however, besides *in vitro* studies showing that cholesterol crystallization can occur intracellularly in cholesterol-loaded macrophages<sup>19</sup> and endothelial cells<sup>20</sup>, and that it is impacted by physical factors like temperature or pH<sup>21</sup>, little is known about the initial triggers of cholesterol crystallization in human atheromatous disease. Here, we investigated how cholesterol crystallization is initiated in human atherothrombotic disease. By analyzing and comparing healthy human aortic segments and aortic segments bearing early atheromatous lesions, we show that the formation of CCs in atheromatous lesions is initiated during the fatty streak to fibroatheroma transition and associated with the death of vascular smooth muscle cells (SMCs). We further show that type I collagen is a potent regulator of cholesterol metabolism in human SMCs and that it enhances the formation of CCs in foam cells of SMC origin.

## **Methods**

### **Human tissue samples**

Human aortic segments were obtained from organ transplant donors with the authorization of the French Biomedicine Agency (PFS09-007). Immediately after reception, aortic rings were opened longitudinally and their outer adventitia was partially removed to ease sectioning. Macroscopic characterization was performed to separately cut healthy areas, fatty streaks, and fibrolipidic lesions as described previously<sup>4</sup>. A total of 37 healthy aortic segments (mean age 46 years, SD = 14, 58 % male subjects), 34 fatty streaks (mean age 55 years, SD = 18, 48.5 % male subjects), and 41 fibrolipidic lesions (mean age 64 years, SD = 14.2, 56.1 % male subjects) were used in this study. Subsets of these samples were cut freshly for analysis in polarized microscopy, embedded in paraffin after fixation with 3.7% paraformaldehyde, and/or dissected and processed for preparation of conditioned medium, mRNA extraction, or primary cell cultures of smooth muscle cells (SMCs). The investigation conforms with the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

### **Immunohistological analysis**

The presence of crystalline material in tissue sections was detected by polarized light in a heated microscope environmental chamber at 37°C. Sections from non-embedded tissues were obtained using a Sorvall Tissue Chopper, Model TC-2 (Supplemental Figure 1).

For immunostaining, see online supplements.

### **Primary culture of human aortic SMCs**

Human aortic SMCs were isolated from the tunica media of healthy aortic segments as described previously<sup>4</sup>. A detailed description is given in the online supplement.

### **Measurement of interleukin-1 beta and -18 protein levels**

Concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-18 in tissue-conditioned medium were determined by ELISA following the manufacturer's instructions (Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland, and MBL, Woburn, MA, respectively).

#### **Cholesterol crystal production by cultured human SMCs**

Human aortic SMCs (passages 3 to 6) were seeded in 48-well plates. Prior to cell seeding, culture wells were either left uncoated or coated with fibronectin (50  $\mu$ g/ml), type I collagen (100  $\mu$ g/ml), or a combination of the two. Once confluent, SMCs were incubated or not with aggregated LDL (agLDL) for 72 hours in serum-free medium, washed with PBS, and subsequently treated with 30  $\mu$ g/ml Sandoz 58-035 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and/or 5 mM 3-methyladenine (3-MA) (Sigma-Aldrich). The formation of solid cholesterol crystals (CCs) was then assessed daily in phase contrast light microscopy.

#### **Impact of collagen on the expression of cholesterol metabolism-related genes in SMCs**

See online supplement.

#### **Analysis of gene expression by RT-PCR**

See online supplement.

#### **Statistical analysis**

Values are expressed as means  $\pm$  SEM and statistical differences were determined using the non-parametric Mann-Whitney test. For incidences of solid crystals in tissue sections from healthy and atheromatous aortic samples, individual groups were compared by a sequence of 2 x 2 two-sided Fisher's exact test using GraphPad Prism software (San Diego, CA, USA). P-values < 0.05 were considered as statistically significant.

## Results

**The formation of solid cholesterol crystals in human atheromatous lesions is initiated during the transition from the fatty streak to the fibrolipidic lesion stage.**

The presence of crystalline material in non-fixed fresh aortic sections prepared immediately after tissue collection was assessed by linear polarized light microscopy. Three types of birefringent particles were observed in intimal lesions: spheres with a formée cross image (Figure 1A), typical of liquid-crystalline lipid droplets<sup>22</sup>, and needle- and plate-shaped solid crystals (Figure 1B-C), typical of anhydrous and monohydrate cholesterol<sup>23</sup>. No birefringent particles of any type were found in sections from the 18 healthy aortic segments (Figure 1E). Birefringent particles were abundant in 17 of the 19 fatty streaks and in all 23 fibrolipidic intermediate lesions analyzed (Figure 1E). However, while fatty streaks contained almost exclusively liquid-crystalline lipid droplets, 20 of the 23 fibrolipidic lesions further comprised solid crystals in the form of isolated and/or aggregated needle- and plate-shaped crystals (Figure 1E). The presence of solid crystals within human fibrolipidic lesions was verified in tissue extracts prepared by gentle digestion of dissected lesions at 37°C with collagenase (Figure 1D). The cholesterol nature of these solid crystals was confirmed by their positive staining with filipin, which specifically binds to 3- $\beta$ -hydroxysterols<sup>24</sup>. Together, these results obtained using minimally-processed fresh samples indicate that the formation of solid cholesterol crystals (CCs) in human atheromatous disease is an event associated with the transition from the fatty streak to the fibrolipidic stage.

Studies in hypercholesterolemic mice have suggested that CCs could cause the release of pro-inflammatory cytokines of the interleukin-1 (IL-1) family in the earliest stages of atheromatous disease<sup>15</sup>. We thus investigated whether the appearance of CCs in fibrolipidic lesions was associated with the release of IL-1 $\beta$  and IL-18. Measurement of IL-1 $\beta$  and IL-18 protein levels in conditioned media from healthy and early atheromatous aortic samples indicated that there was no increase in

these cytokine levels at the fibrolipidic stage as compared to healthy or fatty streak samples (Supplemental Figure 2).

**Solid cholesterol crystals arise from smooth muscle cell-rich areas in human fibrolipidic lesions.**

In order to gain insights into the factors that might trigger CC formation, fibrolipidic lesions were analyzed and characterized immunohistologically with particular regards to CC localization and cell content. Importantly, while the birefringence pattern of aortic segments remained unaffected by fixation, it was drastically modified by snap-freezing in liquid nitrogen, whether the tissues were fixed or not. In fact, in all atheromatous samples tested, freezing induced the formation of CCs stemming from initial liquid crystalline lipid droplets, leading to both extracellular and intracellular artifactual CCs (Supplemental Figure 3). For this reason, all of the following immunohistological analyses were performed on non-frozen tissue sections.

As the name implies, fibrolipidic lesions were characterized by an increased intimal production of collagen resulting in the presence of a fibrous cap that entrapped the crystalline atheromatous core (Figure 2). Observation of fibrolipidic lesions in polarized microscopy before and after sirius red staining indeed showed that the atheromatous core, which contained most of the CCs that were dissolved by organic solvents during the staining procedure, was completely packed into a wicker basket-like and red-coloured type I collagen mesh (Figure 2A).

Although the atheromatous core appeared mostly acellular with only a few apparently intact nuclei in DAPI staining, it displayed some faint extracellular DNA staining (Figure 3A and B). This was particularly evident at its interface with the fibrous cap, especially in shoulder regions (Figures 3A-C). The presence of residual DNA and cell remnants in the atheromatous core of human fibrolipidic lesions was confirmed by positive TUNEL staining for fragmented DNA (Figure 3B), as well as by immunostaining for histone H1 (Figure 3C). The origin of these cellular remnants was investigated by

immunostaining for the smooth muscle cell marker, myosin heavy chain 11 (MYH11), and for the myeloid marker, calprotectin. The vast majority of lesion cells were positive for MYH11, while negative for the myeloid marker calprotectin (Figure 3D). Calprotectin-positive staining was mainly restricted to cells found directly below the endothelium, in the fibrous cap (Figure 3D). This was in contrast to MYH11-positive staining that was found throughout the entire fibrolipidic lesion, labelling nucleated cells in the fibrous cap and extracellular spaces surrounding cholesterol clefts in the atheromatous core (Figure 3D). Like MYH11,  $\alpha$ -smooth muscle actin and sm22 $\alpha$ , two other smooth muscle cell protein markers, were found around cholesterol clefts in the atheromatous core, in close association with nuclear remains (Figure 3E).

Because CCs are dissolved by organic solvents used during processing of paraffin-embedded tissues, one can detect them only indirectly, through the clefts they leave in tissue sections<sup>25</sup>. This technical limitation renders difficult the detection of the smallest CCs and the determination of their extracellular or intracellular origin. For this reason, the localization of CCs in fibrolipidic lesions was further investigated in non-embedded thick tissue samples that were immunostained for MYH11 in combination with bodipy and filipin staining, without using any organic solvent. Analysis of these samples by polarized light and optical sectioning in fluorescence microscopy showed that in addition to the atheromatous core, CCs were also present in the fibrous cap and at its interface with the atheromatous core (Figure 4A). There, CCs were extracellular, in direct vicinity of SMCs, or arising from SMC residues identified by MYH11 staining. SMC foam cells with bodipy-positive lipid vesicles, which were found throughout the fibrous cap (Supplemental Figure 4), were frequently observed in regions of CC formation next to the atheromatous core (Figure 4). Remarkably, the presence of CCs in the fibrous cap was associated with a decrease in SMC density, suggesting a link between SMC death and CC formation (Figure 4A). Strengthening this hypothesis, large extracellular CCs rising above SMC remains were found in abundance in the acellular atheromatous core (Figure 4B).

### **Collagen promotes the formation of cholesterol crystals by smooth muscle foam cells**

The ability of human SMCs to initiate cholesterol crystallisation was then investigated using primary cell culture of SMCs isolated from the medial layer of healthy aortic segments. To mimic the fibrous environment of fibrolipidic lesions, type I collagen was added to the commonly used fibronectin as a culture substrate for SMCs. Once confluent, SMCs were loaded with cholesterol by incubating them with aggregated LDL (agLDL), as aggregation of LDL was previously shown to enhance cholesterol uptake from LDL and its storage in lipid droplets by SMCs<sup>26</sup>. Staining of untreated control and agLDL-treated SMCs with oil red O showed that indeed, incubation with agLDL led to the formation of multiple lipid droplets, giving SMCs a foam aspect (Figure 5A). Following lipid-loading, SMCs were rinsed and kept in culture, and supplemented or not with Sandoz 58-035 and/or 3-methyladenine (3-MA), which are respectively inhibitors of cholesterol esterification and of the autophagy-lysosome pathway. After a few days of culture, needle-like crystals were observed in SMCs that had been loaded with cholesterol and treated with both inhibitors (Figure 5B and D). These crystals were positively stained by filipin, confirming their cholesterol nature (Fig. 5C). Depending on the cell donor (n = 4 different donors), the first crystals appeared between day 5 and day 12 after inhibitor addition. CCs were either floating or emerging from adherent or floating SMCs with a shadowy and translucent aspect, giving them a ghost cell appearance indicative of cell death (Figures 5C and 6B). On the contrary, control SMCs, treated or not with the autophagy and ACAT inhibitors, as well as untreated lipid-loaded SMCs, retained their morphology (Figure 5B). The decrease in cell viability of crystallization-prone SMCs loaded with cholesterol and treated with both inhibitors was confirmed by MTT assay (mean cell viability percentage of  $29.5 \pm 5.7\%$   $p < 0.006$  relative to control SMCs, and  $19.9 \pm 3.9\%$ ,  $p < 0.0002$ , relative to cholesterol-loaded SMCs).

Although by the time the first CCs had formed in cholesterol-loaded SMCs treated with Sandoz 58-035 and 3-MA no CCs were observed in any other condition (Figure 5D), needle-like CCs were eventually found in untreated cholesterol-loaded SMCs and in cholesterol-loaded SMCs treated with one of the inhibitors alone that had been kept in culture for extensive periods of time (> 15 days

after cholesterol loading, not shown). No crystals being were formed from non-cholesterol-loaded control SMCs in any condition.

The impact of collagen on cholesterol crystallisation was assessed by comparing the production of CCs by cholesterol-loaded SMCs treated with Sandoz 58-035 and 3-MA, grown on uncoated culture plates or on plates coated with fibronectin, fibrillar collagen, or with a mixture of fibrillar collagen and fibronectin. Whereas CC production was similar between SMCs grown on collagen alone or on collagen/fibronectin, it was drastically decreased on culture coating surfaces devoid of collagen (Figure 6A and B). Similar results were obtained when SMCs were incubated with agLDL prior to seeding on the variously coated surfaces (not shown), thus indicating that the differences in the kinetics of cholesterol crystallization were not due to differences in initial cholesterol accumulation. Taken together, these results indicate that CC formation can arise from foam cells of SMC origin and that this cytotoxic process is enhanced by collagen and countered by cholesterol esterification and autophagy.

### **Cholesterol metabolism in SMCs is affected by collagen and the fibrolipidic transition**

The enhancement of CC formation by collagen suggests that collagen might impact the expression of genes involved in cholesterol metabolism in SMCs. Intracellular FC can be incorporated into cell membranes, eliminated via reverse transport, or converted to CE for storage in lipid droplets. Release of FC and fatty acids from lipid droplets occurs via metabolization of CE by cytoplasmic neutral hydrolases or, alternatively, by acidic hydrolases through the lysosomal degradative pathway of autophagy<sup>27</sup>. Thus, in order to determine whether collagen regulates cholesterol metabolism in SMCs, we compared the expression levels of genes involved in cholesterol esterification, hydrolysis, intracellular trafficking, and reverse transport, as well as in selective autophagy, between control and cholesterol-loaded SMCs grown on a coating surface of fibronectin, supplemented or not with collagen. The addition of collagen to the fibronectin culture substrate of SMCs did not modify their expression level of ACAT-1, which was, however, increased by cholesterol loading independently of

the culture substrate (Figure 7A). The expression of neutral cholesterol ester hydrolase 1 (NCEH1) was not affected by separate supplementation of the culture matrix with type I collagen or cholesterol loading. It was nonetheless significantly increased in SMCs grown on type I collagen-supplemented matrix and loaded with cholesterol (Figure 7A), thus indicating a synergistic effect of cholesterol-loading and collagen enrichment of the extracellular matrix. A similar stimulating synergistic effect was observed on the expression of the tag team cholesterol transporters\_Niemann–Pick C1 and 2 (NPC1 and NPC2, Figure 7B), as well as on the expression of the autophagic adapter NBR1 (Figure 7C). Strikingly, collagen exerted an independent inhibitory effect on the expression of the autophagic adapter p62 (DCTN4) in both control and cholesterol-loaded SMCs (Figure 7C). Collagen had no effect on the expression of the ATP-binding cassette (ABC) cholesterol efflux transporters ABCA1 and ABCG1 (Figure 7D). As for ACAT-1, the expression of these receptors was upregulated by cholesterol-loading, independently of the culture substrate (Figure 7D). Together, these results show that collagen regulates the expression of key components of cholesterol homeostasis in SMCs, especially in cholesterol-loaded SMCs.

We then investigated if the collagen- and/or cholesterol loading-induced changes in the expression of cholesterol homeostasis-related genes observed *in vitro* matched changes found in early atheromatous human tissues. The expression of ACAT-1, NCEH1, ABCG1, and NPC2 was significantly increased in the intima of aortic segments bearing fatty streaks or fibrolipidic lesions as compared to subjacent medial layers or to healthy aortic segments (Figure 8A-C). There was no statistically significant difference in the expression levels of these genes between fatty streaks and fibrolipidic lesions (Figure 8A-C), suggesting that upregulation of these genes occurs at the very early stages of atheromatous disease. Conversely, the expression of ABCA1 and NPC1 was significantly increased only in fibrolipidic lesions (Figure 8A-C), suggesting that these modifications in gene expression are later events associated with the fibrolipidic transition. In contrast to the expression of ACAT1, NCEH1, and of reverse and intracellular cholesterol transporters, the expression of the two autophagic adapters, p62 and NBR1, was negatively regulated by atheromatous disease (Figure 8D).

Downregulation of NBR1 expression occurred as early as the fatty streak stage, while that of p62 developed at the fibrolipidic stage (Figure 8D). Thus, among the early atheroma-associated changes in the expression of cholesterol homeostasis-related genes, the downregulation of p62 and upregulation of NPC1 specifically at the fibrolipidic stage somewhat mirrored the effects of collagen enrichment on the expression of these genes in control and/or cholesterol-loaded SMCs (Figure 7B-C).

## Discussion

In the present study we investigated the possible mechanisms of cholesterol crystallization in human atheromatous disease. Our analysis of minimally processed human tissue samples shows that CC formation is initiated during the transition from fatty streak to fibrolipidic lesion. This result is in agreement with earlier studies on that topic showing that CCs were absent from human fatty streaks and first appeared in intermediate lesions, at the fibroatheroma stage<sup>7-10, 22</sup>. It is, however, in contrast with more recent data obtained in hypercholesterolemic mice, in which CCs were found in early diet-induced atherosclerotic lesions<sup>15, 28</sup>. Besides possible species-related differences, the use of frozen sections in these recent studies might explain this discrepancy with our results and those of earlier studies obtained from analysis of non-frozen human tissues. Organic solvents used in standard histology procedures are known to dissolve cholesterol CCs, thus greatly attenuating their presence and extent in tissue sections<sup>25</sup>. We show here that, conversely, snap-freezing causes artifactual crystallization of cholesterol from lipid inclusions in early atheromatous human lesions, and that this occurs independently of prior tissue fixation with PFA, one of the most effective fixatives for studying the structure of lipid droplets<sup>29</sup>. It should be noted that the artefactual formation of solid crystals from liquid-crystalline lipid inclusions present in human atheromatous tissues upon freezing was first reported by Stewart as early as in 1959<sup>30</sup>.

It has been shown *in vitro* that phagocytosis of CCs causes activation of the NLRP3 inflammasome in LPS-primed human and mouse macrophages<sup>15, 31</sup>. The association of CCs with the first appearance of inflammatory cells in initial atherosclerotic lesions of mice has suggested that CCs could trigger inflammation early in atherosclerosis via this pathway<sup>12, 15</sup>. For this reason, we measured the protein levels of the NLRP3 inflammasome downstream effectors, IL-1 $\beta$  and IL-18, to determine whether the appearance of CCs in human fibrolipidic lesions led to an increased inflammatory activity in these lesions as compared to CC-free healthy aortas and fatty streaks. The presence of CCs in human fibrolipidic lesions did not result in significant changes in these cytokine levels that remained as low

as in healthy aortic segments. It thus appears that initiation of CC formation at the fibrolipidic stage of human atheromatous disease does not impact the overall content of these pro-inflammatory cytokines. We and others have shown previously that most intimal cells in human fatty streaks and early fibrolipidic lesions are SMCs<sup>3, 4, 32, 33</sup>, and that monocytes/macrophages are scarce and mostly located in the inner intima of these lesions<sup>34-36</sup>. The relatively poor monocyte/macrophage content of these lesions might contribute to the lack of impact of CC formation on IL-1 $\beta$  and IL-18 production at these early stages of the disease. Furthermore, in line with increasing evidence that SMCs play a more important role in cholesterol accumulation and lesion progression than previously thought<sup>3, 37, 38</sup>, signal amplification with biotinylated anti-streptavidin antibodies allowed us to show that the majority of foam cells in fibrolipidic lesions were positive for MYH11, and that CCs are found in close association with dead SMCs. Not only were CCs found in SMC-rich areas at the interface between the atheromatous core and the fibrous cap, but they were also found rising from SMC cemeteries characterized by the presence of extracellular remnants of DNA, histones and of various SMC protein markers in the apparently acellular atheromatous core. This suggested to us a possible link between CC formation and SMC death, which we addressed using primary cultures of human SMCs. We found that cholesterol-loaded SMCs were indeed capable of producing CCs, a process that was accompanied by increased cell mortality. Cholesterol crystallization in smooth muscle foam cells was enhanced by combined inhibition of ACAT and PI3k III-dependent autophagy, and strikingly, by enrichment of the extracellular matrix with type I collagen. Cholesterol esterification and autophagosome formation therefore appear as potential protective mechanisms against CC formation in smooth muscle foam cells, while type I collagen would promote it.

Esterified cholesterol has long been known to be the storage form of cholesterol in the organism. CE are in fact more stable and less cytotoxic than FC<sup>39, 40</sup>. The implication of the autophagy-lysosome pathway in the regulation of cholesterol metabolism in foam cells is a more recent notion but accumulating evidence points to a role of autophagy in limiting atherosclerosis progression. Ouimet *et al.* have shown *in vitro* that delivery of lipid droplets to lysosomes by autophagosomes contributes

to CE hydrolysis for reverse cholesterol transport in cholesterol-loaded mouse macrophages<sup>27</sup>. *In vivo*, hypercholesterolemic mice with a global defect in autophagy had enhanced atherosclerosis with a possible increased plaque CC content, the latter observation requiring confirmation as it was obtained from analysis of frozen sections<sup>41</sup>. More recently, it was shown that defective autophagy selectively induced in SMCs was sufficient to accelerate diet-induced atherogenesis in mice<sup>42</sup>. The authors of this study proposed that the accelerated senescence of autophagy-defective SMCs could contribute to this phenotype. Our results suggest that in addition, enhanced cholesterol crystallization could be another deleterious consequence of defective autophagy in SMCs.

The fact that fibrillar collagen stimulates CC production in smooth muscle foam cells suggests that the increased collagen deposition occurring at the fibrolipidic stage could contribute to trigger cholesterol crystallization in human atherosclerosis. Considering the tight association of CCs with cell death, the fibrous transition might thus initiate a vicious circle of crystal formation and smooth muscle foam cell death, promoting the growth of the acellular atheromatous core. Such a phenomenon would be particularly active in areas rich in SMCs, cholesterol, and collagen, such as shoulder regions, where we observed dead SMCs in abundance. In support of a role of collagen/smooth muscle foam cell interactions in plaque progression, quantitative histological analyses of human atherosclerotic lesions have indicated that both collagen deposition and an increase in SMC-derived foam cells were critical for the transition from early lesions to more advanced lesions<sup>43</sup>.

From a mechanistic perspective, stimulation of CC formation by fibrillar collagen hints that the composition of the extracellular matrix modulates cholesterol metabolism in SMCs. To our knowledge, there is little or no data on a possible regulation of cholesterol metabolism by collagen. Our *in vitro* experiments provide evidence of such a regulation. Among the main changes, we found that addition of type I collagen to the fibronectin culture surface caused a down-regulation of p62 expression in both control and cholesterol-loaded SMCs. In addition, collagen induced an up-

regulation of the expression of NPC1 and 2, two intracellular cholesterol transporters, specifically in cholesterol-loaded SMCs. Therefore, our results show that type I collagen modulates the expression of regulators of the autophagic flux and of cholesterol trafficking, both of which help determine intracellular FC level and localization. It is noteworthy to mention that besides FC concentration, FC sublocalization in the cytosol or in specific organelles is also a determinant of FC cytotoxicity<sup>44</sup>, and potentially of its crystallization, which is influenced by pH<sup>21</sup>. Remarkably, a down-regulation of p62 and up-regulation of NPC1 were observed in fibrolipidic lesions as compared to fatty streaks, suggesting that enrichment in type I collagen at the fibrolipidic transition could impact the expression of these genes. Another notable change in fibrolipidic lesions as compared to fatty streaks was a marked increase in the expression of ABCA1, which was not reproduced in cultured SMCs by addition of collagen. This indicates that factors others than collagen also likely contribute to modulate the overall cholesterol metabolism in plaques at the fibrolipidic transition. Enrichment in plaque cholesterol content might be one of these factors, as cholesterol loading induced an increase in ABCA1 expression in cultured SMCs.

In conclusion, our observations indicate that cholesterol crystallization in human atherosclerosis is initiated at the fibrolipidic lesion stage and is related to SMC death. We show that cholesterol-loaded SMCs are indeed capable of producing CCs, a cytotoxic process that is enhanced by type I collagen and prevented by autophagy and cholesterol esterification. We further show that the fibrous transition is associated with changes in the expression of intracellular cholesterol flux-related genes, including a decrease in the expression of the autophagic adapter p62, and demonstrate that fibrillar collagen is a potent inducer of some of these changes in SMCs. Taken together, our results suggest an important role of collagen/smooth muscle foam cell interactions in the progression of human atherosclerotic lesions and are in support of a protective role of autophagy against atherosclerosis progression.

## **Acknowledgements**

We thank France Roussin and the surgeons of the Bichat Hospital, Beaujon Hospital, and St. Louis Hospital for providing tissues, and Dr. Mary Osborne-Pellegrin for her help in editing.

## **Funding**

This study was supported by INSERM and by grants from La Fondation de France (2014/GRE/LL/HB/205-U1148), DHU FIRE, and CORDDIM Région Ile de France to B. Ho-Tin-Noé, and from La Fondation Lefoulon-Delalande to R. Bayles and La Fondation pour la Recherche Medicale to J-B. Michel.

## **Disclosures**

We have no conflict of interest to declare.

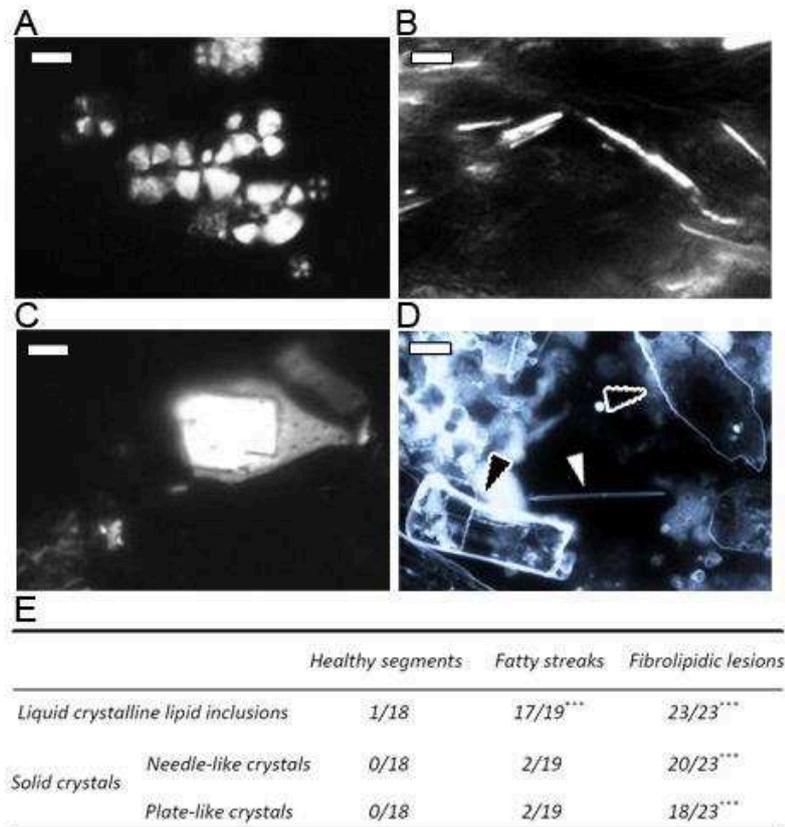
## References

1. Tabas I, Williams KJ and Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*. 2007;116:1832-44.
2. Thomas WA, Lee KT and Kim DN. Cell population kinetics in atherogenesis. Cell births and losses in intimal cell mass-derived lesions in the abdominal aorta of swine. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1985;454:305-15.
3. Allahverdian S, Chehroudi AC, McManus BM, Abraham T and Francis GA. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation*. 2014;129:1551-9.
4. Ho-Tin-Noe B, Le Dall J, Gomez D, Louedec L, Vranckx R, El-Bouchtaoui M, Legres L, Meilhac O and Michel JB. Early atheroma-derived agonists of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma trigger intramedial angiogenesis in a smooth muscle cell-dependent manner. *Circulation research*. 2011;109:1003-14.
5. Quinn MT, Parthasarathy S and Steinberg D. Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85:2805-9.
6. Anitschkow N and Chalutow S. Ueber experimentelle Choleserinsteatose und ihre Bedeutung fur die Entstehung einiger pathologischer Prozesse. *Zentralbl Allg Pathol Pathol Anat*. 1913;24:1-9.
7. Katz SS, Shipley GG and Small DM. Physical chemistry of the lipids of human atherosclerotic lesions. Demonstration of a lesion intermediate between fatty streaks and advanced plaques. *J Clin Invest*. 1976;58:200-11.
8. Bocan TM and Guyton JR. Human aortic fibrolipid lesions. Progenitor lesions for fibrous plaques, exhibiting early formation of the cholesterol-rich core. *Am J Pathol*. 1985;120:193-206.
9. Lang PD and Insull W, Jr. Lipid droplets in atherosclerotic fatty streaks of human aorta. *J Clin Invest*. 1970;49:1479-88.
10. Bogren H and Larsson K. An X-Ray-Diffraction Study Of Crystalline Cholesterol In Some Pathological Deposits In Man. *Biochim Biophys Acta*. 1963;75:65-9.
11. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD and Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995;15:1512-31.
12. Abela GS. Cholesterol crystals piercing the arterial plaque and intima trigger local and systemic inflammation. *J Clin Lipidol*. 2010;4:156-64.

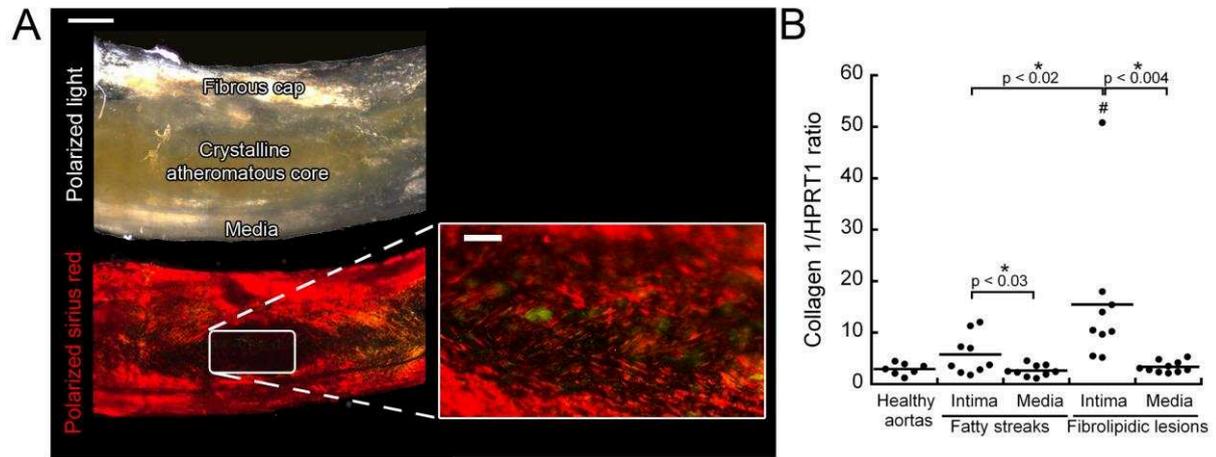
13. Abela GS and Aziz K. Cholesterol crystals rupture biological membranes and human plaques during acute cardiovascular events--a novel insight into plaque rupture by scanning electron microscopy. *Scanning*. 2006;28:1-10.
14. Abela GS, Aziz K, Vedre A, Pathak DR, Talbott JD and Dejong J. Effect of cholesterol crystals on plaques and intima in arteries of patients with acute coronary and cerebrovascular syndromes. *Am J Cardiol*. 2009;103:959-68.
15. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nunez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V and Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464:1357-61.
16. Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D, Shah PK and Badimon L. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol*. 1994;23:1562-9.
17. Janoudi A, Shamoun FE, Kalavakunta JK and Abela GS. Cholesterol crystal induced arterial inflammation and destabilization of atherosclerotic plaque. *Eur Heart J*. 2015.
18. North BE, Katz SS and Small DM. The dissolution of cholesterol monohydrate crystals in atherosclerotic plaque lipids. *Atherosclerosis*. 1978;30:211-7.
19. Tangirala RK, Jerome WG, Jones NL, Small DM, Johnson WJ, Glick JM, Mahlberg FH and Rothblat GH. Formation of cholesterol monohydrate crystals in macrophage-derived foam cells. *J Lipid Res*. 1994;35:93-104.
20. Hawi SR, Nithipatikom K, Wohlfeil ER, Adar F and Campbell WB. Raman microspectroscopy of intracellular cholesterol crystals in cultured bovine coronary artery endothelial cells. *J Lipid Res*. 1997;38:1591-7.
21. Vedre A, Pathak DR, Crimp M, Lum C, Koochesfahani M and Abela GS. Physical factors that trigger cholesterol crystallization leading to plaque rupture. *Atherosclerosis*. 2009;203:89-96.
22. Hata Y and Insull W, Jr. Significance of cholesterol esters as liquid crystal in human atherosclerosis. *Jpn Circ J*. 1973;37:269-75.
23. Loomis CR, Shipley GG and Small DM. The phase behavior of hydrated cholesterol. *J Lipid Res*. 1979;20:525-35.
24. Bittman R and Fischkoff SA. Fluorescence studies of the binding of the polyene antibiotics filipin 3, amphotericin B, nystatin, and lagosin to cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1972;69:3795-9.
25. Abela GS, Shamoun F, Vedre A, Pathak DR, Shah I, Dhar G and Leffler D. The effect of ethanol on cholesterol crystals during tissue preparation for scanning electron microscopy. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:93.

26. Llorente-Cortes V, Martinez-Gonzalez J and Badimon L. Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1998;18:738-46.
27. Ouimet M, Franklin V, Mak E, Liao X, Tabas I and Marcel YL. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab*. 2011;13:655-67.
28. Freigang S, Ampenberger F, Spohn G, Heer S, Shamshiev AT, Kisielow J, Hersberger M, Yamamoto M, Bachmann MF and Kopf M. Nrf2 is essential for cholesterol crystal-induced inflammasome activation and exacerbation of atherosclerosis. *European journal of immunology*. 2011;41:2040-51.
29. DiDonato D and Brasaemle DL. Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem*. 2003;51:773-80.
30. Stewart GT. Liquid crystals of lipid in normal and atheromatous tissue. *Nature*. 1959;183:873-5.
31. Rajamaki K, Lappalainen J, Oorni K, Valimaki E, Matikainen S, Kovanen PT and Eklund KK. Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation. *PLoS One*. 2010;5:e11765.
32. Orekhov AN, Andreeva ER, Mikhailova IA and Gordon D. Cell proliferation in normal and atherosclerotic human aorta: proliferative splash in lipid-rich lesions. *Atherosclerosis*. 1998;139:41-8.
33. Bocan TM, Schifani TA and Guyton JR. Ultrastructure of the human aortic fibrolipid lesion. Formation of the atherosclerotic lipid-rich core. *Am J Pathol*. 1986;123:413-24.
34. Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN and Sueishi K. Early human atherosclerosis: accumulation of lipid and proteoglycans in intimal thickenings followed by macrophage infiltration. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27:1159-65.
35. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G and Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1997;100:2680-90.
36. Otsuka F, Kramer MC, Woudstra P, Yahagi K, Ladich E, Finn AV, de Winter RJ, Kolodgie FD, Wight TN, Davis HR, Joner M and Virmani R. Natural progression of atherosclerosis from pathologic intimal thickening to late fibroatheroma in human coronary arteries: A pathology study. *Atherosclerosis*. 2015;241:772-82.
37. Vengrenyuk Y, Nishi H, Long X, Ouimet M, Savji N, Martinez FO, Cassella CP, Moore KJ, Ramsey SA, Miano JM and Fisher EA. Cholesterol loading reprograms the microRNA-143/145-myocardin axis to convert aortic smooth muscle cells to a dysfunctional macrophage-like phenotype. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2015;35:535-46.

38. Shankman LS, Gomez D, Cherepanova OA, Salmon M, Alencar GF, Haskins RM, Swiatlowska P, Newman AA, Greene ES, Straub AC, Isakson B, Randolph GJ and Owens GK. KLF4-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells has a key role in atherosclerotic plaque pathogenesis. *Nature medicine*. 2015;21:628-37.
39. Tabas I. Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. *J Clin Invest*. 2002;110:905-11.
40. Kwong CN, Heikkila RE and Cornwell DG. Properties of cholesteryl esters in pure and mixed monolayers. *J Lipid Res*. 1971;12:31-5.
41. Razani B, Feng C, Coleman T, Emanuel R, Wen H, Hwang S, Ting JP, Virgin HW, Kastan MB and Semenkovich CF. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. *Cell Metab*. 2012;15:534-44.
42. Grootaert MO, da Costa Martins PA, Bitsch N, Pintelon I, De Meyer GR, Martinet W and Schrijvers DM. Defective autophagy in vascular smooth muscle cells accelerates senescence and promotes neointima formation and atherogenesis. *Autophagy*. 2015;11:2014-2032.
43. Homma S, Troxclair DA, Zieske AW, Malcom GT and Strong JP. Histological changes and risk factor associations in type 2 atherosclerotic lesions (fatty streaks) in young adults. *Atherosclerosis*. 2011;219:184-90.
44. Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher EA, Marks AR, Ron D and Tabas I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nature cell biology*. 2003;5:781-92.

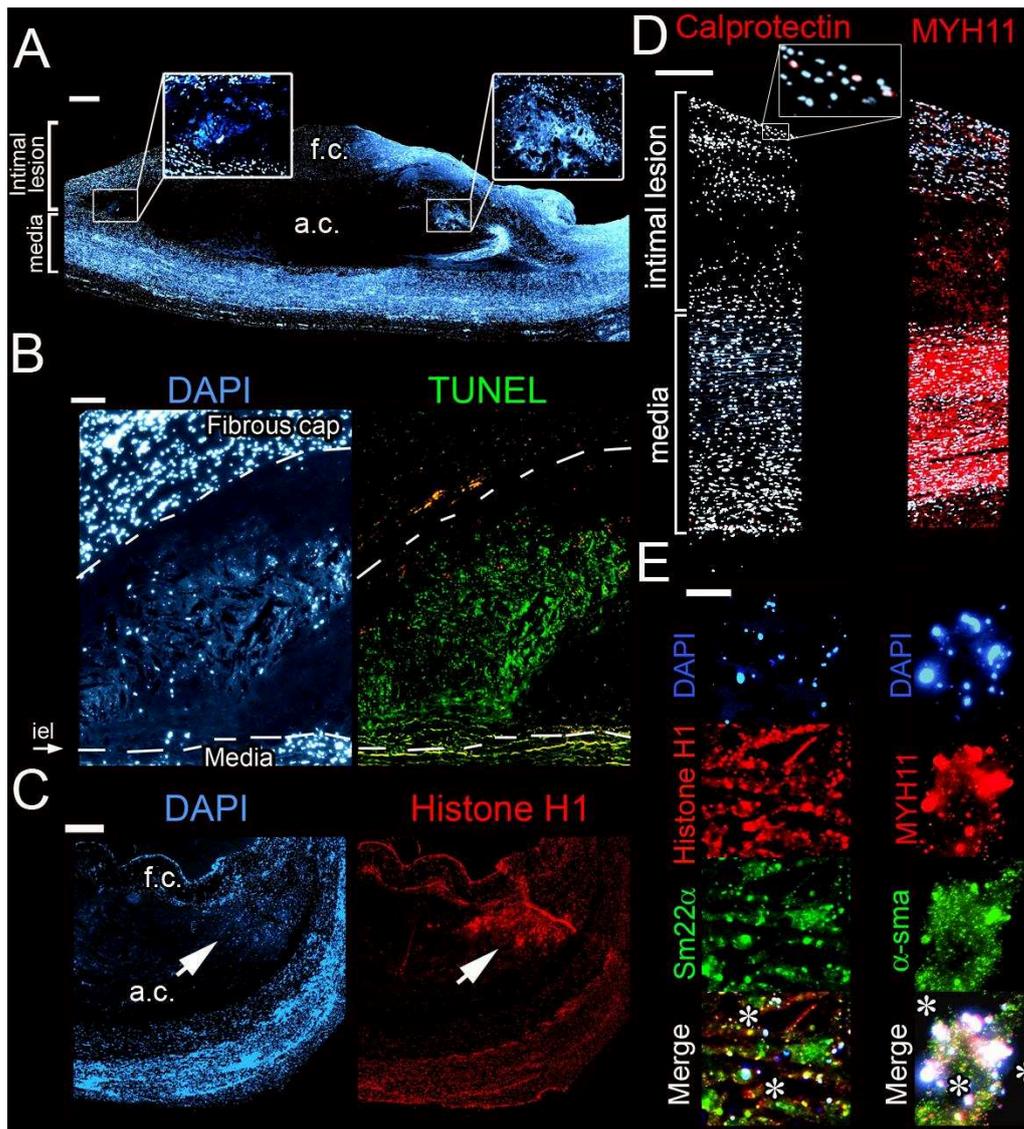


**Figure 1. Birefringent crystalline material in early atheromatous human aortas.** Crystalline material in non-fixed fresh sections of healthy and early atheromatous human aortic segments was investigated using linear polarized light microscopy. **A.** Representative image of the birefringent spherical particles found abundantly in fatty streaks and displaying a formée cross image, typical of liquid crystalline lipid droplets. **B and C.** Representative images of the needle-(**B**) and plate-(**C**)-shaped crystals found in fibrolipidic intermediate lesions. **D.** Filipin staining showing the presence of both plate- and needle-shaped cholesterol crystals (black and white arrowheads, respectively) in a film made from a collagenase-digested human fibrolipidic lesion. Bars (**A-D**) = 10  $\mu$ m. **E.** Frequency of liquid crystalline lipid inclusions and of solid cholesterol crystal presence in early atheromatous human aortas. For each groups, ratios represent the number of samples containing liquid or solid cholesterol crystal relative to the total number of samples. \*\*\* indicates a statistically significant difference from healthy segments ( $p < 0.0001$ ).

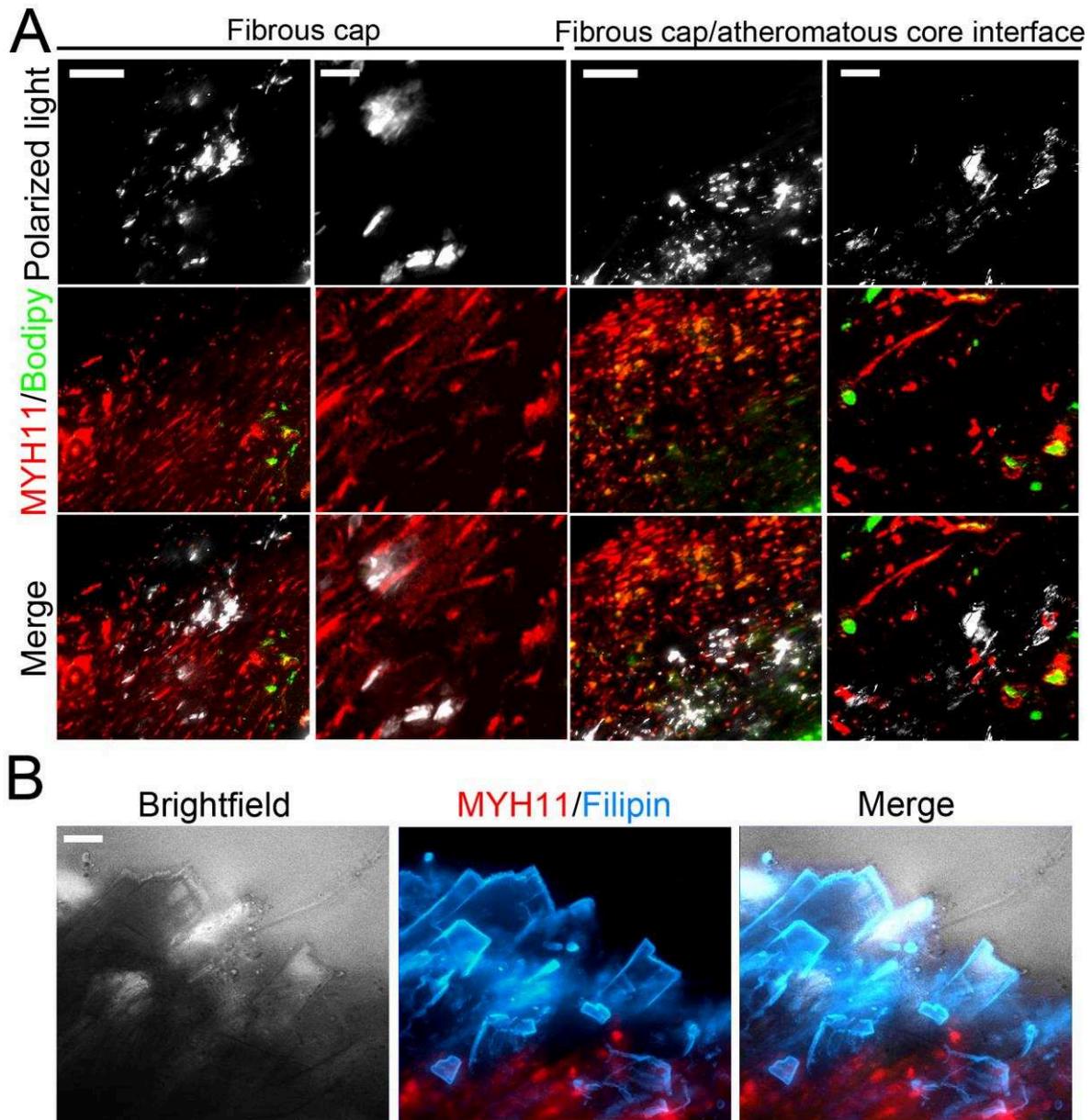


**Figure 2. The atheromatous core gets entrapped in a collagen casing at the fibrolipidic lesion stage.**

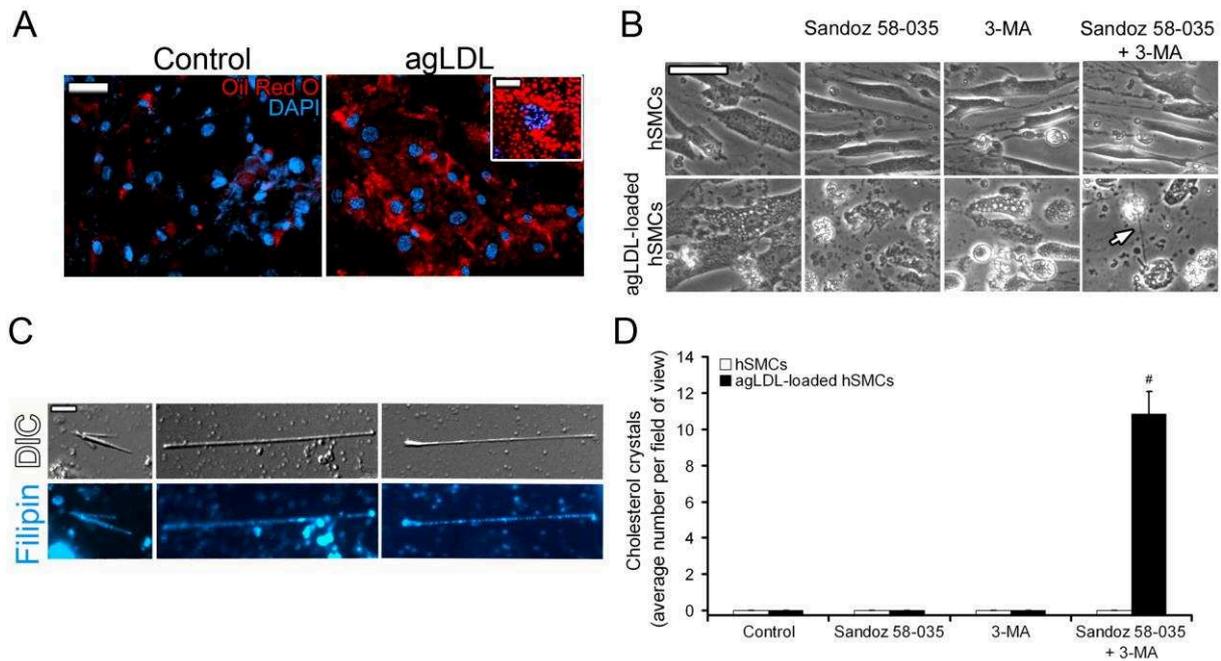
**A.** Representative images showing an overview of a fresh section from a human aortic segment bearing a fibrolipidic lesion before (top) and after (bottom) sirius red staining for collagen, as analyzed by polarized light microscopy. Note that the atheromatous core located between the media and the fibrous cap is entrapped in a collagen casing; bar = 500  $\mu\text{m}$ . The inset shows a higher magnification of the basket-like collagen mesh surrounding the atheromatous core. Bar = 100  $\mu\text{m}$ . **B.** Collagen mRNA levels in pulverized tissues from healthy aortas and from the medial layer and intimal lesion of early atheromatous aortas. Levels of transcripts were normalized to that of HPRT1.



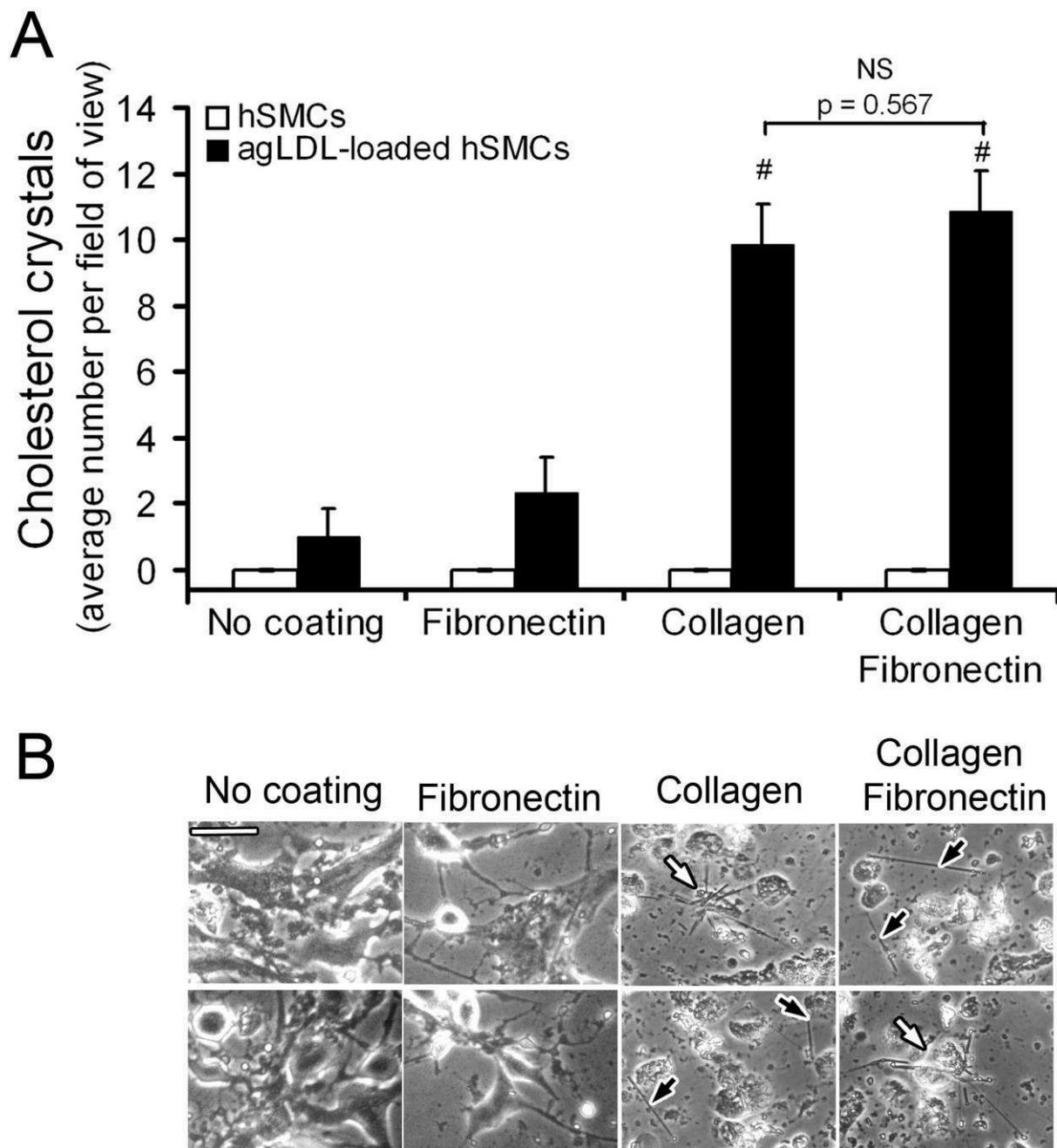
**Figure 3. Immunohistological characterization of solid cholesterol crystal-rich areas in human fibrolipidic lesions.** **A.** Characteristic aspect of a fibrolipidic aortic segment stained with DAPI (blue) and showing three zones with different histologic appearances in the intimal lesion. The central zone corresponding to the atheromatous core (a.c.) is mostly acellular, intermediary shoulder regions (squares) contain few intact nuclei and large areas of faint DAPI staining of residual DNA, and the peripheral fibrous cap (f.c.) is highly cellular. Bar = 500  $\mu$ m. **B.** Representative images showing that DNA fragments identified by DAPI and TUNEL staining are present in cholesterol cleft-rich shoulder regions of the lesion. iel: internal elastic lamina. Bar = 100  $\mu$ m. **C.** The presence of nuclear remnants in shoulder regions (arrows) and in the atheromatous core was confirmed by histone H1 staining. Bar = 500  $\mu$ m. **D.** Representative staining patterns for calprotectin and smooth muscle myosin heavy chain 11 (MYH11) in human aortic fibrolipidic aortic segments. Whereas positive staining for MYH11 was consistently found throughout the entire lesion, including the acellular atheromatous core, calprotectin staining was scarce and almost exclusively found in the lesion cap (inset). Bar = 250  $\mu$ m. **E.** Representative images showing the colocalization of nuclear remnants and protein markers of smooth muscle cells around cholesterol clefts (asterisks) as found in the atheromatous core and shoulder regions of human aortic fibrolipidic lesions. Bars = 10  $\mu$ m.



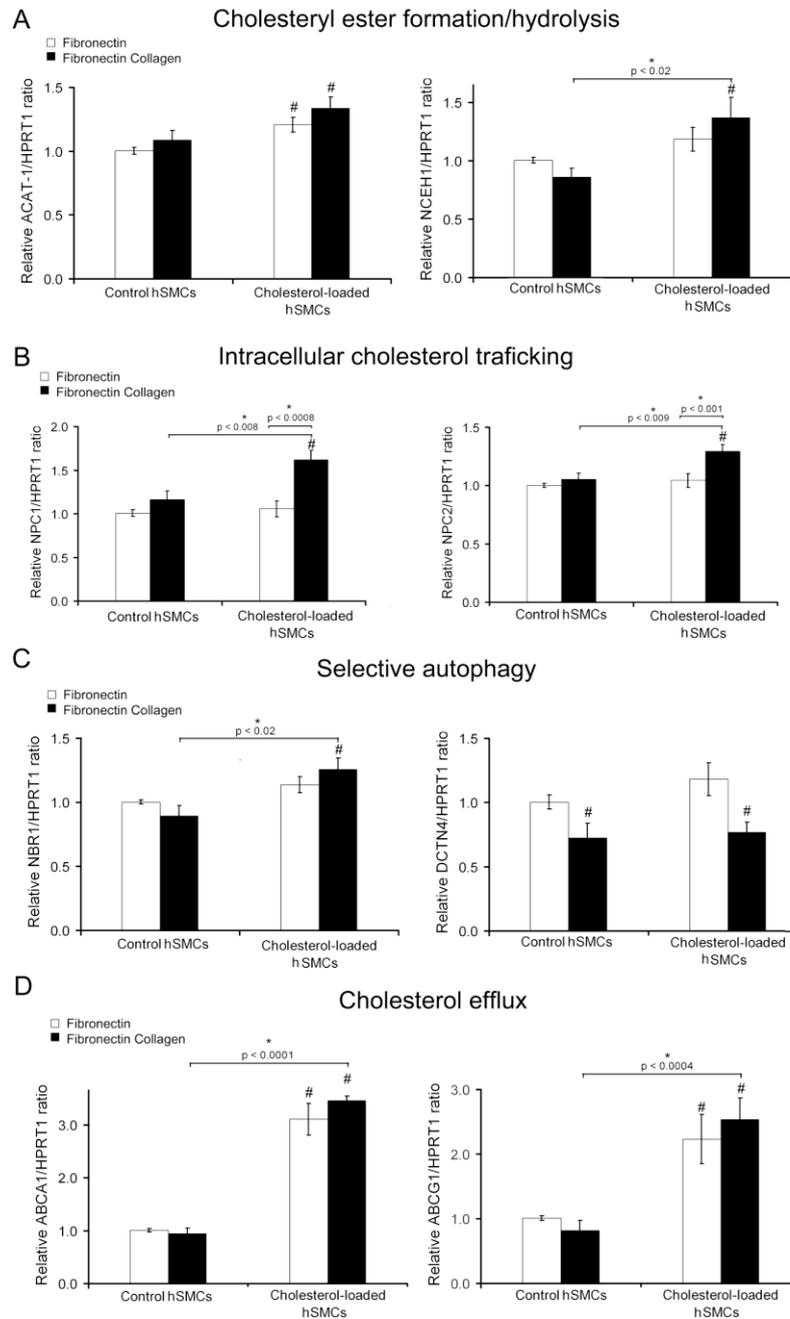
**Figure 4. Immunohistological analysis of the origin of solid cholesterol crystals in human fibrolipidic lesions.** The localization and origin of solid cholesterol crystals (CCs) in human fibrolipidic lesions was investigated in non-embedded fixed sections by polarized microscopy combined with fluorescent staining of smooth muscle myosin heavy chain 11 (MYH11) and lipid droplets (bodipy). **A.** Representative images of CCs detected in the fibrous cap (columns 1 and 2) or at its interface with the atheromatous core (columns 3 and 4). Note that while both plate- and needle-shaped CCs are found in close proximity to smooth muscle cells (SMC), including bodipy-positive SMCs, their presence also coincides with a local decrease in SMC density. Bar = 100  $\mu\text{m}$  (columns 1 and 3) and 20  $\mu\text{m}$  (columns 2 and 4). **B.** Filipin staining showing very large plate-shaped cholesterol crystals rising above smooth muscle cell remnants identified by MYH11 staining in the atheromatous core of a fibrolipidic lesion. Bar = 20  $\mu\text{m}$ .



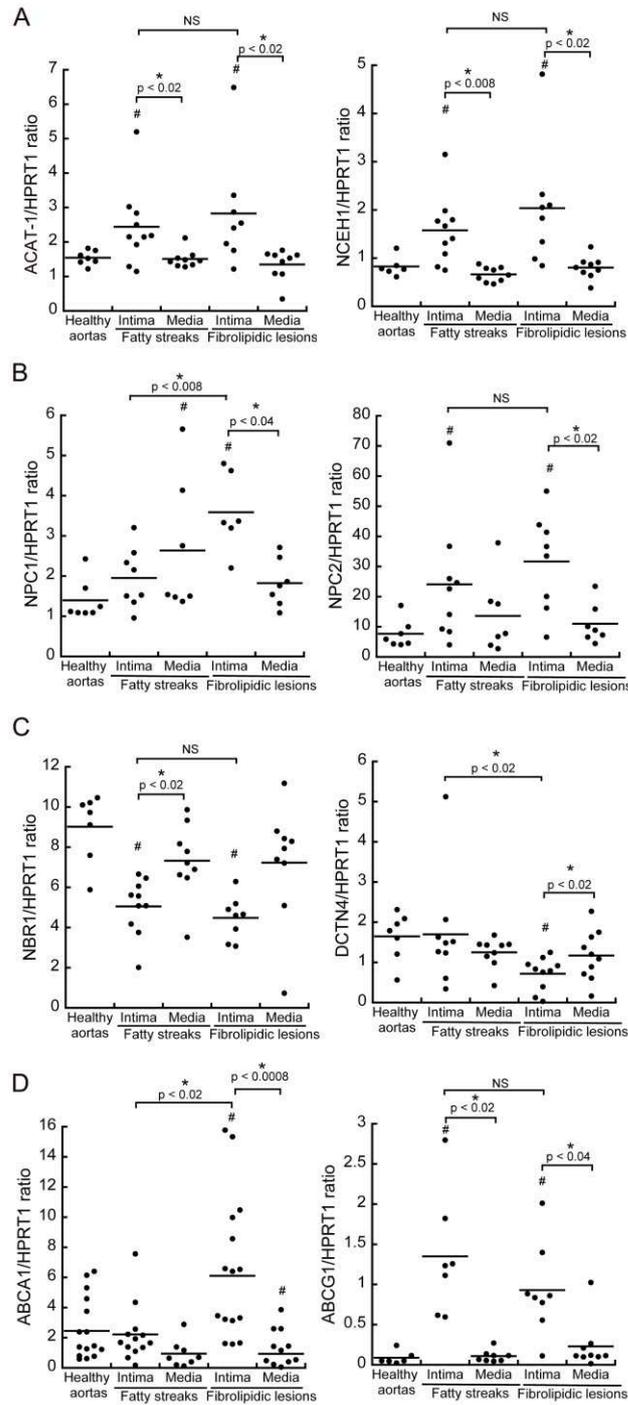
**Figure 5. Cholesterol-loaded human smooth muscle cells can release solid cholesterol crystals. A.** Oil red O and DAPI staining showing the transformation of SMCs into foam cells after 3 days of incubation with agLDL. Bars = 50  $\mu\text{m}$  and 10  $\mu\text{m}$  (inset). **B.** Phase contrast light micrographs showing the representative aspect of SMCs, loaded or not with agLDL and subsequently treated with Sandoz 58-035 and/or 3-MA. Images were taken 5 days after removing agLDL and adding the inhibitors. The arrow indicates a prominent needle-shaped CC extending across a dead and detached SMC. Bar = 50  $\mu\text{m}$ . **C.** Representative images of SMCs-derived needle-shaped CCs stained with filipin. Bar = 5  $\mu\text{m}$ . **D.** Quantification of cholesterol crystals (CCs) produced by control and agLDL-loaded SMCs 5 days after adding or not inhibitors of cholesterol esterification (Sandoz 58-035) and/or of autophagy (3-MA). Bars represent mean numbers ( $\pm$  SEM) of CCs in 6 random fields of view taken with a 20x objective from 3 48-well plate wells. The data are representative of 7 independent experiments from 4 cell donors. # indicates a significant difference compared to control SMCs,  $p < 0.05$ .



**Figure 6. Collagen stimulates the production of cholesterol crystals by cholesterol-loaded SMCs. A.** Quantification of cholesterol crystals (CCs) produced by control (SMCs) or cholesterol-loaded (agLDL-loaded SMCs) SMCs grown on different coatings and treated for 5 days with Sandoz 58-035 (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and 3-methyladenine (5 mM) after cholesterol loading. Bars represent mean numbers ( $\pm$  SEM) of CCs in 6 random fields of view taken with a 20x objective from 3 48-well plate wells. The data are representative of 5 independent experiments. # indicates a statistically significant difference compared to control SMCs grown without coating,  $p < 0.05$ . **B.** Representative images of agLDL-loaded SMCs cultured on variously coated surfaces. The white arrows indicate SMCs from which needle-shaped CCs are popping out, giving them a sea urchin aspect. The black arrows indicate floating extracellular needle-shaped CCs. Bar = 50  $\mu\text{m}$ .



**Figure 7. Single and combined effects of collagen and cholesterol loading on the expression of cholesterol trafficking and metabolism-related genes in smooth muscle cells.** Human smooth muscle cells (SMCs) were grown on either fibronectin or a combination of fibronectin and collagen, and incubated or not with cholesterol for 24 hours. Total RNA was then extracted to determine the expression level of genes relevant to (A) cholesteryl ester formation (ACAT-1) and hydrolysis (NCEH1), (B) intracellular cholesterol trafficking (NPC1 and NPC2), (C) autophagy (NBR1 and DCTN4), and (D) cholesterol efflux (ABCA1 and ABCG1). Levels of transcripts were normalized to the mRNA level of HPRT1 and expressed as a ratio relative to that of non-loaded control SMCs grown on fibronectin alone. Bars represent means  $\pm$  SEM from at least 6 independent experiments using different cell donors and performed in duplicate. # indicates a statistically significant difference compared to non-loaded control SMCs grown on fibronectin alone,  $p < 0.05$ .



**Figure 8. Comparison of the expression of cholesterol trafficking and metabolism-related genes between healthy and early atheromatous aortas.** mRNA levels of (A) ACAT-1 and NCEH1, (B) NPC1 and NPC2, (C) NBR1 and DCTN4, and (D) ABCA1 and ABCG1, were determined in pulverized tissues from healthy aortas and from the medial layer and intimal lesions of early atheromatous aortas. Levels of transcripts were normalized to the level of HPRT1. Each dot represents a different aortic sample, n = 6-13. # indicates a statistically significant difference compared to the healthy aorta group, p < 0.05.

## Supplemental Methods

### Primary culture of human aortic SMCs

The medial layer of healthy aortic segments was dissected free from the adventitia, minced into pieces, and digested in 0.3 % collagenase (Invitrogen, Paisley, UK) and 0.1 % elastase (Worthington, Lakewood, NJ) for 3 hours at 37°C. SMCs were then collected after filtration through 100- and 40- $\mu$ m nylon filters, and cultured in smooth muscle cell medium (Promocell, Heidelberg, Germany) containing 5% fetal calf serum, primocin (100  $\mu$ g/mL), plasmocin (5  $\mu$ g/mL), insulin (5 mg/mL), and growth factors (human epidermal and fibroblast growth factors, 0.5 and 2  $\mu$ g/mL, respectively).

### Immunohistological analysis

Sirius red staining was performed as described previously<sup>1</sup>.

Sections were permeabilized with PBS 0.1 % Triton X-100 for 5 minutes, and blocked with 3 % BSA in PBS for 1 hour. SMCs and macrophages were stained using primary antibodies to the SMC marker myosin heavy chain 11 (MYH11) (ABT293, Millipore, 3.2  $\mu$ g/ml) and to the myeloid marker calprotectin (27E10, Hycult, 2  $\mu$ g/ml). After a 2-hour incubation with primary antibodies in PBS plus 1% BSA and 0.05% Tween 20, sections were washed and incubated with biotinylated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch, 2  $\mu$ g/ml) for 2 hours. Biotinylated antibodies were revealed using streptavidin-Alexa-fluor conjugates (Molecular Probes, 2  $\mu$ g/ml).

Free cholesterol and neutral lipids were stained with filipin III from *Streptomyces filipinensis* (Sigma, 100  $\mu$ g/ml) and Bodipy 493/503 (Molecular Probes, 10  $\mu$ g/ml), respectively.

Slides were mounted with fluorescence mounting medium (Dako) and images were acquired with a Zeiss Axiovert microscope equipped with an ApoTome device for optical sectioning.

### **Impact of collagen on the expression of cholesterol metabolism-related genes in SMCs**

For RNA extraction, SMCs were seeded and grown to confluence in 6-well plates coated with fibronectin (50 µg/ml) supplemented or not with type I collagen (100 µg/ml). Cholesterol loading was achieved by incubating SMCs with free cholesterol (Sigma-Aldrich 30 µg/ml) diluted in DMEM at 2 mg/ml fatty acid-free BSA (Sigma-aldrich) for 24 hours at 37°C.

### **Analysis of gene expression by RT-PCR**

Intimal lesions and medial layers from atheromatous aortas were separated by dissection and pulverized independently using a liquid nitrogen freezer mill (SPEX CertiPrep 6870). Healthy aortic segments without intimal lesions and after removal of the adventitia by dissection were used as controls. Approximately 50-100 mg of crushed powder per sample were used for RNA extraction. Total RNA was extracted from pulverized tissues and cultured SMCs using Trizol (Life Technologies, Saint-Aubin, France), and purified using the RNeasy mini kit (Qiagen, Les Ulis, France), according to the manufacturer's instructions. Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed using Maxima first strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany). Real-time PCR was performed on a CFX96 thermal cycler (Bio-Rad, Foster City, CA) using cDNA diluted at 1:40 in water. The amplification program was as follows : 1 cycle at 95°C for 7 minutes, 40 cycles at 95°C for 10 sec and 60°C for 40 sec, and 1 cycle at 65°C for 5 sec. Levels of mRNA were normalized to that of the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT).

The primers used are presented in Supplemental Table 1.

Samples were considered PCR negative and their relative mRNA levels were set at 0 when no amplification was detected within 40 cycles or when the size of the amplicons, determined by agarose gel electrophoresis, was different from that expected for the primers used. In that regard,

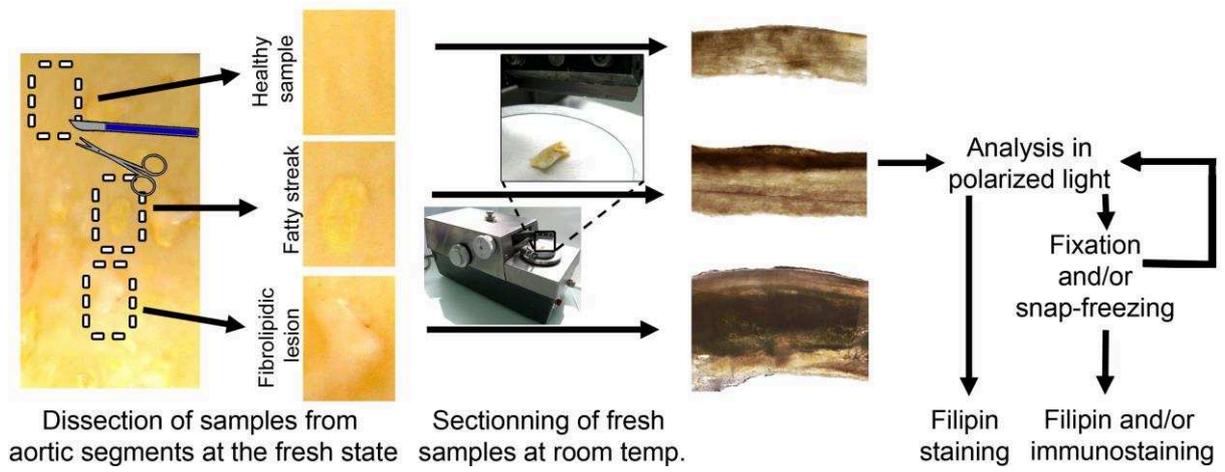
while all tissue and cell samples were positive for sterol O-acyltransferase 1 (SOAT1 or ACAT1), they were negative for ACAT2, indicating that ACAT1 is the main ACAT isoform expressed by SMCs.

### **Supplemental Reference**

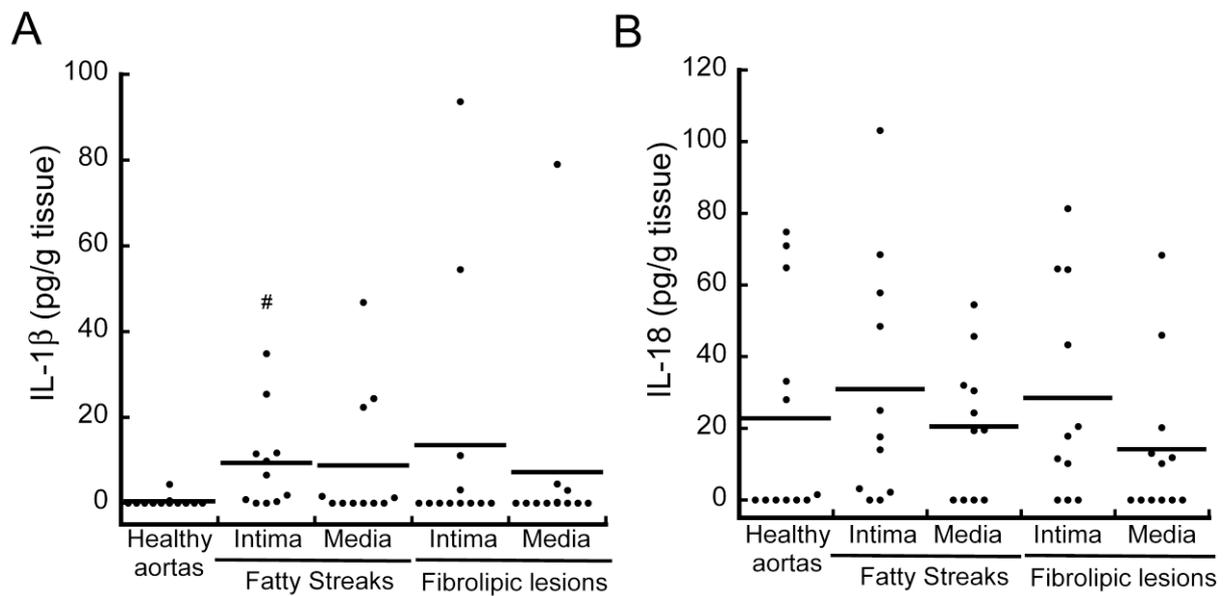
1. Junqueira LC, Cossermelli W and Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn.* 1978;41:267-74.

	<b>Forward Primer Sequence (5'-3')</b>	<b>Reverse Primer Sequence (5'-3')</b>
<b>HPRT1</b>	AGTTGAGAGATCATCTCCAC	TTGCTGACCTGCTGGATTAC
<b>SOAT1</b>	CGCTCGTGTTCTGGTCCTAT	CATTGAGCCAGCAGTGCAAA
<b>SOAT2</b>	GTGCCCTGGTGCTCTCTATC	ACGTTGAGTTCACCAGTCC
<b>NBR1</b>	GCAGAAAAGCAAAGGTTGCG	GGCATAACGGAGGTACAGGG
<b>ABCG1</b>	CTGGTGAACAACCCTCCAGT	ATCTGCTGGGTTGTGGTAGG
<b>NCEH1</b>	CTGGTGGAAATCTGGCTGCT	TTCACCATGACATAGCGGGG
<b>DCTN4</b>	TCTGATCAAACGGTCCCTGC	TCCTCACGCTGTGGTGTAAC
<b>COLLAGEN 1</b>	GGGATCCCTGGACCTAAAG	GGAACACCTCGCTCTCCA
<b>ABCA1</b>	AACAGTTTGTTTGTGGCCCTTTTG	AGTCCAGGCTGGGGTACTT

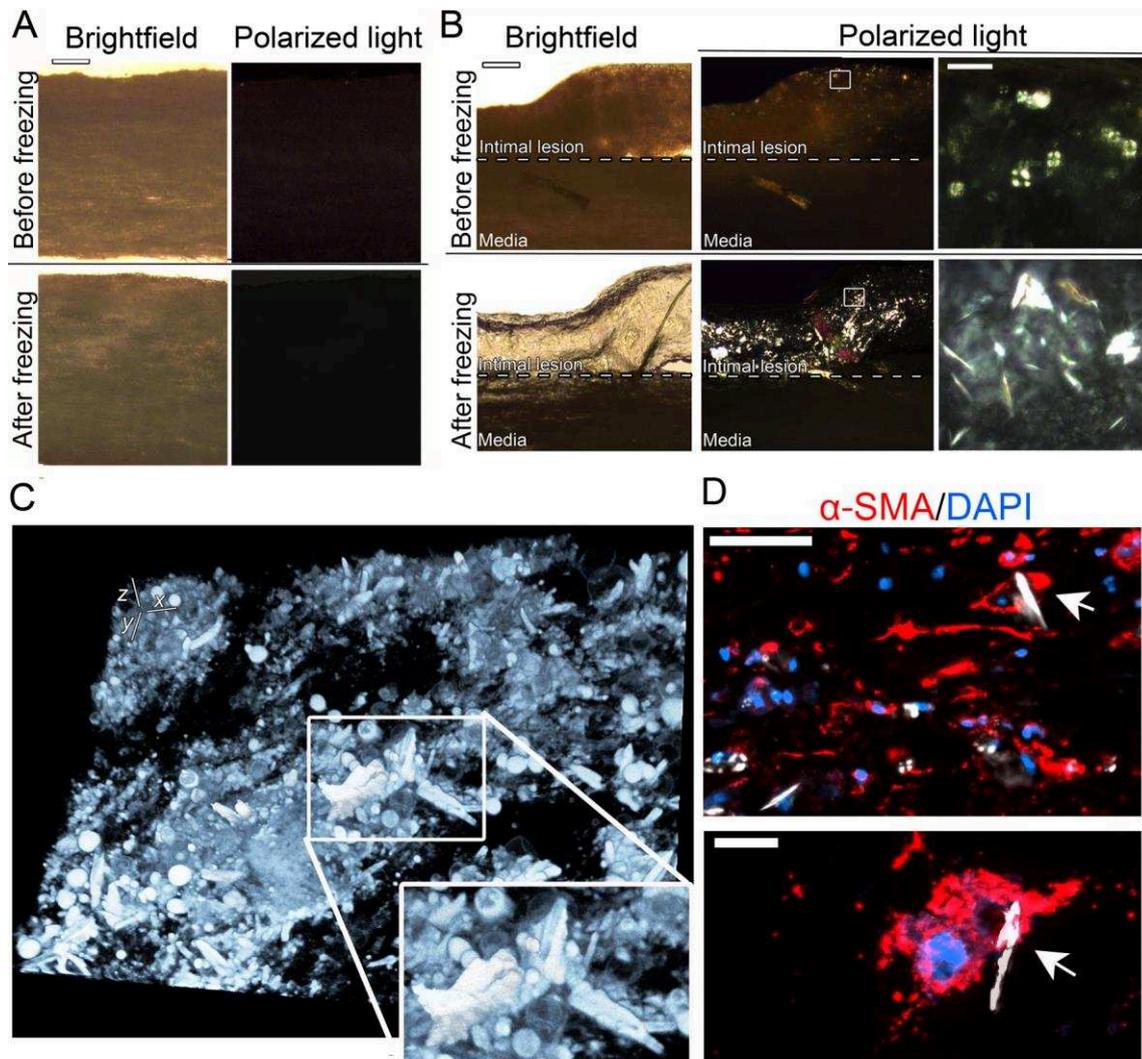
**Supplemental Table 1. List of primer sets used for real-time PCR.**



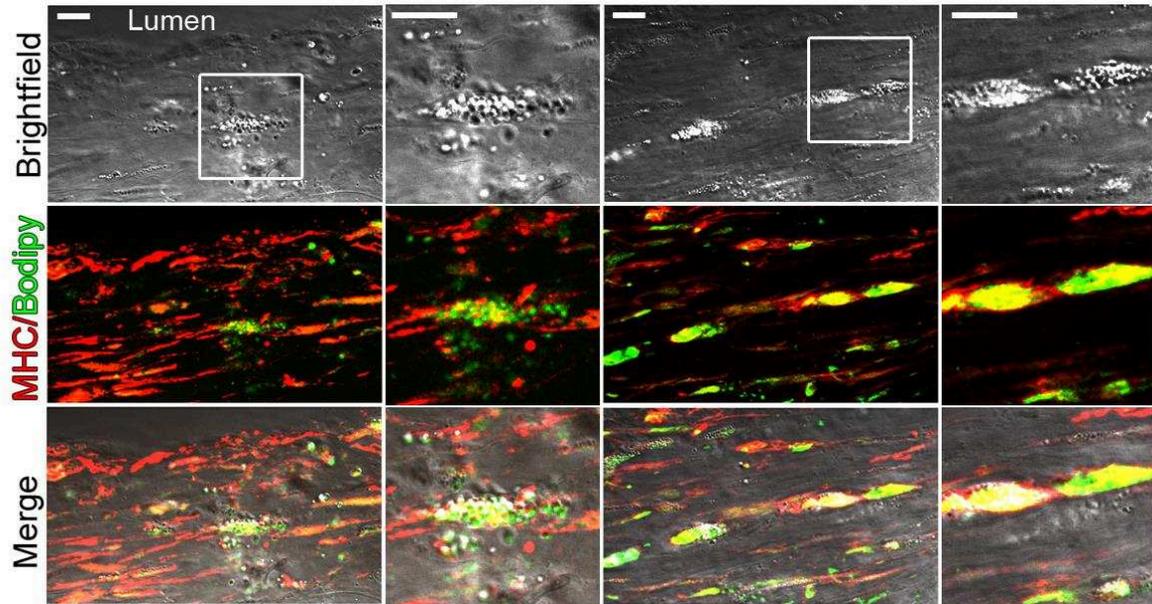
**Supplemental Figure 1. Preparation of fresh sections from healthy and early atheromatous aortic samples for histo-immunological analysis.**



**Supplemental Figure 2. Evolution of interleukin 1 $\beta$  and 18 levels in the early stages of human atheromatous disease.** Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (A) and 18 (IL-18) (B) content in conditioned medium of healthy aortas and intimal lesions and subjacent medial layers of human aortic segments bearing fatty streaks or fibrolipidic lesions. Each dot represents an independent sample. # indicates a significant difference from the healthy aorta group,  $p < 0.05$ .



**Supplemental Figure 3. Effect of snap freezing on the physical state of intralesional lipids.** Freshly collected human aortic segments were sectioned by hand and observed in brightfield and polarized light, before and after liquid nitrogen-induced snap freezing. **A-B.** Representative images of the snap freezing-induced changes in the amount and aspect of birefringent material in healthy (**A**) and early atheromatous (**B**) aortas. The right panels in **B** show high magnification views of the square areas. Bars = 100  $\mu\text{m}$  (left panels) and 20  $\mu\text{m}$  (right panels). **C.** 3D reconstruction of optical sections of filipin staining for free cholesterol in a frozen section of a human aorta bearing a fatty streak. The acquisition was made in the intimal lesion. Needle-shaped CCs are shown in the inset. Bars = 10  $\mu\text{m}$ . **D.** Representative images of freezing-induced artefactual intracellular CCs as detected by polarized light microscopy combined with fluorescent immunostaining for alpha smooth muscle actin ( $\alpha\text{-SMA}$ ). The arrows indicate needle-shape CCs emerging from intimal SMCs in a fatty streak. Bars = 50  $\mu\text{m}$  (upper panel), 10  $\mu\text{m}$  (lower panel).



**Supplemental Figure 4. Immunohistological characterization of human fibrolipidic lesions.** The localization and origin of foam cells in human fibrolipidic lesions was investigated in non-embedded fixed sections by light and fluorescence microscopy. The vast majority of foam cells identified by bodipy staining were found in the fibrous cap (columns 1 and 2) and at its interface with the atheromatous core (columns 3 and 4), and were positive for smooth muscle myosin heavy chain 11 (MHC) staining, indicating their smooth muscle cell nature. Bars = 20  $\mu$ m.

## Conclusion

Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer les mécanismes à l'origine de la cristallisation du cholestérol dans les lésions athéromateuses humaines.

Les analyses histologiques de coupes fraîches montrent que les cristaux solides de cholestérol (CCs) sont absents des stries lipidiques, et qu'ils apparaissent au stade de la lésion fibro-lipidique. Dans ces lésions, les CCs sont concentrés au niveau du cœur athéromateux, empaqueté dans un maillage de collagène. Proche du cœur athéromateux, des CCs sont également retrouvés dans la chape fibreuse au niveau de zones riches en inclusions lipidiques et CMLs mortes. Dans l'ensemble, ces observations suggèrent donc un lien entre transition fibreuse des lésions d'athérosclérose et formation de CCs dans les CML chargées en cholestérol.

En accord avec ces résultats, nos expériences *in vitro* montrent que les CMLs chargées en cholestérol produisent des cristaux solides et que ce processus s'accompagne d'une augmentation de la mortalité cellulaire. D'autre part, ce phénomène est considérablement augmenté par la présence de collagène dans le milieu extracellulaire, ainsi que par l'inhibition combinée de l'ACAT et de l'autophagie. L'estérification du cholestérol et l'autophagie apparaissent alors comme des mécanismes protecteurs contre la formation de CCs dans les CML spumeuses, alors que le collagène favorise ce phénomène. Nous avons par ailleurs montré que le collagène induit des changements dans le métabolisme du cholestérol. Il entraîne notamment la diminution de l'expression de p62, et l'augmentation de l'expression de NPC1, ces deux protéines étant impliqués dans le transport intracellulaire du cholestérol.

En résumé, ce travail met en évidence une apparition des CCs au stade de la lésion fibro-lipidique. Le modèle suggéré est que le collagène, en modifiant le métabolisme du cholestérol, favorise la cristallisation du cholestérol dans les CMLs spumeuses. L'autophagie apparaît avoir un rôle inhibiteur sur ce processus.

# DISCUSSION & PERSPECTIVES



Ce travail a porté sur l'étude des mécanismes impliqués dans le développement de l'athérosclérose. Deux aspects de la pathologie ont été explorés. Dans une première partie, nos recherches se sont axées sur l'implication du syndécan-1 dans l'athérogenèse et la modulation du phénotype de la CML. Ce processus ayant lieu lors des étapes précoces est déterminant dans l'évolution des lésions. Parallèlement, un deuxième volet a porté sur la formation des cristaux de cholestérol par les CML de la plaque. Ce phénomène plus tardif peut être à l'origine de la fragilisation des lésions et conduire à la rupture.

### **Caractéristiques des lésions d'athérosclérose humaines précoces**

Notre étude s'est basée sur l'analyse d'aortes humaines comportant des lésions non avancées d'athérosclérose. Alors que les stries lipidiques témoignent des événements survenant aux stades très précoces, les lésions fibrolipidiques, correspondant à un stade intermédiaire, dévoilent les remaniements qui conditionnent la structure de la plaque et donc sa fragilité. Ce matériel est ainsi particulièrement adapté à l'étude des mécanismes qui orientent l'évolution de la plaque.

Dans ces coupes d'aorte, nos marquages histologiques indiquent que la plupart des cellules présentes dans les lésions intimes s'avèrent être des CML, alors que les macrophages sont peu présents étant donné que le marquage de la calprotectine est négatif. Ces observations sont en accord avec les récentes études montrant qu'il s'agit du type cellulaire principal retrouvé dans les lésions précoces humaines, et cela même avant l'apparition de l'athérosclérose [8] [134]. Ainsi, bien que le rôle de la CML dans les stades précoces ait longtemps été sous-estimé, les dernières évidences montrent qu'elles jouent un rôle critique dès le début de la pathologie. Nos marquages dévoilent d'ailleurs une co-localisation du cholestérol avec les marqueurs de CML, suggérant qu'une grande partie des cellules spumeuses seraient dérivées de CML. Alors que les macrophages sont souvent considérés comme la principale source de cellules spumeuses, nos résultats confortent le récent postulat selon lequel une forte proportion de ces cellules est dérivée des CML.

### **Expression du syndécan-1 et implication dans la modulation du phénotype de la CML**

Dans les lésions athéromateuses précoces, nos résultats montrent que l'expression du syndécan-1 est graduellement augmentée, et qu'elle est plus marquée dans l'intima que la média. En parallèle, nous avons observé une co-localisation avec les CML identifiées par le marquage de la SM $\alpha$ -actine et de la myosine. En plus d'être présent au niveau des CML de la média, le syndécan-1 est surexprimé par les CML localisées au niveau de l'épaississement intimal des stries lipidiques, et dans la chape fibreuse

des lésions fibrolipiques. A l'inverse, le syndécan-1 n'est pas retrouvé au niveau des macrophages, ceux-ci n'étant que très peu détectés.

A notre connaissance, il n'existait que peu de publications évoquant l'expression du syndécan-1 dans les lésions d'athérosclérose. Deux études indépendantes, basées sur un modèle murin, mettent également en évidence une surexpression du syndécan-1 dans les lésions précoces. En revanche, contrairement à nos observations, leurs résultats indiquent une co-localisation du syndécan-1 avec les macrophages [135]. L'une de ces études démontre même le rôle fonctionnel du syndécan-1 sur les macrophages puisqu'il augmenterait leur motilité, favorisant la résolution de l'inflammation [115]. Comparé à un modèle animal, ces lésions humaines comportent des différences majeures. En effet, dans les modèles de souris couramment utilisés pour induire l'athérosclérose (*ApoE*<sup>-/-</sup> et *LDLR*<sup>-/-</sup>), peu de CML et protéoglycans sont retrouvés dans les lésions précoces, celles-ci étant principalement occupées par des macrophages spumeux. La prolifération de CML et la sécrétion de protéoglycans se fait après l'accumulation de macrophages, alors que l'inverse a lieu chez l'homme. Alors qu'un modèle animal ne serait pas adapté à cette étude, notre matériel permet donc de mettre en évidence le rôle précurseur de la CML dans l'athérosclérose.

Aux stades précoces de l'athérosclérose, la transition du phénotype de la CML a un rôle déterminant dans l'évolution des lésions. Les stries lipidiques apparaissent en effet suite à l'accumulation de CML qui ont internalisé des lipides comme les macrophages. A un stade plus avancé, les CML qui ont acquis un phénotype sécrétoire synthétisent de la MEC, formant une chape fibreuse qui entoure le cœur lipidique et donne naissance à la lésion fibrolipidique. Dans nos analyses histologiques, comme les CML sont localisées dans l'intima mais qu'elles expriment toujours des marqueurs de fonction contractile (SM  $\alpha$ -actine et myosine), elles pourraient être à un stade intermédiaire entre le phénotype contractile et synthétique. Le rôle potentiel du syndécan-1 dans la modulation phénotypique de la CML a été peu documenté, mais une récente étude suggère qu'il favoriserait le maintien de l'état différencié de la CML, notamment en augmentant l'expression des marqueurs de fonction contractile chez la souris [126].

Le syndécan-1 étant peu exprimé dans les CML humaines en condition basale, nous avons élaboré un vecteur lentiviral contenant la séquence codant le syndécan-1 afin de générer un modèle de CML surexprimant un syndécan-1 normal ou muté de façon stable. Les lentivirus présentent l'avantage d'infecter aussi bien des cellules quiescentes que des cellules en division, ce qui conduit à une forte efficacité de transduction comparée à une transfection classique. Cette méthode a permis d'obtenir des CML surexprimant à la membrane une forme mature du syndécan-1 portant les chaînes de glycosaminoglycane essentielles à sa fonction. Pour explorer les effets du syndécan-1 sur les caractéristiques de la CML, nous avons mesuré l'expression de la SM  $\alpha$ -actine, de la calponine, de la myosine, et du collagène de type I, dans les CML transduites à l'aide du vecteur pTRIP-SDC-1 en comparaison aux CML contrôles (pTRIP vide), après stimulation au TGF- $\beta$ 1. Cette cytokine est

présente dans l'environnement lésionnel et exerce diverses fonctions. Elle est notamment connue pour induire la surexpression des marqueurs de fonction contractile et des protéines de la MEC par les CML. Il est à noter qu'elle induit également l'expression du syndécan-1, ce qui implique que la surexpression du syndécan-1 est encore plus élevée dans nos cellules transduites lorsqu'elles sont traitées au TGF- $\beta$ 1. Nos résultats indiquent que le syndécan-1 amplifie la surexpression de la SM  $\alpha$ -actine, de la calponine, de la myosine, et du collagène I, induite par le TGF- $\beta$ 1. En accord avec la publication de Chaterji, le syndécan-1 semble donc favoriser le maintien du phénotype contractile et différencié de la CML. D'un autre côté, nos expériences montrent qu'il augmente la synthèse du collagène I. Ainsi, en amplifiant l'effet du TGF- $\beta$ 1, le syndécan-1 pourrait exercer divers effets sur la modulation du phénotype de la CML.

Dans l'ensemble, le rôle du TGF- $\beta$ 1 dans l'athérosclérose est plutôt controversé. D'un côté, il exercerait un effet protecteur en maintenant l'état différencié de la CML par l'inhibition de la migration et de la prolifération et l'induction des gènes des marqueurs contractiles. Il a également été montré qu'il atténue la formation de cellules spumeuses d'origine macrophagique [136]. D'autre part, il joue un rôle critique dans la stabilité de la plaque puisqu'il favorise la production de MEC par les CML de la chape fibreuse. Toutefois, d'autres études sont en faveur d'une activité pro-athérogène. Le TGF- $\beta$ 1 stimule notamment la synthèse de protéoglycans extracellulaires par les CML, contribuant à la rétention des LDL [137].

Ces résultats devront toutefois être confirmés, et complétés par l'étude des voies de signalisation impliquées. De précédentes études montrent que le syndécan-1 peut réguler de multiples effecteurs de la signalisation associée TGF- $\beta$ . En particulier, le syndécan-1 amplifie la voie TGF- $\beta$ /Smad dans un modèle de fibrose cardiaque induite par l'angiotensine II, entraînant l'augmentation de l'expression du collagène I par les fibroblastes cardiaques. C'est cette même voie de signalisation TGF- $\beta$ /Smad qui est impliquée dans l'athérosclérose et le dépôt de collagène par les CML. L'implication du syndécan-1 sur la régulation de cette voie de signalisation reste donc à élucider. D'autre part, Chaterji évoque dans sa publication la régulation de la voie Akt/ PKC- $\alpha$  par le syndécan-1, qui modifie l'expression des marqueurs de fonction contractile. Le syndécan-1 aurait donc le potentiel de réguler diverses voies de signalisation impliquées dans la physiologie de la CML.

Par ailleurs, le développement des constructions lentivirales nous permettra mieux comprendre les mécanismes d'action du syndécan-1. En effet, en plus de l'élaboration d'un plasmide codant pour la protéine sauvage, nous avons réalisé des constructions de syndécan-1 muté qui ont également été validés. Nous disposons de la protéine sans ectodomaine, de l'ectodomaine seul, et de la protéine dont les résidus sérine portant les chaînes de GAGs ont été mutés en alanine. Un lentivirus permettant la surexpression du syndécan-4 a également été produit. Ces outils permettront d'étudier l'implication

des chaînes héparane sulfate et chondroïtine sulfate dans la liaison du TGF- $\beta$ 1, qui est connu pour se lier à l'héparine, et d'étudier l'implication éventuelle du syndécan-4 dans cet effet.

Concernant l'expression du syndécan-1 dans les CML, elle pourrait être induite par de nombreux facteurs libérés dans le contexte lésionnel de l'athérosclérose. Les LDL et LDL oxydées sont particulièrement présentes dans l'environnement des lésions précoces. Toutefois, nos résultats montrent que le traitement des CML par différentes concentrations de LDL ou LDL oxydées n'induit pas de changement d'expression du syndécan-1. A l'inverse, il apparaît que le syndécan-4 est surexprimé dans les CML en réponse aux LDL et LDL oxydées. Cette observation complète les résultats d'une précédente étude montrant que le syndécan-4 est régulé dans les CML par les dérivées oxydées de l'acide linoléique, qui est l'acide gras oxydé majeur des LDL oxydées. Ces données indiquent des voies de régulation distinctes pour ces 2 syndécans, dont les effets qui ont été décrits dans la littérature apparaissent souvent opposés.

D'autres facteurs solubles présents dans les lésions précoces sont susceptibles d'induire l'expression du syndécan-1. Parmi-ceux-ci, le TGF- $\beta$  est connu pour réguler le syndécan-1 dans les CML, comme le montre une précédente étude ainsi que nos expériences [130]. D'autres facteurs incluent le PDGF [138] et l'angiotensine II [135] qui induisent l'expression du syndécan-1 dans d'autres types cellulaires. En plus de ces facteurs solubles, des profils de force distincts affectent le syndécan-1 dans les CML, notamment les contraintes mécaniques cycliques [124]. De ce fait, bien que notre étude montre que les LDL ne régulent pas le syndécan-1 dans les CML, une variété d'autres facteurs pourrait être responsable de sa surexpression dans les lésions.

Il serait également intéressant d'analyser le shedding du syndécan-1, qui est une autre forme de régulation de son activité. Le shedding par des MMPs peut en effet générer des ectodomaines solubles qui ont des effets paracrines ou bien d'inhibition compétitive. D'un autre côté, il peut inhiber l'activité du syndécan-1 en raison de la perte de l'ectodomaine. Comme le développement de l'athérosclérose s'accompagne d'une sécrétion de MMP-2 et MMP-9, on peut imaginer que ces métalloprotéinases participent à la régulation de l'activité du syndécan-1 au sein de la plaque. Néanmoins, nos résultats de dosage du syndécan-1 dans les milieux conditionnés de tissus n'ont pas mis en évidence de différence de diffusion de l'ectodomaine entre tissus sains et pathologiques. Il est probable que le syndécan-1 sheddé dans le tissu ne soit pas capable de diffuser hors de la matrice et des expériences complémentaires de co-marquage à l'aide d'anticorps dirigés contre l'ectodomaine d'une part et contre le domaine intracellulaire du syndécan-1 d'autre part seront nécessaires pour tester l'intégralité du protéoglycan dans le tissu.

Auparavant, d'autres études se sont intéressées au rôle du syndécan-1 en pathologie cardio-vasculaire. En particulier, le syndécan-1 est surexprimé dans la fibrose cardiaque et aurait un effet pro-fibrotique

favorisant la réparation tissulaire [113]. D'un autre côté, il inhibe la prolifération et la différenciation de la CML en réponse à une lésion vasculaire, ce qui limite l'hyperplasie intinale [125]. Une autre étude montre une augmentation de l'expression du syndécan-1 dans les anévrismes de l'aorte abdominale (AAA), qui s'accompagne d'une modulation des réponses inflammatoires. Dans ces pathologies, il est donc suggéré que le syndécan-1 compense des processus délétères en exerçant un rôle protecteur. Il est également à noter que des marquages effectués au laboratoire (non publié) suggèrent une surexpression dans les anévrismes de l'aorte thoracique (TAA), bien que son rôle n'ait pas été élucidé. Ainsi, les résultats de notre étude confortent l'hypothèse d'un rôle potentiellement important du syndécan-1 en pathologie cardiovasculaire, ces pathologies étant caractérisées par une forte composante inflammatoire et par un remodelage de la MEC associé à un environnement riche en facteurs de croissance. D'après nos résultats, le syndécan-1 pourrait donc également avoir un rôle protecteur dans le contexte lésionnel de l'athérosclérose, d'une part en maintenant l'état contractile de la CML, et d'autre part en favorisant la stabilisation de la chape fibreuse. Toutefois, de par ses propriétés, le syndécan-1 pourrait agir sur d'autres processus. Un des aspects que nous avons commencé à étudier est l'implication du syndécan-1 dans l'internalisation des lipoprotéines. Sur des CML transduites et chargées en LDL marquées, les observations montrent toutefois qu'il n'y a pas de co-localisation entre le syndécan-1 et les LDL et que la quantité de LDL incorporée mesurée par cytométrie en flux n'est pas modifiée par la surexpression de syndécan-1. Ces expériences nécessitent toutefois d'être approfondies. Il est possible que l'effet du syndécan-1 sur l'internalisation des lipoprotéines soit masqué par d'autres récepteurs comme le LDLR ou LRP. Afin de vérifier cette hypothèse, l'expression de ces récepteurs pourrait être invalidée dans les CML à l'aide d'ARN interférents, de manière concomitante à la surexpression de syndécan-1.

### **Formation des cristaux de cholestérol solides dans les lésions athéromateuses humaines**

Les cristaux de cholestérol solides sont fréquemment détectés dans les lésions avancées d'athérosclérose. Bien que des évidences suggèrent qu'ils favoriseraient la rupture de plaque, peu de données sont disponibles quant à leur origine. Une récente publication, basée sur un modèle de souris déficiente en ApoE, suggère que les CCs sont présents dès les temps précoces de l'athérogenèse [73]. L'étude ayant toutefois été réalisée à partir de coupes congelées, il est possible que la congélation ait conduit à une cristallisation artefactuelle du cholestérol. Il est en effet connu que sous l'influence de la congélation, les inclusions lipidiques sous forme de cristal liquide des tissus athéromateux peuvent former des cristaux solides [68]. Dans notre étude, les analyses histologiques ont donc été effectuées sur des coupes d'aortes humaines fraîches, non congelées ou incluses en paraffine, afin d'éviter la dissolution des cristaux provoquée par les solvants utilisés pour le déparaffinage. Contrairement aux

précédentes publications, nous montrons que les cristaux sont détectés au stade intermédiaire correspondant à la lésion fibro-lipidique, alors qu'ils sont absents des stries lipidiques.

La caractérisation des lésions fibrolipidiques montre que le cœur athéromateux, contenant la plupart des CCs, est emballé dans un maillage de collagène. Dans ces lésions sont également retrouvées des cellules spumeuses dont une large majorité est positive pour la MYH11, suggérant qu'il s'agit de CML. En accord avec les résultats de l'étude sur le syndécan-1, peu de macrophages sont présents, ce qui appuie le postulat d'une forte implication des CML dans l'accumulation de cholestérol. En plus d'être fréquemment retrouvées près des CML spumeuses, les régions riches en CCs sont associées à de l'ADN fragmenté et des restes de CML. Ces observations suggèrent donc que la formation de CCs est associée à un chargement en cholestérol et à la mort de CML, ainsi qu'à la présence de collagène.

In vitro, nos expériences confirment que les CML humaines chargées en cholestérol sont capables de produire des cristaux, et que ce processus est favorisé par l'inhibition combinée de l'autophagie et de l'ACAT, ainsi que par la présence de collagène. Nous avons également observé que la production de cristaux s'accompagne d'une mort cellulaire.

Les cycles d'estérification et d'hydrolyse du cholestérol sont essentiels au maintien de l'homéostasie du cholestérol. Ainsi, l'influence de l'inhibition de l'ACAT sur la formation de cristaux était attendue, étant donné qu'elle perturbe la balance entre CL et CE en forçant l'accumulation de CL intracellulaire en excès, ce qui favorise sa cristallisation. A l'inverse, peu de choses sont connues quant à l'autophagie des CML, bien que plusieurs études l'identifient comme un mécanisme protecteur censé favoriser la réparation cellulaire [139]. Il a également été montré in vitro que l'autophagie contribue à l'efflux de cholestérol dans des macrophages spumeux, limitant ainsi une accumulation de cholestérol délétère pour la cellule. Chez la souris, de récentes évidences indiquent qu'un défaut d'autophagie dans les CML accélérerait l'athérosclérose induite par un régime hypercholestérolémiant [140]. De même, une autre étude in vivo montre que le défaut d'autophagie conduit à une augmentation de l'athérosclérose associée à un contenu élevé de la plaque en CCs [141]. L'autophagie pourrait donc exercer un effet protecteur via sa capacité à diminuer la formation de CCs.

Associés à nos analyses histologiques, nos résultats menés in vitro supportent l'hypothèse selon laquelle le dépôt de collagène survenant au stade de la lésion fibro-lipidique pourrait déclencher la cristallisation du cholestérol. Afin de déterminer les mécanismes par lesquels le collagène pourrait exercer cet effet, nous avons analysé l'expression d'une variété de gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire. Nos données montrent que l'ajout de collagène de type I entraîne une diminution de l'expression de p62, un marqueur de l'induction de l'autophagie, ainsi que l'augmentation de l'expression de NPC1 et NPC2 qui sont impliqués dans le transport intracellulaire du cholestérol. Il apparaît donc que le collagène module l'expression de protéines impliquées dans l'autophagie et le trafic du cholestérol, ce qui pourrait expliquer son effet sur la formation des cristaux. En effet, NPC1 et NPC2 favorisent l'accumulation du CL en permettant sa libération à partir des

lysosomes. De son côté, p62 coopère avec la protéine NBR1 pour induire l'autophagie de cibles spécifiques. En accord avec les observations précédentes, la diminution de l'autophagie, ici provoqué par le collagène I, favoriserait la formation de CCs.

En plus d'être constaté *in vitro*, la diminution de l'expression de p62 associée à une surexpression de NPC1 est observée dans les lésions fibrolipidiques comparé aux stries lipidiques, ce qui renforce l'idée que l'enrichissement en collagène de type I est responsable des variations d'expression de ces gènes *in vivo*. Dans les lésions fibrolipidiques est également notée une augmentation de ABCA1 qui n'est pas reproduite *in vitro*. Il existerait probablement des facteurs autres que le collagène contribuant à moduler le métabolisme du cholestérol lors de la transition fibrolipidique. L'enrichissement du contenu de la plaque en cholestérol pourrait être l'un de ces facteurs, comme le chargement en cholestérol induit une augmentation de ABCA1 *in vitro*.

A notre connaissance, très peu de données étaient disponibles concernant l'influence du collagène sur le métabolisme du cholestérol. Une publication évoque toutefois une inhibition de la biosynthèse du cholestérol par le collagène fibrillaire dans les CML humaines. Cet effet passerait par une interaction du collagène avec les intégrines  $\alpha 2\beta 1$ , induisant la diminution de l'expression de la HMG-CoA reductase, enzyme clé de la synthèse du cholestérol [142]. Notre étude met ainsi en évidence l'effet du collagène sur d'autres acteurs impliqués dans le métabolisme cellulaire, en particulier dans le transport du cholestérol intracellulaire et l'autophagie qui ont un rôle déterminant dans la formation des CCs. Des études complémentaires seront toutefois nécessaires afin de déterminer les récepteurs et voies de signalisation impliquées.

Alors que notre étude est la première à relater la formation de cristaux dans des CML humaines, quelques autres s'étaient intéressés au même phénomène dans les macrophages. Comme dans ces études, nos observations montrent que les cristaux formés ont l'apparence d'aiguilles, correspondant à la forme typique contenue dans les tissus athéromateux et responsable de la fragilisation de la chape fibreuse. Par ailleurs, la plupart des cristaux formés semblent émerger des cellules alors que certains sont retrouvés dans le milieu de culture. Il est alors probable que dans les macrophages comme dans les CML, les cristaux se forment au niveau intracellulaire puis sont expulsés à l'extérieur de la cellule. Des études basées sur des modèles de macrophages spumeux ont également suggéré que les cristaux expulsés hors de la cellule continuaient de grossir par l'ajout de cholestérol provenant de débris cellulaires [83]. De plus, il a été proposé que les CCs provenaient de la cristallisation du cholestérol accumulé dans les lysosomes. Malgré les modèles proposés, la séquence des événements conduisant à la formation de cristaux n'a pas encore été élucidée. Il serait alors intéressant d'approfondir nos recherches pour étudier le site de nucléation ainsi que la cinétique de formation des cristaux dans les CML.

Précédemment, des études *in vitro* ont montré que la phagocytose de CCs s'accompagnait de l'activation de la voie de l'inflammasome NRLP3 dans des macrophages humains et murins [74] [73]. Dans ces études, la présence de CCs observés dans des lésions très précoces concorde avec l'apparition des cellules inflammatoires, suggérant que les CCs pourraient être responsables du déclenchement de l'inflammation. A l'inverse, nos analyses montrent que le niveau des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-18, qui sont des effecteurs de la voie NRLP3, ne varie pas significativement dans les stries lipidiques ni dans les lésions fibrolipidiques, comparé aux aortes saines. Nos résultats suggèrent donc que la formation de CCs au stade de la lésion fibrolipidique n'influence pas le contenu en cytokines pro-inflammatoires. Comme la plupart des cellules de nos lésions précoces humaines sont des CML, la quantité de monocytes/macrophages est probablement trop faible pour que la formation de CCs puisse influencer la production de IL-1 $\beta$  et IL-18.

En résumé, notre étude suggère que les CCs sont formés par les CML chargées en cholestérol au stade de la lésion fibrolipidique. L'estérification du cholestérol et l'autophagie apparaissent comme des mécanismes protecteurs contre la formation de CCs, alors que le collagène de type I accélérerait ce processus.

### **Syndécan-1 et interactions cellule-collagène : Implication potentielle sur la formation des cristaux**

Comme nous l'avons montré, la formation des cristaux de cholestérol est étroitement liée au chargement des CML en cholestérol et à la présence de collagène. Alors que le syndécan-1 ne semble pas jouer un rôle sur l'internalisation des LDL, nos observations suggèrent qu'il favorise la sécrétion de collagène de type I par les CML. Le syndécan-1 pourrait par conséquent participer à l'élaboration de la chape fibreuse entourant le cœur athéromateux, environnement propice à la formation des cristaux.

Par ailleurs, de précédentes études ont identifié le syndécan-1 comme un important régulateur de l'adhérence des cellules au collagène. Comme cela a été rapporté dans les cellules CHO le syndécan-1 pourrait favoriser la liaison au collagène par l'intermédiaire de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$ , déclenchant ainsi les voies de signalisation associées [143]. L'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  est un récepteur majeur du collagène, par ailleurs impliqué dans la biosynthèse du cholestérol par les CML [142]. Il est alors possible que l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  module d'autres processus métaboliques de la CML impliqués dans la formation des cristaux, comme le transport intracellulaire du cholestérol.

Ainsi, étant donné les effets potentiels du syndécan-1, d'une part sur la synthèse de collagène par les CML, d'autre part sur les interactions cellule-intégrine  $\alpha 2\beta 1$ , il serait intéressant d'explorer son influence sur le métabolisme du cholestérol et la formation des cristaux à l'aide des outils lentiviraux

que j'ai développés lors de ma thèse, ou des CML de souris déficientes dont nous disposons depuis peu au laboratoire.

## **Conclusion générale**

L'ensemble de ce travail permet d'ouvrir de nouvelles perspectives quant aux mécanismes impliquant la CML dans le développement des lésions d'athérosclérose. Jusqu'à maintenant, l'origine des CCs n'était pas élucidée malgré leur implication dans la fragilisation de la plaque. Notre étude montre que les CCs apparaissent au stade de la lésion fibrolipidique et qu'ils pourraient provenir de CML spumeuses entourés d'un environnement riche en collagène. Alors que la transition du phénotype de la CML a un rôle déterminant dans ce processus, nous avons identifié le syndécan-1 comme un acteur potentiel pouvant maintenir l'état contractile de la CML tout en favorisant l'expression de collagène.



**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**



- [1] H. C. Stary, "Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 20, no. 5, pp. 1177–1178, 2000.
- [2] H. C. Stary, A. B. Chandler, S. Glagov, J. R. Guyton, W. Insull, M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner, and R. W. Wissler, "A definition of Initial, Fatty streak, and Intermediate Lesions of Atherosclerosis," pp. 840–857, 1994.
- [3] P. Libby and P. Theroux, "Pathophysiology of coronary artery disease," *Circulation*, vol. 111, no. 25, pp. 3481–3488, 2005.
- [4] P. Libby, "The Molecular Mechanisms of the Thrombotic Complications of Atherosclerosis," *J Intern Med*, 2008.
- [5] J. F. Bentzon, F. Otsuka, R. Virmani, and E. Falk, "Mechanisms of plaque formation and rupture," *Circ. Res.*, vol. 114, no. 12, pp. 1852–1866, 2014.
- [6] Y. Nakashima, Y. X. Chen, N. Kinukawa, and K. Sueishi, "Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: Preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age," *Virchows Arch.*, vol. 441, no. 3, pp. 279–288, 2002.
- [7] H. C. Stary, "Lipid and macrophage accumulations in arteries of children and the development of atherosclerosis," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 72, no. 5 SUPPL., 2000.
- [8] Y. Nakashima, T. N. Wight, and K. Sueishi, "Early atherosclerosis in humans: Role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans," *Cardiovasc. Res.*, vol. 79, no. 1, pp. 14–23, 2008.
- [9] M. F. Khalil, W. D. Wagner, and I. J. Goldberg, "Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 12, pp. 2211–2218, 2004.
- [10] I. Tabas, K. J. Williams, and J. Borén, "Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: Update and therapeutic implications," *Circulation*, vol. 116, no. 16, pp. 1832–1844, 2007.
- [11] P. Fogelstrand and J. Borén, "Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis," *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, vol. 22, no. 1, pp. 1–7, 2012.
- [12] H. Yoshida and R. Kisugi, "Mechanisms of LDL oxidation.," *Clin. Chim. Acta.*, vol. 411, no. 23–24, pp. 1875–82, 2010.
- [13] A. Lusis, "Atherosclerosis," *Nature*, vol. 407, no. 6801, pp. 233–241, 2000.
- [14] C. K. Glass and J. L. Witztum, "Atherosclerosis : The Road Ahead Review," *Cell*, vol. 104, no. 4, pp. 503–516, 2001.
- [15] G. Caligiuri, "Rôle de l'immunité dans l'athérosclérose et dans les syndromes coronariens aigus," *Medecine/Sciences*, vol. 20, pp. 175–81, 2004.
- [16] P. Libby and P. Libby, "Inflammation in atherosclerosis.," *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 868–74, 2002.

- [17] S. F. Louis and P. Zahradka, "Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion," *Exp. Clin. Cardiol.*, vol. 15, no. 4, 2010.
- [18] S. Allahverdian, P. S. Pannu, and G. a. Francis, "Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation," *Cardiovasc. Res.*, vol. 95, no. 2, pp. 165–172, 2012.
- [19] J. X. Rong, M. Shapiro, E. Trogan, and E. a. Fisher, "Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 23, pp. 13531–13536, 2003.
- [20] S. Allahverdian and G. a. Francis, "Cholesterol homeostasis and high-density lipoprotein formation in arterial smooth muscle cells.," *Trends Cardiovasc. Med.*, vol. 20, no. 3, pp. 96–102, 2010.
- [21] E. R. Andreeva, I. M. Pugach, and A. N. Orekhov, "Subendothelial smooth muscle cells of human aorta express macrophage antigen in situ and in vitro.," *Atherosclerosis*, vol. 135, pp. 19–27, 1997.
- [22] K. Ninomiya, A. Takahashi, Y. Fujioka, Y. Ishikawa, and M. Yokoyama, "Transforming growth factor-beta signaling enhances transdifferentiation of macrophages into smooth muscle-like cells.," *Hypertens. Res.*, vol. 29, no. 4, pp. 269–76, 2006.
- [23] P. M. Yao and I. Tabas, "Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the Fas pathway," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 31, pp. 23807–23813, 2000.
- [24] J. L. Johnson, "Emerging regulators of vascular smooth muscle cell function in the development and progression of atherosclerosis," *Cardiovasc. Res.*, no. 1755–3245 (Electronic), pp. 452–460, 2014.
- [25] G. K. Owens, G. K. Owens, M. S. Kumar, M. S. Kumar, B. R. Wamhoff, and B. R. Wamhoff, "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease.," *Physiol. Rev.*, vol. 84, no. 3, pp. 767–801, 2004.
- [26] S. S. M. Rensen, P. a. F. M. Doevendans, and G. J. J. M. van Eys, "Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity.," *Neth. Heart J.*, vol. 15, no. 3, pp. 100–108, 2007.
- [27] D. M. Milewicz, C. S. Kwartler, C. L. Papke, E. S. Regalado, J. Cao, and A. J. Reid, "Genetic variants promoting smooth muscle cell proliferation can result in diffuse and diverse vascular diseases: evidence for a hyperplastic vasculomyopathy.," *Genet. Med.*, vol. 12, no. 4, pp. 196–203, 2010.
- [28] J. Miano, E. Olson, M. Periasamy, K. Ligon, and P. Cserjesi, "Smooth muscle myosin heavy chain exclusively marks the smooth muscle lineage during mouse embryogenesis," *Circ. Res.*, vol. 75, pp. 803–812, 1994.
- [29] J. E. Hungerford, G. K. Owens, W. S. Argraves, and C. D. Little, "Development of the aortic vessel wall as defined by vascular smooth muscle and extracellular matrix markers.," *Dev. Biol.*, vol. 178, no. 2, pp. 375–92, 1996.

- [30] L. Li, J. M. Miano, P. Cserjesi, and E. N. Olson, "SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis.," *Circ. Res.*, vol. 78, no. 2, pp. 188–95, 1996.
- [31] J. Malmström, H. Lindberg, C. Lindberg, C. Bratt, E. Wieslander, E.-L. Delander, B. Särnstrand, J. S. Burns, P. Mose-Larsen, S. Fey, and G. Marko-Varga, "Transforming growth factor-beta 1 specifically induce proteins involved in the myofibroblast contractile apparatus.," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 3, no. 5, pp. 466–77, 2004.
- [32] I. Manabe, M. Kurabayashi, Y. Shimomura, M. Kuro-o, N. Watanabe, M. Watanabe, M. Aikawa, T. Suzuki, Y. Yazaki, and R. Nagai, "Isolation of the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb/NMHC-B) gene and characterization of its 5'-flanking region.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 239, no. 239, pp. 598–605, 1997.
- [33] T. Yoshida and G. K. Owens, "Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity," *Circ. Res.*, vol. 96, no. 3, pp. 280–291, 2005.
- [34] W. T. Gerthoffer, "Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration," *Circ. Res.*, vol. 100, no. 5, pp. 607–621, 2007.
- [35] P. Lacolley, V. Regnault, A. Nicoletti, Z. Li, and J. B. Michel, "The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: A cell that can take on multiple roles," *Cardiovasc. Res.*, vol. 95, no. 2, pp. 194–204, 2012.
- [36] Kolb, R. Vranckx, J. B. Michel, and O. Meilhac, "The phosphatidylserine receptor mediates phagocytosis by vascular smooth muscle cells.," *J. Pathol.*, 2007.
- [37] A. C. Doran, N. Meller, and C. a. McNamara, "Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, no. 5, pp. 812–819, 2008.
- [38] E. W. Raines and N. Ferri, "Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease.," *J. Lipid Res.*, vol. 46, no. 6, pp. 1081–1092, 2005.
- [39] D. C. Macleod, B. H. Strauss, M. D. E. Jong, J. Escaned, V. a Umans, R. V. a N. Suylen, A. Verkerk, P. I. M. J. D. E. Feyter, and P. W. Serruys, "Proliferation a s t Restenotic Lesions t a ell atria y thesis of not ary At her sclerotic a," no. I, 1994.
- [40] A. C. Newby, "Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates.," *Cardiovasc. Res.*, vol. 69, no. 3, pp. 614–24, 2006.
- [41] A. Trion and A. Van Der Laarse, "Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis," *Am. Heart J.*, vol. 147, no. 5, pp. 808–814, 2004.
- [42] M. R. Alexander and G. K. Owens, "Epigenetic Control of Smooth Muscle Cell Differentiation and Phenotypic Switching in Vascular Development and Disease," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 74, no. 1, pp. 13–40, 2012.
- [43] L. Li, D. K. Blumenthal, C. M. Terry, Y. He, M. L. Carlson, K. Alfred, S. L. City, S. L. City, and S. L. City, "Smooth Muscle Cells : Molecular Basis for Differential Effects of," vol. 112, no. 1, pp. 289–298, 2015.

- [44] S. M. S. Pasithorn A. Suwanabol, X. Shi, F. Zhang, D. Yamanouchi, D. Roenneburg, B. Liu, and K. C. Kent, "TGF- $\beta$  increases vascular smooth muscle cell proliferation through the Smad3 and ERK MAPK pathways," *J Vasc Surg*, vol. 56, no. 2, pp. 446–454, 2012.
- [45] J. a Beamish, P. He, K. Kottke-Marchant, and R. E. Marchant, "Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering.," *Tissue Eng. Part B. Rev.*, vol. 16, no. 5, pp. 467–491, 2010.
- [46] P. Tran, K. Tran-lundmark, R. Soininen, K. Tryggvason, J. Thyberg, and U. Hedin, "Increased Intimal Hyperplasia and Smooth Muscle Cell Proliferation in Transgenic Mice With Heparan Sulfate – Deficient Perlecan," *Circ. Res.*, pp. 550–558, 2004.
- [47] H. Hao, G. Gabbiani, and M. L. Bochaton-Piallat, "Arterial smooth muscle cell heterogeneity: Implications for atherosclerosis and restenosis development," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 23, no. 9, pp. 1510–1520, 2003.
- [48] T. Ichii, H. Koyama, S. Tanaka, S. Kim, a Shioi, Y. Okuno, E. W. Raines, H. Iwao, S. Otani, and Y. Nishizawa, "Fibrillar collagen specifically regulates human vascular smooth muscle cell genes involved in cellular responses and the pericellular matrix environment.," *Circ. Res.*, vol. 88, no. 5, pp. 460–7, 2001.
- [49] a Tedgui, N. Bardy, and B. Lévy, "Transmission des signaux mécaniques dans les cellules vasculaires," *Médecine/Sciences*, vol. 13, no. 6–7, p. 790, 2012.
- [50] C. J. O'Callaghan and B. Williams, "Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta(1).," *Hypertension*, vol. 36, no. 3, pp. 319–324, 2000.
- [51] M. J. Qu, B. Liu, H. Q. Wang, Z. Q. Yan, B. R. Shen, and Z. L. Jiang, "Frequency-dependent phenotype modulation of vascular smooth muscle cells under cyclic mechanical strain," *J. Vasc. Res.*, vol. 44, no. 5, pp. 345–353, 2007.
- [52] J. H. Haga, Y.-S. J. Li, and S. Chien, "Molecular basis of the effects of mechanical stretch on vascular smooth muscle cells.," *J. Biomech.*, vol. 40, no. 5, pp. 947–960, 2007.
- [53] Z. Wang, D.-Z. Wang, G. C. T. Pipes, and E. N. Olson, "Myocardin is a master regulator of smooth muscle gene expression.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 12, pp. 7129–7134, 2003.
- [54] D. Gomez and G. K. Owens, "Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis," *Cardiovasc. Res.*, vol. 95, no. 2, pp. 156–164, 2012.
- [55] T. Yoshida, "Myocardin and Prx1 Contribute to Angiotensin II-Induced Expression of Smooth Muscle -Actin," *Circ. Res.*, vol. 94, no. 8, pp. 1075–1082, 2004.
- [56] S. Sinha, D. Iyer, and A. Granata, "Embryonic origins of human vascular smooth muscle cells: implications for in vitro modeling and clinical application.," *Cell Mol Life Sci*, p. Epub, 2014.
- [57] M. W. Majesky, "Developmental basis of vascular smooth muscle diversity," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 27, no. 6, pp. 1248–1258, 2007.

- [58] a. C. Groot, M. C. DeRuiter, M. Bergwerff, and R. E. Poelmann, "Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 19, no. 7, p. 1589, 1999.
- [59] R. Virmani, F. D. Kolodgie, A. P. Burke, A. V. Finn, H. K. Gold, T. N. Tulenko, S. P. Wrenn, and J. Narula, "Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: Angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 25, no. 10, pp. 2054–2061, 2005.
- [60] J. B. Michel, R. Virmani, E. Arbustini, and G. Pasterkamp, "Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability," *Eur. Heart J.*, vol. 32, no. 16, pp. 1977–1985, 2011.
- [61] R. Virmani, A. P. Burke, A. Farb, and F. D. Kolodgie, "Pathology of the Vulnerable Plaque," *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 47, no. 8, pp. C13–C18, 2006.
- [62] A. Leclercq, X. Houard, M. Philippe, V. Ollivier, U. Sebbag, O. Meilhac, and J.-B. Michel, "Involvement of intraplaque hemorrhage in atherothrombosis evolution via neutrophil protease enrichment," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 82, no. 6, pp. 1420–1429, 2007.
- [63] F. D. Kolodgie, H. K. Gold, A. P. Burke, D. R. Fowler, H. S. Kruth, D. K. Weber, A. Farb, L. J. Guerrero, M. Hayase, R. Kutys, J. Narula, A. V. Finn, and R. Virmani, "Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 349, no. 24, pp. 2316–2325, 2003.
- [64] G. S. Abela, "Cholesterol crystals piercing the arterial plaque and intima trigger local and systemic inflammation," *J. Clin. Lipidol.*, vol. 4, no. 3, pp. 156–164, 2010.
- [65] S. S. Katz, G. G. Shipley, and D. M. Small, "Physical chemistry of the lipids of human atherosclerotic lesions. Demonstration of a lesion intermediate between fatty streaks and advanced plaques," *J. Clin. Invest.*, vol. 58, no. 1, pp. 200–211, 1976.
- [66] Y. Hata, J. Hower, and W. Insull, "Cholesteryl ester-rich inclusions from human aortic fatty streak and fibrous plaque lesions of atherosclerosis," *Am. J. Pathol.*, vol. 75, no. 3, pp. 423–454, 1974.
- [67] P. D. Lang and W. Insull, "Lipid droplets in atherosclerotic fatty streaks of human aorta," *J. Clin. Invest.*, vol. 49, no. 8, pp. 1479–88, 1970.
- [68] Stewart GT, "Liquid crystals of lipid in normal and atheromatous tissue," *Nature*, 1959.
- [69] G. S. Abela, K. Aziz, A. Vedre, D. R. Pathak, J. D. Talbott, and J. DeJong, "Effect of Cholesterol Crystals on Plaques and Intima in Arteries of Patients With Acute Coronary and Cerebrovascular Syndromes," *Am. J. Cardiol.*, vol. 103, no. 7, pp. 959–968, 2009.
- [70] G. S. Abela and K. Aziz, "Cholesterol crystals cause mechanical damage to biological membranes: a proposed mechanism of plaque rupture and erosion leading to arterial thrombosis," *Clin. Cardiol.*, vol. 28, no. 9, pp. 413–420, 2005.
- [71] A. Grebe and E. Latz, "Cholesterol crystals and inflammation," *Curr. Rheumatol. Rep.*, vol. 15, no. 3, p. 313, Mar. 2013.

- [72] S. M. Nidorf, J. W. Eikelboom, and P. L. Thompson, "Targeting cholesterol crystal-induced inflammation for the secondary prevention of cardiovascular disease," *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, vol. 19, no. 1, pp. 45–52, 2014.
- [73] P. Duewell, H. Kono, K. J. Rayner, C. M. Sirois, F. G. Bauernfeind, G. S. Abela, L. Franchi, G. Nuñez, T. Espevik, E. Lien, K. a Fitzgerald, K. L. Rock, J. Moore, S. D. Wright, V. Hornung, and E. Latz, "NLRP3 inflammasome are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals that form early in disease," vol. 464, no. 7293, pp. 1357–1361, 2010.
- [74] K. Rajamäki, J. Lappalainen, K. Öörni, E. Välimäki, S. Matikainen, P. T. Kovanen, and K. K. Eklund, "Cholesterol Crystals Activate the NLRP3 Inflammasome in Human Macrophages: A Novel Link between Cholesterol Metabolism and Inflammation," *PLoS One*, vol. 5, no. 7, p. e11765, 2010.
- [75] A. Vedre, D. R. Pathak, M. Crimp, C. Lum, M. Koochesfahani, and G. S. Abela, "Physical factors that trigger cholesterol crystallization leading to plaque rupture," *Atherosclerosis*, vol. 203, no. 1, pp. 89–96, 2009.
- [76] Goedeke, "Regulation of cholesterol homeostasis," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 368, no. 1–2, pp. 1–16, 2013.
- [77] T.-Y. Chang, C. C. Y. Chang, N. Ohgami, and Y. Yamauchi, "Cholesterol Sensing, Trafficking, and Esterification," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 22, no. 1, pp. 129–157, 2006.
- [78] X.-H. Yu, Y.-C. Fu, D.-W. Zhang, K. Yin, and C.-K. Tang, "Foam cells in atherosclerosis," *Clin. Chim. Acta*, vol. 424, pp. 245–252, 2013.
- [79] X. Kedi, Y. Ming, W. Yongping, Y. Yi, and Z. Xiaoxiang, "Free cholesterol overloading induced smooth muscle cells death and activated both ER- and mitochondrial-dependent death pathway," *Atherosclerosis*, vol. 207, no. 1, pp. 123–130, 2009.
- [80] I. Tabas, G. Garcia-Cardena, and G. K. Owens, "The cell biology of disease: Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis," *J. Cell Biol.*, vol. 209, no. 1, pp. 13–22, 2015.
- [81] K. Xu, Y. Yang, M. Yan, J. Zhan, X. Fu, and X. Zheng, "Autophagy plays a protective role in free cholesterol overload-induced death of smooth muscle cells.," *J. Lipid Res.*, vol. 51, no. 9, pp. 2581–2590, 2010.
- [82] R. K. Tangirala, W. G. Jerome, N. L. Jones, D. M. Small, W. J. Johnson, J. M. Glick, F. H. Mahlberg, and G. H. Rothblat, "Formation of cholesterol monohydrate crystals in macrophage-derived foam cells.," *J. Lipid Res.*, vol. 35, no. 1, pp. 93–104, 1994.
- [83] G. Kellner-Weibel, P. G. Yancey, W. G. Jerome, T. Walser, R. P. Mason, M. C. Phillips, and G. H. Rothblat, "Crystallization of free cholesterol in model macrophage foam cells.," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 19, no. 8, pp. 1891–1898, 1999.
- [84] E. Tkachenko, J. M. Rhodes, and M. Simons, "Syndecans: New kids on the signaling block," *Circ. Res.*, vol. 96, no. 5, pp. 488–500, 2005.
- [85] Y. H. F. Teng, R. S. Aquino, and P. W. Park, "Molecular functions of syndecan-1 in disease," *Matrix Biol.*, vol. 31, no. 1, pp. 3–16, 2012.

- [86] K. Lambaerts, S. a Wilcox-adelman, and P. Zimmermann, "The signalling mechanisms of syndecan-1 heparan sulphate proteoglycans," *Curr Opin Cell Biol*, vol. 21, no. 5, pp. 662–669, 2009.
- [87] V. K. Asundi and D. J. Carey, "Self-association of N-syndecan (syndecan-3) core protein is mediated by a novel structural motif in the transmembrane domain and ectodomain flanking region," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 44, pp. 26404–26410, 1995.
- [88] Y. Choi, H. Chung, H. Jung, J. R. Couchman, and E. S. Oh, "Syndecans as cell surface receptors: Unique structure equates with functional diversity," *Matrix Biol.*, vol. 30, no. 2, pp. 93–99, 2011.
- [89] X. Xian, S. Gopal, and J. R. Couchman, "Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix," *Cell Tissue Res.*, vol. 339, no. 1, pp. 31–46, 2010.
- [90] T. Kinnunen, M. Kaksonen, J. Saarinen, N. Kalkkinen, H. B. Peng, and H. Rauvala, "Cortactin-Src Kinase Signaling Pathway Is Involved in N-syndecan-dependent Neurite Outgrowth," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 17, pp. 10702–10708, 1998.
- [91] F. Granés, J. M. Urena, N. Rocamora, and S. Vilaró, "Ezrin links syndecan-2 to the cytoskeleton," *J. Cell Sci.*, vol. 113 ( Pt 7, pp. 1267–76, 2000.
- [92] Y. Gao, M. Li, W. Chen, and M. Simons, "Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration," *J. Cell. Physiol.*, vol. 184, no. 3, pp. 373–379, 2000.
- [93] C. Mundhenke, K. Meyer, S. Drew, and A. Friedl, "Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas," *Am. J. Pathol.*, vol. 160, no. 1, pp. 185–194, 2002.
- [94] X. Li, J. Herz, and D. Monard, "Activation of ERK signaling upon alternative protease nexin-1 internalization mediated by syndecan-1," *J. Cell. Biochem.*, vol. 99, no. 3, pp. 936–951, 2006.
- [95] L. Maillard, N. Saito, H. Hlawaty, V. Friand, N. Suffee, F. Chmilewsky, O. Haddad, C. Laguillier, E. Guyot, T. Ueyama, O. Oudar, A. Sutton, and N. Charnaux, "RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKC $\alpha$  signaling pathway," *Biol. Open*, vol. 3, no. 10, pp. 995–1004, 2014.
- [96] T. Manon-Jensen, Y. Itoh, and J. R. Couchman, "Proteoglycans in health and disease: The multiple roles of syndecan shedding," *FEBS J.*, vol. 277, no. 19, pp. 3876–3889, 2010.
- [97] T. Manon-Jensen, H. a B. Multhaupt, and J. R. Couchman, "Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains," *FEBS J.*, vol. 280, no. 10, pp. 2320–2331, 2013.
- [98] E. J. Nam and P. W. Park, "Shedding of Cell Membrane-Bound Proteoglycans," *Methods Mol Bio*, vol. 836, pp. 1–14, 2012.
- [99] H. Joensuu, A. Anttonen, M. Eriksson, R. Makitaro, H. Alfthan, V. Kinnula, and S. Leppa, "Soluble Syndecan-1 and Serum Basic Fibroblast Growth Factor Are New Prognostic Factors in Lung Cancer," *Cancer Res.*, vol. 62(18), pp. 5210–5217, 2002.

- [100] A. N. Alexopoulou, H. a B. Multhaupt, and J. R. Couchman, "Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 39, no. 3, pp. 505–528, 2007.
- [101] M. A. Stepp, H. E. Gibson, P. H. Gala, D. D. S. Iglesia, A. Pajoohesh-Ganji, S. Pal-Ghosh, M. Brown, C. Aquino, A. M. Schwartz, O. Goldberger, M. T. Hinkes, and M. Bernfield, "Defects in keratinocyte activation during wound healing in the syndecan-1-deficient mouse.," *J. Cell Sci.*, vol. 115, no. Pt 23, pp. 4517–4531, 2002.
- [102] M. Floer, M. Götte, M. K. Wild, J. Heidemann, E. S. Gassar, W. Domschke, L. Kiesel, A. Luegering, and T. Kucharzik, "Enoxaparin improves the course of dextran sodium sulfate-induced colitis in syndecan-1-deficient mice.," *Am. J. Pathol.*, vol. 176, no. 1, pp. 146–157, 2010.
- [103] Q. Li, P. W. Park, C. L. Wilson, and W. C. Parks, "Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury," *Cell*, vol. 111, no. 5, pp. 635–646, 2002.
- [104] L. J. Marshall, L. S. Ramdin, T. Brooks, P. C. DPhil, and J. K. Shute, "Plasminogen activator inhibitor-1 supports IL-8-mediated neutrophil transendothelial migration by inhibition of the constitutive shedding of endothelial IL-8/heparan sulfate/syndecan-1 complexes," *J. Immunol.*, vol. 171, no. 0022–1767 (Print), pp. 2057–2065, 2003.
- [105] a Anttonen, P. Heikkilä, M. Kajanti, M. Jalkanen, and H. Joensuu, "High syndecan-1 expression is associated with favourable outcome in squamous cell lung carcinoma treated with radical surgery.," *Lung Cancer*, vol. 32, no. 3, pp. 297–305, 2001.
- [106] A. Juuti, S. Nordling, J. Lundin, J. Louhimo, and C. Haglund, "Syndecan-1 Expression - A Novel Prognostic Marker in Pancreatic Cancer," *Oncology*, vol. 68, no. 2–3, pp. 97–106, 2005.
- [107] T. Ishikawa and R. H. Kramer, "Sdc1 Negatively Modulates Carcinoma Cell Motility and Invasion," *Exp. Cell Res.*, vol. 316, no. 6, pp. 951–965, 2010.
- [108] P. W. B. Derksen, R. M. J. Keehnen, L. M. Evers, M. H. J. Van Oers, M. Spaargaren, and S. T. Pals, "Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma," *Blood*, vol. 99, no. 4, pp. 1405–1410, 2002.
- [109] Y. B. Khotskaya, Y. Dai, J. P. Ritchie, V. MacLeod, Y. Yang, K. Zinn, and R. D. Sanderson, "Syndecan-1 is required for robust growth, vascularization, and metastasis of myeloma tumors in vivo," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 38, pp. 26085–26095, 2009.
- [110] H. Sun, I. M. Berquin, R. T. Owens, J. T. O'Flaherty, and I. J. Edwards, "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated up-regulation of syndecan-1 by n-3 fatty acids promotes apoptosis of human breast cancer cells," *Cancer Res*, vol. 68, no. 8, pp. 2912–2919, 2008.
- [111] A. Purushothaman, T. Uyama, F. Kobayashi, S. Yamada, K. Sugahara, A. C. Rapraeger, and R. D. Sanderson, "Heparanase-enhanced shedding of syndecan-1 by myeloma cells promotes endothelial invasion and angiogenesis," *Blood*, vol. 115, no. 12, pp. 2449–2457, 2010.
- [112] D. M. Beauvais, B. J. Ell, A. R. McWhorter, and A. C. Rapraeger, "Syndecan-1 regulates alphavbeta3 and alphavbeta5 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor.," *J. Exp. Med.*, vol. 206, no. 3, pp. 691–705, 2009.

- [113] M. W. M. Schellings, D. Vanhoutte, G. C. Van Almen, M. Swinnen, J. J. G. Leenders, N. Kubben, R. E. W. Van Leeuwen, L. Hofstra, S. Heymans, and Y. M. Pinto, "Syndecan-1 amplifies angiotensin II-induced cardiac fibrosis," *Hypertension*, vol. 55, no. 2, pp. 249–256, 2010.
- [114] J. Wen, P. Wang, S. V. Smith, C. a. Haller, and E. L. Chaikof, "Syndecans are differentially expressed during the course of aortic aneurysm formation," *J. Vasc. Surg.*, vol. 46, no. 5, pp. 1014–1025, 2007.
- [115] J. Xiao, J. Angsana, J. Wen, S. V. Smith, and P. W. Park, "Syndecan-1 displays a protective role in aortic aneurysm formation by modulating T-Cell-mediated responses," *ATVB*, vol. 487, no. 7405, pp. 109–113, 2013.
- [116] G. L. Tang and K. Weitz, "Impaired arteriogenesis in syndecan-1<sup>-/-</sup> mice," *J. Surg. Res.*, vol. 193, no. 1, pp. 22–27, 2015.
- [117] K. I. Stanford, J. R. Bishop, E. M. Foley, J. C. Gonzales, I. R. Niesman, J. L. Witztum, and J. D. Esko, "Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 119, no. 11, pp. 3236–3245, 2009.
- [118] K. J. Williams and K. Chen, "Recent insights into factors affecting remnant lipoprotein uptake.," *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 21, no. 3, pp. 218–228, 2010.
- [119] R. W. Mahley and Y. Huang, "Atherogenic remnant lipoproteins: Role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing," *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 1, pp. 94–98, 2007.
- [120] J. R. Bishop, K. I. Stanford, and J. D. Esko, "Heparan sulfate proteoglycans and triglyceride-rich lipoprotein metabolism.," *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 19, no. 3, pp. 307–313, 2008.
- [121] J. C. Gonzales, P. L. S. M. Gordts, E. M. Foley, and J. D. Esko, "Apolipoproteins e and AV mediate lipoprotein clearance by hepatic proteoglycans," *J. Clin. Invest.*, vol. 123, no. 6, pp. 2742–2751, 2013.
- [122] J. M. MacArthur, J. R. Bishop, K. I. Stanford, L. Wang, A. Bensadoun, J. L. Witztum, and J. D. Esko, "Liver heparan sulfate proteoglycans mediate clearance of triglyceride-rich lipoproteins independently of LDL receptor family members," *J. Clin. Invest.*, vol. 117, no. 1, pp. 153–164, 2007.
- [123] H. Wang, S. Moore, and M. Z. Alavi, "Expression of syndecan-1 in rabbit neointima following de-endothelialization by a balloon catheter," *Atherosclerosis*, vol. 131, no. 2, pp. 141–147, 1997.
- [124] Matheau A. Julien, C. a. Haller, P. Wang, J. Wen, and E. L. Chaikof, "Mechanical strain induces a persistent upregulation of syndecan-1 expression in smooth muscle cells," *J. Cell. Physiol.*, vol. 213, no. 2, pp. 440–444, 2007.
- [125] N. Fukai, R. D. Kenagy, L. Chen, L. Gao, G. Daum, and A. W. Clowes, "Syndecan-1: An inhibitor of arterial smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, no. 9, pp. 1356–1362, 2009.
- [126] S. Chaterji, C. H. Lam, D. S. Ho, D. C. Proske, and A. B. Baker, "Syndecan-1 regulates vascular smooth muscle cell phenotype," *PLoS One*, vol. 9, no. 2, 2014.

- [127] R. J. Randall and a Lewis, "The folin by oliver," *Readings*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, 1951.
- [128] M. Houston, M. a Julien, S. Parthasarathy, and E. L. Chaikof, "Oxidized linoleic acid regulates expression and shedding of syndecan-4," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 288, no. 2, pp. C458–66, 2005.
- [129] A. Bobik, "Transforming growth factor- $\beta$ s and vascular disorders," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, no. 8, pp. 1712–1720, 2006.
- [130] a. Schmidt, S. Lorkowski, D. Seidler, G. Breithardt, and E. Buddecke, "TGF- $\beta$ 1 generates a specific multicomponent extracellular matrix in human coronary SMC," *Eur. J. Clin. Invest.*, vol. 36, no. 7, pp. 473–482, 2006.
- [131] a J. J. North, M. Gimona, R. a a Cross, and J. V. V Small, "Calponin is localised in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells," *J. Cell Sci.*, vol. 107 ( Pt 3), pp. 437–444, 1994.
- [132] X. Guo and S.-Y. Chen, "Transforming growth factor- $\beta$  and smooth muscle differentiation.," *World J. Biol. Chem.*, vol. 3, no. 3, pp. 41–52, 2012.
- [133] N. Kalinina, "Smad Expression in Human Atherosclerotic Lesions: Evidence for Impaired TGF- $\beta$ /Smad Signaling in Smooth Muscle Cells of Fibrofatty Lesions," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 8, pp. 1391–1396, 2004.
- [134] S. Allahverdian, A. C. Chehroudi, B. M. McManus, T. Abraham, and G. a. Francis, "Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis," *Circulation*, vol. 129, no. 15, pp. 1551–1559, 2014.
- [135] W. Wang, C. a Haller, J. Wen, P. Wang, and E. L. Chaikof, "Decoupled syndecan 1 mRNA and protein expression is differentially regulated by angiotensin II in macrophages.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 214, no. 3, pp. 750–6, 2008.
- [136] C. A. Argmann, C. H. Van Den Diepstraten, C. G. Sawyez, J. Y. Edwards, R. A. Hegele, B. M. Wolfe, and M. W. Huff, "Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Inhibits Macrophage Cholesteryl Ester Accumulation Induced by Native and Oxidized VLDL Remnants," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 21, no. 12, pp. 2011–2018, 2001.
- [137] N. N. Singh and D. P. Ramji, "The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis.," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 17, no. 6, pp. 487–99, 2006.
- [138] W. W, "Cytokine regulation of syndecan-1 and -2 gene expression in human periodontal fibroblasts and osteoblasts.," *J. Periodontal Res.*, 2002.
- [139] J. K. Salabei and B. G. Hill, "Implications of autophagy for vascular smooth muscle cell function and plasticity," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 65, pp. 693–703, 2013.
- [140] M. Grootaert, P. da Costa Martins, N. Bitsch, I. Pintelon, G. De Meyer, W. Martinet, and D. Schrijvers, "Defective autophagy in vascular smooth muscle cells accelerates senescence and promotes neointima formation and atherogenesis," *Autophagy*, vol. 11, no. 11, pp. 2014–2032, 2015.

- [141] B. Razani, C. Feng, T. Coleman, R. Emanuel, H. Wen, S. Hwang, J. P. Ting, H. W. Virgin, M. B. Kastan, and C. F. Semenkovich, "Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression," *Cell Metab.*, vol. 15, no. 4, pp. 534–544, 2012.
- [142] N. Ferri, E. Roncalli, L. Arnaboldi, S. Fenu, O. Andrukhova, S. Aharinejad, M. Camera, E. Tremoli, and A. Corsini, "Fibrillar collagen inhibits cholesterol biosynthesis in human aortic smooth muscle cells," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 29, no. 10, pp. 1631–1637, 2009.
- [143] K. Vuoriluoto, J. Jokinen, K. Kallio, M. Salmivirta, J. Heino, and J. Ivaska, "Syndecan-1 supports integrin  $\alpha 2\beta 1$ -mediated adhesion to collagen," *Exp. Cell Res.*, vol. 314, no. 18, pp. 3369–3381, 2008.



