



Université
de Toulouse

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : *Biologie Cellulaire*

Présentée et soutenue par *MULLER Carole*
Le 28 Mars 2011

Titre : *Apoptose, Stress du Réticulum Endoplasmique et Autophagie induits par les LDL oxydées dans les cellules vasculaires. Rôle protecteur des HDL et de chaperones du RE.*

JURY

M. CRISTOL Jean-Paul - Professeur Université Montpellier 1
M. GADEAU Alain-Pierre - Directeur de Recherche INSERM U828
M. MEILHAC Olivier - Directeur de Recherche INSERM U698
Mme. NEGRE-SALVAYRE Anne - Directrice de Recherche INSERM U1048
M. SALVAYRE Robert - Professeur Université Toulouse Paul Sabatier
Mme. VINDIS Cécile - Chargée de recherche INSERM U1048

Ecole doctorale : *Biologie-Santé-Biotechnologies*
Unité de recherche : *UMR UPS / INSERM 1048*
Directeur(s) de Thèse : *Mme NEGRE-SALVAYRE et Mme VINDIS*
Rapporteurs : *M. GADEAU et M. MEILHAC*

Remerciements

Je remercie en premier lieu M. Alain-Pierre Gadeau, M.Olivier Meilhac et M. Jean-Paul Cristol de m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury de thèse, de l'intérêt que vous avez porté à mon travail et de vos suggestions qui ont permis d'améliorer la qualité de ce manuscrit.

Je remercie M. Robert Salvayre d'avoir pris une grande part dans la réalisation de ce travail jusqu'à présider ce jury de thèse. Votre grande expérience scientifique et votre œil critique ont été des atouts majeurs dans la concrétisation de ce travail de thèse.

Je tiens à remercier particulièrement Mme Anne Nègre-Salvayre qui m'a accueillie dans son laboratoire et qui a co-dirigé cette thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez accordé, pour votre soutien, vos encouragements et votre grande disponibilité. Votre expertise dans les HDL et le stress du RE a été d'une grande aide lors de ce travail. Merci également de m'avoir offert la possibilité de réaliser une thèse dans de très bonnes conditions, avec un financement de 3 ans très précieux qui m'a permis d'avoir l'esprit libre et de me consacrer pleinement à mon travail.

Enfin merci beaucoup à Mme Cécile Vindis d'avoir encadré ma thèse au quotidien avec autant d'implication et de disponibilité. J'ai beaucoup appris à tes côtés et cela m'aidera j'en suis sûre pour la suite de ma carrière. J'ai apprécié ton soutien, ton expérience et tes qualités de chercheur, d'une grande aide lorsque tout ne marche pas comme on le voudrait. Merci également pour ta grande rigueur scientifique qui m'a sans cesse poussée à donner le meilleur de moi même.

Merci à toute l'équipe 10 pour leur accueil chaleureux. Merci à Nathalie, Françoise pour leurs conseils ou leurs discussions toujours intéressantes. Merci à Corinne, Marie-Hélène, Elodie et Jean-Claude pour l'aide technique qu'ils m'ont apporté ici ou là, à Christophe toujours serviable pour les commandes et le matériel. Merci à Eve, Danièle et Chantal pour leur aide et leur gentillesse.

Merci à tous les étudiants déjà partis ou encore au labo pour la bonne ambiance dans l'équipe : Marie, Sylvain, Cindy, Aurélie, Raphaël, Cécile, Caroline, Samuel, Sandra, Pauline, Magali, Christel. Bonne chance à celles qui sont encore en thèse, dans ce long fleuve pas tranquille, vous verrez à la fin ... on survit !

Un merci spécial à Audrey qui est arrivée au labo à la fin de ma thèse et qui m'a apporté un peu de légèreté au cours de ces longs mois de rédaction. Merci pour ta bonne humeur et les petites pauses bien sympathiques pour me sortir la tête de mon ordi. Bonne chance à toi pour la suite dans le boulot et ailleurs.

Merci à Franck, Diane et Colin pour tout et aussi d'avoir fait le voyage jusqu'à Toulouse pour me soutenir le jour de la soutenance. Et de 3 ! ... à qui le tour ?

Enfin, bien sûr Merci à mes supporters numéro 1, Papa et Maman. Comment vous remercier en quelques lignes. Merci de m'avoir toujours soutenue ; pas seulement pendant la thèse où vous vous êtes très régulièrement tenus au courant par téléphone des HDL et du stress du RE, mais merci de nous avoir, Franck et moi, toujours aidés, conseillés et soutenus depuis tout petits et de nous avoir permis de faire de longues études. Tout ça au fond, c'est un travail de famille !

SOMMAIRE

Liste des abréviations	1
Resumé	5
Liste des figures	7
<u>I - REVUE GENERALE</u>	8
A/ L'Athérosclérose	9
A.1. Généralités sur l'athérosclérose	9
A.1.1. Définition	9
A.1.2. Facteurs de risque	9
A.2. Physiopathologie de la maladie	11
A.2.1. Description anatomo-pathologique	11
A.2.2. Physiologie d'une artère normale	11
A.2.2.1. Structure de la paroi artérielle	11
A.2.2.2. Rôle physiologique de l'endothélium	13
A.2.3. Les étapes de l'athérogénèse	13
A.2.3.1. La dysfonction endothéliale	15
A.2.3.2. Pénétration et oxydation des LDL dans l'intima	16
A.2.3.3. Recrutement des monocytes et des lymphocytes T	17
A.2.3.4. Formation des cellules spumeuses	18
A.2.3.5. Migration et prolifération des CML	18
A.2.4. Evolution de la plaque d'athérosclérose	19
A.2.4.1. Les facteurs d'instabilité de la plaque	19
A.2.4.2. Hémorragies intraplaque et déstabilisation de la plaque	20
A.2.4.3. Complications cliniques de la rupture de plaque	20
B/ Les lipoprotéines et l'athérosclérose	22
B.1. Généralités sur les lipoprotéines	22
B.1.1. Structure des lipoprotéines	22
B.1.2. Métabolisme général des lipoprotéines	22
B.2. Les LDL et l'athérosclérose	25
B.2.1. Métabolisme des LDL	25
B.2.1.1. Origine des LDL	25
B.2.1.2. Catabolisme des LDL	25
B.2.2. Oxydation des LDL	27
B.2.2.1. Le stress oxydant	27
B.2.2.2. Mécanisme de la peroxydation lipidique	28
B.2.2.3. Les produits de la peroxydation lipidique	30
B.2.3. LDL oxydées et athérosclérose	32
B.2.3.1. Les LDL oxydées et plaques athérosclérotiques.....	32
B.2.3.2. LDL oxydées et formation des cellules spumeuses	32

SOMMAIRE

B.2.3.3. Propriétés pro-athérogènes des LDL oxydées	33
B.3. HDL et Athérosclérose	35
B.3.1. Taux de HDL-c et risque cardio-vasculaire	35
B.3.2. Métabolisme des HDL	36
B.3.2.1. Structure et composition des HDL	36
B.3.2.2. Transport inverse de cholestérol	36
B.3.2.2.1. Efflux de cholestérol cellulaire	37
B.3.2.2.2. Formation des HDL matures	39
B.3.2.2.3. Transfert du cholestérol vers les lipoprotéines à apoB	39
B.3.2.2.4. Remodelage des HDL	40
B.3.2.2.5. Captation du cholestérol au niveau du foie	40
B.3.3. Propriétés anti-athérogènes des HDL	41
B.3.3.1. Effet protecteur des HDL sur l'oxydation des LDL	41
B.3.3.1.1. Effets de l'apoA-I et des autres protéines des HDL	41
B.3.3.1.2. Implication des enzymes associées aux HDL	43
B.3.3.2. Effets antagonistes des HDL sur LDL oxydées	45
B.3.3.2.1. HDL et fonction vasculaire	45
B.3.3.2.2. HDL et expression des molécules d'adhésion	45
B.3.3.2.3. HDL et prolifération cellulaire	46
B.3.3.2.4. Effets des HDL sur la migration cellulaire	46
B.3.3.2.5. HDL et protection de la barrière endothéliale	47
B.3.3.2.6. Les HDL et formation du thrombus	47
C/ L'apoptose dans l'athérosclérose	49
C.1. Les différents types de mort cellulaire	49
C.1.1. La nécrose	49
C.1.2. L'apoptose	49
C.1.3. L'autophagie	49
C.2. Les mécanismes de l'apoptose	51
C.2.1. La voie extrinsèque	51
C.2.2. La voie intrinsèque	53
C.2.3. Rôle du calcium	54
C.3. Rôle de l'apoptose dans le développement des lésions athérosclérotiques.....	55
C.3.1. Apoptose des cellules endothéliales	55
C.3.2. Apoptose des cellules musculaires lisses	56
C.3.3. Apoptose des macrophages	56
C.4. Signalisations apoptotiques induites par les LDLox	57
C.4.1. Activation de la voie extrinsèque	57
C.4.2. Activation de la voie intrinsèque.....	59
C.4.3. Rôle du calcium dans l'apoptose induite par les LDLox	59
C.5. Effet anti-apoptotique des HDL	60
D/ Le stress du réticulum endoplasmique	62
D.1. Généralités sur le réticulum endoplasmique	62

SOMMAIRE

D.2. Fonctions du réticulum endoplasmique	63
D.2.1. Stockage du calcium intracellulaire	63
D.2.1.1. Les canaux IP3R	63
D.2.1.2. Les canaux RyR	64
D.2.1.3. La pompe SERCA	64
D.2.1.4. Signalisation calcique	65
D.2.2. Maturation des protéines par les chaperonnes du RE	66
D.2.2.1. Les chaperonnes à site lectine	66
D.2.2.2. Les chaperonnes de la famille Hsp70	67
D.2.2.3. La famille des chaperonnes Hsp90	70
D.2.2.4. Les thiol-oxydoréductases	70
D.3. Le Stress du Réticulum endoplasmique	72
D.3.1. La réponse UPR	74
D.3.1.1. Régulation des senseurs du stress du RE par BiP	74
D.3.1.2. Cascades de signalisation de l'UPR	76
D.3.1.2.1. La voie PERK	76
D.3.1.2.2. La voie ATF6	77
D.3.1.2.3. La voie IRE1-XBPI	78
D.3.2. Transition de l'UPR vers l'apoptose	79
D.3.2.1. La voie IRE1-TRAF2-JNK	79
D.3.2.2. Le facteur de transcription CHOP	79
D.3.2.3. La voie de la caspase-12	81
D.4. Stress du RE et athérosclérose	82
D.4.1. Détection du stress du RE dans les plaques d'athérosclérose	83
D.4.2. Effets pro-athérogènes du stress du RE sur les CE	83
D.4.3. Effets pro-athérogènes du stress du RE sur les CML	84
D.4.4. Effets pro-athérogènes du stress du RE sur les macrophages	84
E/ L'autophagie	86
E.1. Généralités sur l'autophagie	86
E.1.1. Les différents types d'autophagie	86
E.1.2 La macroautophagie ou autophagie	86
E.2. Machinerie moléculaire de l'autophagie	86
E.2.1. Les étapes du processus autophagique	86
E.2.1.1. Origine des membranes de l'autophagosome	88
E.2.1.2. Initiation de l'autophagosome	88
E.2.1.2.1. mTOR et formation du complexe initiateur de l'autophagie	88
E.2.1.2.2. Le complexe PI3K de type I	89
E.2.1.3. Elongation de l'autophagosome	89
E.2.1.3.1. Le complexe Atg12-Atg5-Atg16L	89
E.2.1.3.2. LC3	89
E.2.1.4. Maturation de l'autophagosome	91
E.2.2. Rôle du Ca²⁺ dans la régulation de l'autophagie	91
E.3. Rôle de l'autophagie dans la survie et la mort cellulaire	92

SOMMAIRE

E.3.1. Autophagie et survie cellulaire	92
E.3.1.1. Autophagie et homéostasie énergétique.....	92
E.3.1.2. L'autophagie est activée en réponse à un stress	92
E.3.1.2.1. L'hypoxie active l'autophagie	92
E.3.1.2.2. Le stress du RE active l'autophagie.....	92
E.3.1.2.3. Elimination de protéines mal repliées par l'autophagie.....	93
E.3.2. Autophagie et mort cellulaire	93
E.3.2.1. Définition de la mort par autophagie	94
E.3.2.2. Interrelation entre apoptose et autophagie	94
E.3.2.2.1. Association entre l'apoptose et l'autophagie.....	94
E.3.2.2.2. Effets antagonistes de l'autophagie et l'apoptose	95
E.3.2.3. Rôle de Beclin-1 dans la mort cellulaire par autophagie	95
E.3.2.3.1. interaction entre Beclin-1 et Bcl-2	95
E.3.2.3.2. JNK participe à la mort autophagique	96
E.3.2.3.3. Régulation de l'activité de Beclin-1 par la DAPK	96
E.4. Autophagie et athérosclérose	96
E.4.1. Induction de l'autophagie par les lipides oxydés	97
E.4.1.1. Induction de l'autophagie par le 4-HNE.....	97
E.4.1.2. Induction de l'autophagie par les LDL oxydées.....	97
E.4.1.3. Induction de l'autophagie par le cholestérol	97
E.4.2. Effets protecteurs de l'autophagie dans l'athérosclérose.....	97
E.4.2.1. Protection de l'autophagie contre le stress oxydant.....	97
E.4.2.2. Interaction entre statines et 7-cétocholestérol	98
E.4.2.3. L'autophagie et régulation de la concentration d'apoB	98
E.4.2.4. L'autophagie permet la dégradation des LDL oxydées	98
E.4.2.5. L'autophagie pourrait contribuer à la stabilisation de la plaque	99
E.4.3. Effets délétères de l'autophagie dans l'athérosclérose	99
E.4.3.1. Formation de céroïdes par l'autophagie	99
E.4.3.2. Une autophagie excessive conduit à la mort des CMLV	100

SOMMAIRE

II – MATÉRIELS ET MÉTHODES	101
1. Matériels et réactifs utilisés	102
2. Culture cellulaire	102
2.1. Types cellulaires	102
2.2. Transfection par les siRNA	106
3. Préparation et Oxydation des LDL	106
3.1. Préparation des LDL	106
3.2. Oxydation des LDL	106
4. Immunodétection	107
4.1. Extraction et dosages des protéines cellulaires	107
4.1.1. Extraction des protéines totales	107
4.1.2. Immunoprécipitation	107
4.1.3. Extraction de protéines à partir de tissus	107
4.2. Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et Western-Blot (WB)	108
4.3. Immunocytochimie.....	108
4.4. Immunohistochimie.....	109
5. Mesure du calcium intracellulaire	109
6. Evaluation de la cytotoxicité : apoptose et nécrose	109
6.1. Test de viabilité cellulaire au MTT	110
6.2. Marquage des cellules au SYTO13 / Iodure de Propidium.....	110
6.3. Coloration de May-Grunwald-Giemsa.....	111
7. PCR quantitative en temps réel.....	111
8. Cytométrie en flux	111
8.1. Marquage AnnexineV/IP.....	112
8.2. Etude de la phagocytose.....	112
9. Mesure de l'activité de PDI	113
10. Analyse statistique	113

III- OBJECTIFS et RESULTATS	114
1. Objectifs	115
2. Résultats	117
2.1 Rôle des HDL dans l'inhibition du stress du RE et de l'autophagie induits par les LDLox	117
2.1.1 Introduction	117
2.1.2 HDLs inhibit endoplasmic reticulum stress and autophagic response induced by oxidized LDLs	118
2.1.3 Discussion	119
2.2 Voies de signalisations impliquées dans l'autophagie induite par les LDLox : Etude de la voie AMPK-mTOR	122
2.2.1 Introduction	122
2.2.2 Résultats	123
2.2.3. Discussion	126
2.3 Rôle de PDI dans le stress du RE et l'apoptose induits par les LDLox	128
2.3.1 Introduction	128
2.3.2. 4-hydroxynonenal-adduct formation on protein disulfide isomerase impairs its enzymatic activity and contributes to oxidized low density lipoprotein-mediated apoptosis	129
2.3.3. Discussion	130
IV – CONCLUSION et PERSPECTIVES	132
V- BIBLIOGRAPHIE	138
VI- ANNEXES	170

LISTE DES ABBREVIATIONS

A

ABCA-1 : ATP-binding cassette transporter sub-family A member 1
ABCG-1 : ATP-binding cassette transporter sub-family A member 1
ACAT : AcylCoA-Cholesterol-Acyl-Transferase
AGPI : Acide Gras Poly Insaturé
AIF : Apoptosis Inducing Factor
AMPK : AMP-activated protein kinase
Apo : apolipoprotéine
ARN : Acide Ribo Nucléique
ARNm : Acide Ribo Nucléique messenger
ATF : Activating Transcription Factor
Atg : AuTophagy-related

B

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
BiP : Binding Immunoglobulin Protein

C

Ca²⁺ : calcium
CaMKK β : Calcium Calmoduline kinase kinase β
CE : cellules endothéliales
CETP : Cholesteryl Esterase Transfert Protein
CML : cellules musculaires lisses
CMLV : cellules musculaires lisses vasculaires
CHOP : C/EBP homologous protein

D

DAPK : Death-Associated Protein Kinase
DD : Death Domain
DISC : Death-Inducing Signaling Complex

E

EGF : Epidermal growth factor
eIF2 α : eucaryotic translation Initiation Factor -2, α subunit
eNOS : endothelial NO synthase
ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
ERO : espèces réactives de l'oxygène
ERSE : Endoplasmic Reticulum Stress Response Element

F

FADD : Fas Associated Death Domain
FGF : Fibroblast Growth Factor

G

GADD : Growth arrest-DNA damage inducible
GRP : Glucose-Regulated Protein

H

HDL : High Density Lipoprotein
HDL-c : HDL-cholestérol
HETE : acide HydroxyEicosaTétraEnoïque
HMEC-1 : Human Microvascular Endothelial Cell-1
HMG-CoA : HydroxyMethylGlutaryl-Coenzyme A
4-HNE : 4-HydroxyNonEnal
HODE : acide HydroxyOctaDecaEnoïque

I

ICAM : Inter Cellular Adhesion Molecule-1
IDL : Intermediate Density Lipoprotein
IL : InterLeukine
IP3 : Inositol-1, 4, 5-trisPhosphate
IP3R : Inositol-1, 4, 5-trisPhosphate Receptor
IRE1 α : Inositol-requiring kinase 1 α

J

JNK : c-Jun N-terminal kinase

L

LCAT : Lecithin cholestérol acyltransférase
LC3 : microtubule-associated protein-1 light-chain 3
LDL : Low Density Lipoprotein
LDL-c : LDL-cholestérol
LDLox : LDL oxydées
LDL-R : LDL-récepteur
LE : lipase hépatique
LH : lipase endothéliale
LPL : LipoProtéine Lipase
Lyso-PC : lyso-phosphatidylcholine

M

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein 1
M-CSF : Macrophages Colony Stimulating Factor

MDA : MalonDiAldéhyde
MEF : mouse embryonic fibroblasts
MMP : Matrix Metalloprotéinases
MEC : Matrice Extra Cellulaire

N

NF- κ B : nuclear factor- κ B
NO : oxyde nitrique

O

ORP150 : Oxygen Regulatory Protein 150 kDa

P

PAF : Platelet Activating Factor
PAF-AH : PAF-acétylhydrolase
PARP : Poly (ADP-ribose) polymerase
PDGF : Platelet Derived Growth Factor
PDI : Protéine Disulfide Isomérase
PEIPC : 1-palmitoyl-2-(5,6-époxyisoprostaneE2)-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine
PERK : PKR (protein kinase regulated by RNA) like endoplasmic Reticulum Kinase
PGPC : 1-palmitoyl-2-(glutaroyl)-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PL : phospholipides
PLA2 : PhosphoLipase A2
PLTP : Phospholipid Transfer Protein
PON : ParaOxoNase
POVPC : 1-palmitoyl-2-(5-oxovaléroyl)-*sn*-glycéro-3-phosphatidylcholine
PS : phosphatidylsérine
PTP : Permeability Transition Pore

R

RE : Réticulum Endoplasmique
RCT : Transport Reverse de Cholestérol
RyR : Ryanodine récepteur

S

SERCA : Sarcoplasmique Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase
SR : scavenger récepteur

T

TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TNFR : TNF receptor
TG : TriGlycérides
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

TRADD : TNF Receptor Associated Death Domain
TRAF2 : TNF receptor-associated factor 2
TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRPC : Transient Receptor Potential Canonical channel

U

UPR : Unfolded Protein Response

V

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VLDL : Very Low Density Lipoprotein

X

XBP1 : X-box-binding protein
XBP1s : X-box-binding protein 1 spliced form
XBP1u : X-box-binding protein 1 unspliced form

RESUME

L'athérosclérose est une pathologie multi-factorielle complexe à évolution lente caractérisée par la formation de lésions dans la paroi des artères. Le remodelage de la paroi vasculaire est associé à des réactions inflammatoires, des processus de prolifération et de mort cellulaire. Parmi les facteurs pro-athérogènes associés au développement des lésions, les lipoprotéines de basse densité (LDL) jouent un rôle prépondérant, de par leur oxydation dans l'intima. Les LDL oxydées (LDLox) sont impliquées dans la formation des lésions primaires (stries lipidiques) et possèdent des propriétés inflammatoires et apoptotiques qui pourraient participer aux phénomènes d'érosion et de rupture de plaque à l'origine des événements thrombotiques de la maladie. A l'inverse, les lipoprotéines de haute densité (HDL), ont des propriétés anti-athérogènes qui pourraient ralentir la progression des lésions.

Les LDLox induisent une apoptose des cellules vasculaires, impliquant une dérégulation de l'homéostasie calcique et l'induction du stress du réticulum endoplasmique (RE). Les travaux actuels montrent que le stress du RE et l'apoptose s'accompagnent d'une réponse autophagique qui jouerait un rôle dans la survie cellulaire. Notre travail de thèse a été focalisé sur le rôle du stress du RE et de l'autophagie dans l'apoptose des cellules vasculaires induite par les LDLox, et l'effet protecteur des HDL.

Dans une première partie, nous avons montré que le stress du RE est impliqué dans l'apoptose des cellules endothéliales microvasculaires HMEC-1, *via* l'induction du facteur proapoptotique CHOP (C/EBP homologous protein) et l'activation de la voie IRE1 α (Inositol requiring kinase 1)/c-Jun N-terminal kinase (JNK), qui sont spécifiques du stress du RE. De façon concomitante au stress du RE, nous montrons que les LDLox induisent une réponse autophagique caractérisée par l'augmentation de la forme LC3-II et l'induction de la Beclin-1. L'autophagie pourrait participer à la phagocytose des cellules apoptotiques, en favorisant l'exposition des phosphatidylsérines (PS) à la surface cellulaire.

Les HDL inhibent l'induction du stress du RE par les LDLox, en bloquant l'activation des senseurs IRE1 α , ATF6 et du substrat de PERK eIF2 α , de même que l'activation de JNK et l'induction de CHOP. Les HDL bloquent aussi la réponse autophagique et l'exposition des PS induite par les LDLox. L'activation du stress du RE et de l'autophagie par les LDLox dépend d'une dérégulation de l'homéostasie calcique intracellulaire qui est inhibée par les HDL.

Dans une deuxième partie, nous avons étudié l'implication d'une chaperone du RE, la Protéine Disulfide Isomérase (PDI), dans l'apoptose induite par les LDLox. Les LDLox induisent une inhibition progressive de l'activité PDI dans les HMEC-1 et les monocytes/macrophages U937, qui pourrait jouer un rôle dans l'apoptose. L'inhibition de PDI par les LDLox dépend en partie de sa modification par les produits de la peroxydation lipidique, présents dans les LDLox comme le 4-hydroxynonéanal (4-HNE) qui forment des adduits sur PDI et modifient son activité. Des adduits de 4-HNE sur PDI sont aussi détectés dans des plaques athérosclérotiques humaines suggérant une perte de fonction de PDI dans les lésions.

SUMMARY

Atherosclerosis is a multifactorial disease characterized by slowly progressive lesion formation in the arteries. The remodeling of the vascular wall is associated with inflammatory reactions, processes of proliferation and cell death. Among pro-atherogenic factors associated with lesion development, low density lipoprotein (LDL) play a key role, by their oxidation in the intima. Oxidized LDL (oxLDL) are involved in the formation of primary lesions (fatty streaks) and inflammatory and apoptotic properties that could contribute to erosion and plaque rupture at the origin of severe thrombotic disease. Conversely, high density lipoprotein (HDL), have anti-atherogenic properties that could slow the progression of lesions. The oxLDL induce apoptosis of vascular cells, involving deregulation of calcium homeostasis and induction of endoplasmic reticulum stress (ER). The current work shows that ER stress and apoptosis are accompanied by an autophagic response that may play a role in cell survival. This work was focused on the role of ER stress and autophagy in apoptosis of vascular cells induced by oxLDL, and the protective effect of HDL.

In the first part, we showed that ER stress is involved in apoptosis of microvascular endothelial cells HMEC-1, via induction of ER stress specific proapoptotic factor CHOP (C / EBP homologous protein). Indeed, HMEC-1 treated with siRNA specific for CHOP, as well as fibroblasts derived from CHOP-KO mice are resistant to apoptosis induced by oxLDL. Moreover, the apoptotic role of ER stress is characterized by the activation of the IRE1 α (inositol requiring kinase 1) / c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. Concomitantly with ER stress, we show that oxLDL induce an autophagic response characterized by increased LC3-II form and the induction of Beclin-1. Autophagy may be involved in phagocytosis of apoptotic cells, promoting the exposure of phosphatidylserine (PS) to the cell surface. HDLs inhibit the induction of ER stress by oxLDL, blocking the activation of sensors IRE1 and ATF6 (activating transcription factor), as well as the activation of JNK and induction of CHOP. Similarly, HDL block the autophagic response and the PS exposure induced by oxLDL. Activation of ER stress and autophagy by oxLDL depends on a deregulation of intracellular calcium homeostasis which is inhibited by HDL. HDL inhibit the oxLDL proapoptotic signaling, probably via inhibition of intracellular oxidative stress.

In a second part, we investigated the involvement of a chaperone of the ER, the protein disulfide isomerase (PDI) in apoptosis induced by oxLDL. The oxLDL induced a progressive inhibition of PDI activity in HMEC-1 and monocytes / macrophages, U937, which could play a role in apoptosis. Indeed, inhibition of PDI by bacitracin or by transfection of a vector encoding a PDI mutated at the site enzyme potentiates the induction of CHOPmRNA and apoptosis induced by oxLDL. The inhibition of PDI by oxLDL depends in part on its modification by lipid peroxidation products present in oxLDL such as 4-hydroxynonenal (4-HNE) that form adducts on PDI and modify its activity. An antioxidant, N-acetylcysteine (NAC) reverse the inhibitory effect of oxLDL on the enzymatic activity of PDI and prevents apoptosis. Adducts of 4-HNE on PDI were detected in human atherosclerotic plaques suggesting a loss of function of PDI in the lesions.

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Liste des figures :

Figure 1 : Etapes de la progression d'une lésion d'athérosclérose.....	14
Figure 2 : Représentation simplifiée d'une lipoprotéine	23
Figure 3 : Les trois voies de transport intravasculaire du cholestérol	26
Figure 4 : Représentation simplifiée de la peroxydation lipidique.....	29
Figure 5 : Etapes du transport reverse de cholestérol.....	38
Figure 6 : Effets multiples des HDL dans la paroi vasculaire à l'origine de leur effet anti-athérogène	42
Figure 7 : Les trois voies de la mort cellulaire	50
Figure 8 : Voies de signalisation apoptotiques.....	52
Figure 9 : Voies de signalisation apoptotiques induites par les LDL oxydées.....	58
Figure 10 : Les différentes fonctions de la chaperonne BiP.....	68
Figure 11 : Réactions catalysées par la PDI	71
Figure 12 : La réponse UPR	73
Figure 13 : Représentation des trois senseurs du stress du RE.....	75
Figure 14 : Connexions entre l'UPR et les voies de mort cellulaire	80
Figure 15 : Représentation schématique du processus de macroautophagie.....	87
Figure 16 : Régulation moléculaire de l'autophagie	90

Listes des Tableaux :

Tableau 1 : Facteurs de risque de l'athérosclérose	10
Tableau 2 : Classification des lésions d'athérosclérose	12
Tableau 3 : Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines humaines ...	24
Tableau 4 : Matériels, réactifs et anticorps utilisés	103

I- REVUE GENERALE

A/ L'ATHEROSCLEROSE

A.1. Généralités sur l'athérosclérose

A.1.1. Définition

Selon la définition donnée par l'Organisation Mondiale de la Santé, l'athérosclérose est une maladie de l'intima des artères de gros et de moyens calibres d'évolution lente et irrégulière. Elle consiste en un remaniement focalisé de l'intima par l'accumulation de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires. L'athérosclérose est une maladie évolutive qui aboutit au rétrécissement de la lumière artérielle par le développement d'une plaque athérosclérotique. Dans les stades les plus avancés, la plaque peut se rompre et être à l'origine de complications graves comme l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral (Figure 1).

A.1.2. Facteurs de risque

L'athérosclérose est une maladie très complexe dont l'apparition résulte d'un ensemble de facteurs de risque (Tableau 1). Ces facteurs de risque ont été déterminés lors d'études épidémiologiques (étude Framingham et étude MONICA) et font intervenir des facteurs génétiques non modifiables (âge, genre, hérédité), des habitudes de vie modifiables (alimentation riche en sucre et en graisse, tabac, sédentarité) et des situations pathologiques modifiables dans une certaine mesure (hypercholestérolémie, diabète, obésité, hypertension). Il est établi qu'il existe une relation linéaire entre le risque cardio-vasculaire et les taux de cholestérol total et de LDL (Low Density Lipoprotein) cholestérol. Cette relation a été mise en évidence par l'hypercholestérolémie familiale. Cette maladie autosomale dominante cause chez les patients une augmentation des taux plasmatique de LDL jusqu'à 5 fois supérieure à la normale et 85% de ces patients subissent à 60 ans un infarctus du myocarde (Soutar and Naoumova, 2007). Dans la population générale, il est montré que la réduction des taux de LDL cholestérol induit une diminution de l'incidence de l'athérosclérose (Gotto and Grundy, 1999). Par contre, le HDL (High Density Lipoprotein) cholestérol exerce un pouvoir protecteur sur l'apparition de l'athérosclérose (Gordon et al., 1977).

Tableau 1. Facteurs de risques génétiques et environnementaux de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires. (D'après Lusic, 2000).

Facteurs de risque non modifiables à composantes génétiques	Facteurs de risque modifiables
Niveaux élevés de LDL (low density lipoprotein) (supérieur à 1,6 g/L) et VLDL (very low density lipoprotein)	Régime alimentaire riche en sucre et en graisse
Niveaux bas de HDL (High density lipoprotein) (inférieur à 0,4 g/L chez l'homme et 0,5 g/L chez la femme)	Tabac
Hypertension	Niveau faible d'antioxydants
Diabète et obésité	Manque d'exercice physique
Taux plasmatiques élevés de facteurs hémostatiques (fibrinogène, inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I, hyper réactivité plaquettaire)	Agents infectieux (<i>Chlamydia pneumoniae</i>)
Sexe masculin	
Marqueurs de l'inflammation plasmatiques élevés (C-reactive protein)	
Syndrome métabolique	

A.2. Physiopathologie de la maladie

A.2.1. Description anatomo-pathologique

Les lésions athérosclérotiques peuvent être classifiées selon leur stade d'évolution de I à VI (Stary et al., 1995) (Tableau 2).

Les lésions de type I (lésion initiale) et de type II (stries lipidiques) sont des remaniements physiologiques de l'intima observés chez tous les sujets durant les vingt premières années de la vie. Ces deux types de lésions sont caractérisés par une accumulation progressive de monocytes et de macrophages dans l'espace sous-endothélial et par l'accumulation de cellules spumeuses (macrophages et cellules musculaires lisses (CML)) chargées en lipides.

Des lésions de type III aux lésions de type V, il y a formation d'une plaque athéromateuse. La plaque athéromateuse est caractérisée par un remodelage important de l'intima avec développement d'un cœur lipidique constitué de cholestérol libre ou estérifié, de phospholipides, de débris cellulaires nécrotiques et de cellules spumeuses. Autour du cœur nécrotico-lipidique se forme une chape fibreuse constituée de CML produisant une grande quantité de matrice extracellulaire (MEC). En compensation à l'épaississement de l'intima, la média est amincie pour conserver une épaisseur normale de la paroi artérielle. Les plaques de type VI (lésions compliquées) peuvent présenter des fissurations ou une érosion de la chape fibreuse qui entraînent une mise en contact du sang circulant avec le contenu de la plaque favorisant les risques d'hémorragie intraplaque et un thrombus par agrégation plaquettaire. Les lésions compliquées favorisent donc la sténose de la lumière artérielle et sont à l'origine des manifestations cliniques de la maladie.

A.2.2. Physiologie d'une artère normale

A.2.2.1. Structure de la paroi artérielle

La paroi artérielle est séparée en trois couches. La couche la plus externe est l'adventice composée de fibres de collagènes et de protéoglycanes dans lesquelles sont insérées quelques CML et des fibroblastes. Elle est irriguée par un ensemble de vaisseaux sanguins appelé vasa vasorum.

Tableau 2. Classification des lésions d'athérosclérose (D'après Stary, 1995).

Stade	Appellation	Histologie	Mécanisme de croissance	Age d'apparition	Manifestation clinique
Type I	Lésion Initiale	Macrophages spumeux isolés dans l'intima. Absence de lipides extracellulaires.	croissance par accumulation de lipides extracellulaires ou dans les cellules spumeuses	A partir de 10ans	"plaque silencieuse" Développement de la plaque sans manifestation clinique
type II	Stries lipidiques	macrophages et CML spumeux en couche. Migration de CML dans l'intima.			
type III	Pré-athérome	type II associé à des dépôts lipidiques extracellulaires		A partir de 30 ans	Plaque active Si sténose importante manifestation à l'effort
type IV	Athérome	Formation d'un coeur nécrotique composé de lipides, de débris cellulaires nécrotiques	développement des CML et synthèse de collagène		
type V	Fibro-athérome	Formation d'une chape fibreuse composée de CML et collagène autour du coeur nécrotique (type Va) avec calcification (type Vb)			
type VI	Lésion compliquée	Type V avec rupture ou fissuration de la chape fibreuse (type VIa), hémorragie intraplaque (type VIb), thrombose (type VIc)	thrombose et coagulation	de 40 ans	Rupture de plaque manifestations aiguës (infarctus ou AVC)

La média au centre est composée de CML enchâssées dans une MEC associant du collagène, de l'élastine et des protéoglycanes. C'est la partie qui confère les propriétés élastiques à l'artère. La couche la plus externe est l'intima, séparée de la media par la limitante élastique interne composée de fibres élastiques et bordée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) en contact avec le flux sanguin. L'intima est une couche très fine composée de collagène et de protéoglycanes. La zone sous endothéliale de l'intima est le site de développement des lésions d'athérosclérose.

A.2.2.2. Rôle physiologique de l'endothélium

L'endothélium n'est pas qu'une simple barrière constituée d'une couche unique de CE entre la circulation sanguine et la paroi vasculaire. En conditions normales, l'endothélium sécrète ou exprime à sa surface un ensemble de molécules qui permettent de réguler l'homéostasie vasculaire en contrôlant le tonus vasculaire, le flux sanguin et en maintenant les fonctions anti-thrombotiques et anti-coagulantes (Pearson, 1999).

L'endothélium joue un rôle central dans la régulation du flux sanguin en modulant continuellement le tonus vasculaire par la production de molécules vasodilatatrices et vasoconstrictrices. Les CE produisent deux puissants vasodilatateurs que sont l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline (PGI₂) (Pearson, 1999). Le NO est produit par la NO synthase endothéliale (eNOS) au cours de l'oxydation de la L-arginine. L'activité de la eNOS est modulée par un ensemble de facteurs dont la déformation mécanique de la membrane plasmique des CE induites par les forces de cisaillement exercées par le flux sanguin sur la paroi artérielle. Le NO a pour conséquence d'induire la vasodilatation de la paroi vasculaire par une relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et une inhibition de leur prolifération. Le NO a d'autres fonctions telles que l'inhibition de l'agrégation des plaquettes et leur adhésion à l'endothélium (Raij, 2006).

L'effet des vasodilatateurs est contrebalancé par des molécules vasoconstrictrices telle que l'endothelin-1 (ET-1) produite par les CE, dont les effets biologiques incluent une prolifération des CMLV (Peiro et al., 1995).

A.2.3. Les étapes de l'athérogénèse

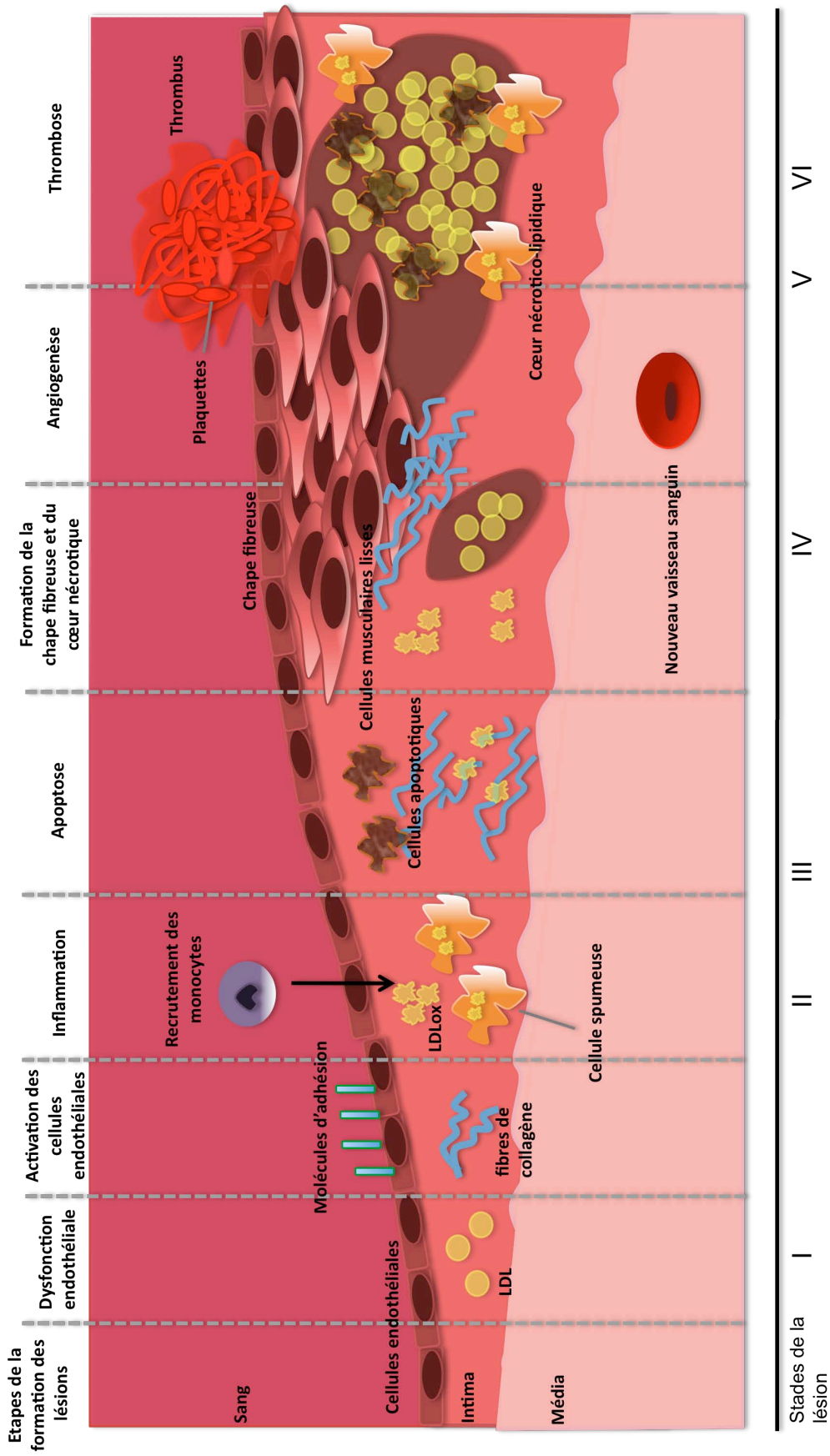


Figure 1. Etapes de la progression d'une lésion athérosclérotique. Le développement de la lésion débute à partir d'une artère normale (gauche) et progresse jusqu'à la formation d'un centre nécrotique large, une érosion de la plaque et la formation d'un thrombus (droite). Les stades de développement de la lésion sont donnés en bas selon la classification de l'AHA (American Heart Association). LDL: Low Density Lipoprotein ; LDLox: LDL oxidé (D'après Sanz et Fayad, 2008).

A.2.3.1 La dysfonction endothéliale

L'endothélium exerce une régulation fine de l'homéostasie vasculaire en produisant un nombre important de facteurs qui contrôlent le tonus vasculaire, la prolifération des CML et l'inflammation. Lorsque des facteurs de risque entrent en compte, l'endothélium est activé et favorise l'inflammation, la thrombose et la vasoconstriction. L'ensemble de ces changements néfastes caractérise la dysfonction endothéliale qui est reconnue pour être l'étape initiale de l'apparition de l'athérosclérose.

L'un des évènements causant l'activation des CE est la perturbation de l'écoulement du flux sanguin. Le flux sanguin génère des forces de cisaillement exercées parallèlement à la surface de l'endothélium. Lorsque le flux sanguin s'écoule de façon laminaire, les forces exercées sur la paroi artérielle sont fortes. A l'inverse dans certaines régions de courbures des artères, le flux peut ralentir considérablement ou exercer des forces oscillatoires. Ces différences de forces sur la paroi artérielle expliquent le développement des plaques d'athérome à certains endroits de l'arbre artériel. Ainsi, les plaques athérosclérotiques se développent préférentiellement au niveau des courbures internes des artères coronaires où les forces de cisaillement sont faibles et près des bifurcations où les forces de cisaillement sont oscillatoires (Cheng et al., 2006). Au niveau de ces sites, l'expression de plus de 70 gènes est augmentée dans les CE dont des gènes pro-inflammatoires comme l'interleukine-8 (IL-8) ou les récepteurs au TNF (TNFR) (Dai et al., 2004).

Plusieurs études chez l'homme ou l'animal ont montré que lors d'un régime hypercholestérolémique inducteur d'athérosclérose, la fonction vasodilatatrice de l'endothélium est perturbée, suggérant une réduction de la synthèse ou de l'action du NO (Maas et al., 2008). Compte tenu des nombreuses fonctions biologiques du NO sur l'endothélium, une perturbation de sa biodisponibilité entraîne la dysfonction endothéliale, caractérisée par une activité vasoconstrictive, une prolifération des CML, une activation plaquettaire et une activité pro-thrombotique de l'endothélium (Raij, 2006).

La dysfonction endothéliale est également caractérisée par une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) et ICAM (inter cellular adhesion molecule 1) au niveau des CE (De Caterina et al., 1995).

L'augmentation d'expression des molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium favorise l'adhésion des leukocytes (monocytes et lymphocytes T) et leur pénétration dans l'espace sous-endothélial.

A.2.3.2. Pénétration et oxydation des LDL dans l'intima

La diminution des forces de cisaillement exercées sur l'endothélium engendre une augmentation de la déposition des lipides dans l'intima due à une perméabilité accrue de l'endothélium (Zand et al., 1999). La perméabilité de l'endothélium facilite ainsi le passage des lipoprotéines athérogènes (LDL) dans l'intima. Il existe une hétérogénéité au sein des particules LDL, on distingue les LDL larges et les LDL petites et denses, ces dernières possédant le plus haut potentiel athérogène. Ainsi, une étude sur une large cohorte au Québec a montré qu'une forte proportion de LDL petites et denses (diamètre inférieur à 25,6 nm) par rapport aux LDL larges (diamètres supérieur à 25,6 nm) augmente le risque de maladie cardiovasculaire (Lamarche et al., 2001). La taille de ces LDL peut expliquer en partie leur athérogénicité accrue. En effet Stender et Zilversmit (Stender and Zilversmit, 1981) et Nordestgaard et Zilversmit (Nordestgaard and Zilversmit, 1989) ont montré que les LDL petites et denses peuvent entrer plus facilement dans la paroi artérielle et sont préférentiellement retenues que les LDL larges.

Dans l'espace sous-endothélial, les LDL sont retenues par une association entre les protéoglycanes de la MEC et la protéine apoprotéine (apo) B-100 constituante des LDL (Boren et al., 1998). L'accumulation de ces LDL favorise leur modification oxydative par les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites par les cellules vasculaires. L'oxydation des LDL, qui favorise la dysfonction de l'endothélium, l'attraction des monocytes, et la formation des cellules spumeuses, est l'élément central de la théorie oxydative de l'athérogénèse. Cette théorie a été proposée dès 1989 par Steinberg et al. (Steinberg et al., 1989) sur la base de la découverte en 1979 par Goldstein et Brown (Goldstein et al., 1979) de la formation des cellules spumeuses par accumulation de LDL modifiées chimiquement. En effet, les LDL natives, internalisées par le LDL-récepteur (LDL-R), ne sont pas captées en excès par les macrophages dus à des mécanismes d'auto-régulation, en revanche les LDL modifiées

s'accumulent abondamment due à une surrégulation de récepteurs scavengers. Ceci conduit à la formation des cellules spumeuses remplies de gouttelettes d'esters de cholestérol qui jouent un rôle clé dans le développement des lésions.

A.2.3.3. Recrutement des monocytes et des lymphocytes T à l'endothélium

Le développement des plaques implique le recrutement de cellules inflammatoires (monocytes et lymphocytes T) de la circulation et leur migration trans-endothéliale. Les monocytes jouent un rôle clé dans la formation des lésions ainsi il a été montré que l'élimination des monocytes circulants chez le lapin réduit considérablement la formation des plaques (Ylitalo et al., 1994). De plus, chez la souris invalidée pour l'apoE et présentant une prolifération de monocytes dans le sang, un régime riche en graisse favorise le développement de la plaque par adhésion des monocytes à l'endothélium (Swirski et al., 2007).

Le recrutement des leukocytes à l'endothélium se fait par l'interaction entre les molécules d'adhésion exprimées par les CE activées et celles des monocytes. Lorsque les leukocytes sont ralentis au niveau des zones à risque où le flux circulatoire est modifié, des adhésions transitoires entre molécules de la famille des sélectines permettent de ralentir les leukocytes et favorisent leur roulement à la surface de l'endothélium (Eriksson et al., 2000). Les intégrines réalisent ensuite l'adhésion forte des leukocytes sur l'endothélium préalable à leur migration. Les intégrines LFA-1, CD11B et VLA-4 sont reconnues par les ICAM et les VCAM endothéliales donc l'expression est augmentée par les cytokines pro-inflammatoires et les LDL oxydées (LDLox) (Khan et al., 1995). La migration des leukocytes dans l'intima est activée par deux chémokines, IL-8 et MCP-1 (monocyte chemoattractant protein) (Boisvert et al., 1998 ; Gu et al., 1998).

L'accumulation des lymphocytes T dans l'intima contribue à augmenter les phénomènes inflammatoires participant au développement de la plaque selon une boucle d'amplification. Ainsi, l'activation des lymphocytes T en particulier par les LDLox conduit à l'expression de CD40 et CD40 ligand qui activent la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages induisant ainsi le recrutement de nouvelles cellules inflammatoires (Schonbeck et al., 2002).

A.2.3.4. Formation des cellules spumeuses

Une fois entrés dans l'intima, les monocytes se différencient en macrophages sous l'action d'un facteur de différenciation M-CSF (Macrophage colony stimulating factor) produit en partie par les CE sous l'influence des LDL modifiées (Shi et al., 2000). Le M-CSF induit la prolifération des monocytes et l'expression de récepteurs scavengers à leur membrane (de Villiers et al., 1994). L'accumulation de lipides dans les macrophages dérivés des monocytes conduit à la formation de cellules spumeuses et représente un évènement critique de l'athérogénèse. Le but premier de l'internalisation des lipides est d'éliminer les LDLox accumulées dans la paroi vasculaire. Les stries lipidiques observées très tôt au cours de la vie sont la conséquence de l'accumulation de macrophages chargés en lipides dans la paroi vasculaire (Stary et al., 1995). Cependant, l'accumulation incontrôlée de LDLox dans les macrophages conduit finalement à leur mort et au développement du cœur nécrotique de la plaque.

A.2.3.5. Migration et prolifération des CML

Dans les stades les plus avancés, la plaque développe une chape fibreuse dont la formation résulte de la migration des CML de la média vers l'intima sous l'influence de chémokines, entre autre MCP-1, produites par les macrophages (Kim et al., 2003). Par ailleurs, le facteur de croissance PDGF (platelet derived growth factor), sécrété par les plaquettes et les macrophages, est un puissant stimulant de la migration et de la prolifération des CML en culture et pourrait ainsi jouer un rôle dans l'accumulation de CML dans l'athérogénèse (Jawien et al., 1992). Certains facteurs pro-athérogènes tels que les LDLox ont également un effet prolifératif sur les CML (Auge et al., 1998 ; Shen et al., 2001).

Les CML de la média produisent une importante quantité de MEC constituée en partie de collagène de type I. Or cette MEC est dégradée par les métalloprotéases produites par les macrophages, cette altération de la MEC associée avec la migration dans l'intima conduit à un changement de phénotype des CML. Les CML de la média ont un phénotype différencié et contractile, alors que celui des CML de l'intima est sécrétoire et prolifératif. Les CML de l'intima expriment peu de marqueurs de contractilité comme l' α -actine ou la chaîne légère de

la myosine et sécrètent des protéases, des cytokines et des protéines de la MEC (Doran et al., 2008).

Comme les macrophages, les CML expriment plusieurs récepteurs scavengers leur permettant d'accumuler des lipides, de se transformer en cellules spumeuses et ainsi alimenter le cœur nécrotique de la plaque (Rong et al., 2003). Cependant, il est également admis que la chape fibreuse de CML participe à la stabilisation de la plaque, une chape fibreuse épaisse empêche les risques d'érosion ou de rupture (Plutzky, 1999).

A.2.4. Evolution de la plaque d'athérosclérose

Pendant la majeure partie de son évolution, la plaque progresse silencieusement et ne présente pas de manifestations cliniques. Lors de la progression de la plaque, le vaisseau peut compenser la diminution de la lumière artérielle par un remodelage adaptatif de la média qui s'affine. Cet effet de compensation peut parfois empêcher l'appréciation de la taille réelle de la plaque par l'artériographie. Le développement important de la plaque du à la prolifération des CML et à la production de MEC conduit à la sténose et au ralentissement du flux sanguin ce qui entraîne un appauvrissement en oxygène de l'organe cible. Cependant, les complications graves de l'athérosclérose ne sont pas dues à la taille de la plaque mais plutôt à son instabilité (Lusis, 2000).

A.2.4.1. Les facteurs d'instabilité de la plaque

Une plaque stable contient beaucoup de fibres de collagène et de CML et au contraire peu de macrophages ou de cellules spumeuses et de lipides. A l'inverse, une plaque instable se définit comme une plaque composée d'une chape fibreuse fine présentant peu de CML, une inflammation à l'intérieur de la chape et un cœur nécrotique large (Virmani et al., 2006).

L'instabilité de la plaque est augmentée par plusieurs facteurs :

- un cœur nécrotique important représentant 45% du volume de la plaque augmente le risque de rupture. La consistance de la plaque est déterminée par sa composition lipidique. Plus la plaque est riche en esters de cholestérol et plus elle sera "molle" et donc moins apte à résister à la force du flux sanguin (Loree et al., 1994).

- L'épaisseur de la chape fibreuse est déterminante pour la stabilité de la plaque. L'IFN- γ (Interferon- γ) peut inhiber la synthèse de collagène par les CML et ainsi déstabiliser l'architecture de la chape (Lee and Libby, 1997). Le collagène de la plaque peut également être détruit par l'action d'enzymes MMP (matrix metalloprotéinase) produites par les lymphocytes T, les CE ou les CML (Galis et al., 1994).

- L'apoptose des cellules constituant de la plaque joue également un rôle déstabilisateur. L'apoptose des CE déstabilise l'endothélium et facilite l'entrée des LDL et des cellules inflammatoires dans l'espace sous-endothélial (Dimmeler et al., 2002). L'apoptose des CML contribue à diminuer la synthèse de collagène (Clarke et al., 2006).

A.2.4.2. Implication des hémorragies intraplaques dans la vulnérabilité des plaques

Les hémorragies intraplaques jouent également un rôle important dans la progression vers les événements cliniques athérothrombotiques. Elles sont liées à la néo-angiogenèse initiée dans les stades précoces de la maladie à partir de l'adventice. Les nouveaux capillaires formés sont immatures et par conséquent perméables. Ceci est alors responsable de la diffusion d'érythrocytes, de leucocytes, de plaquettes ou de protéines plasmatiques dans la lésion. Ces différents produits sanguins peuvent être impliqués dans la progression vers l'athérothrombose. Ainsi le fer contenu dans l'hémoglobine peut catalyser des réactions oxydatives à l'origine de modifications oxydatives des lipides et de leurs effets cytotoxiques. Par ailleurs, l'apport de cholestérol des membranes des cellules sanguines va entraîner la formation de cristaux de cholestérol présentant une grande pathogénicité qui peut favoriser l'érosion de la chape (Michel et al., 2011).

A.2.4.3. complications cliniques de la rupture de plaque

La rupture de plaque se définit comme une discontinuité de la chape fibreuse qui expose le cœur de la plaque au sang circulant. La mise à nu du collagène de la plaque entraîne la fixation des plaquettes qui sont activées entre autre par le facteur tissulaire et la thrombine. L'activation et l'agrégation plaquettaire provoquent la cascade de coagulation et tous ces événements contribuent à la formation d'un thrombus (Sumi et al., 2010). La formation du

thrombus est responsable de l'apparition des complications graves de l'athérosclérose, il peut occlure la lumière artérielle ou se détacher et provoquer une embolie. Dans ces cas, le thrombus est responsable des manifestations cliniques comme l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux ischémiques et les ischémies aiguës des membres inférieurs.

La compréhension des mécanismes responsables d'une instabilité de la plaque pouvant aboutir à sa rupture ou à son érosion est donc primordiale dans la prévention des complications thrombogènes de l'athérosclérose.

Bien que l'inflammation soit considérée comme une caractéristique essentielle dans l'athérogénèse, il est largement considéré que les LDL sont un élément central de la pathogénèse de l'athérosclérose. Ainsi, la réduction du LDL cholestérol est un des moyens les plus efficaces de ralentir l'apparition de la maladie. A l'inverse, les HDL de part leurs nombreuses propriétés anti-athérogènes freinent le développement des plaques. Nous allons décrire dans le chapitre suivant la structure et les fonctions de ces lipoprotéines LDL et HDL.

B/ LES LIPOPROTEINES ET L'ATHEROSCLEROSE

B.1. Généralités sur les lipoprotéines

B.1.1. Structure des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des particules sphériques composées d'une monocouche lipidique entourant un cœur hydrophobe composé de triglycérides (TG) et d'esters de cholestérol (Ginsberg, 1998) (Figure 2). La monocouche lipidique est composée de phospholipides (PL), de protéines et de cholestérol libre. Cette monocouche confère à la lipoprotéine la caractéristique de solubilité dans les liquides aqueux (plasma, lymphe et liquide interstitiel) nécessaire au transport des lipides hydrophobes. Les protéines intégrées dans la monocouche lipidique sont des apoprotéines (apo) qui servent à la stabilité de la lipoprotéine. Les apoprotéines sont également des ligands ou des cofacteurs pour les récepteurs et les enzymes du métabolisme des lipoprotéines.

Les lipoprotéines sont communément classées en cinq groupes principaux selon leur densité (Gofman et al., 1949) (Tableau 3). Dans un ordre croissant en densité et décroissant en taille on trouve : les chylomicrons, les VLDL (very low density lipoprotein), les IDL (intermediate density lipoprotein), les LDL (low density lipoprotein) et les HDL (high density lipoprotein). Les lipoprotéines les plus légères (chylomicrons et VLDL) contiennent en majorité des TG alors que les lipoprotéines de densité plus élevées (LDL et HDL) contiennent essentiellement des esters de cholestérol. Une autre classification prend en compte la nature de l'apo constituante de la lipoprotéine. On distingue alors les lipoprotéines contenant l'apoB (chylomicrons, VLDL, IDL et LDL) reconnus pour leurs propriétés athérogènes, des particules contenant l'apoA (préβHDL, HDL2 et HDL3) anti-athérogènes.

B.1.2. Métabolisme général des lipoprotéines

Le métabolisme des lipoprotéines fait intervenir trois types de tissus : l'intestin, le foie et les tissus périphériques et s'organise selon trois grandes voies de transport.

L'intestin réalise le transport des lipides exogènes vers le foie et constitue la voie entéro-hépatique. L'absorption alimentaire des lipides par l'intestin conduit à la formation par les entérocytes de lipoprotéines de grandes tailles et très riche en TG, les chylomicrons. Les

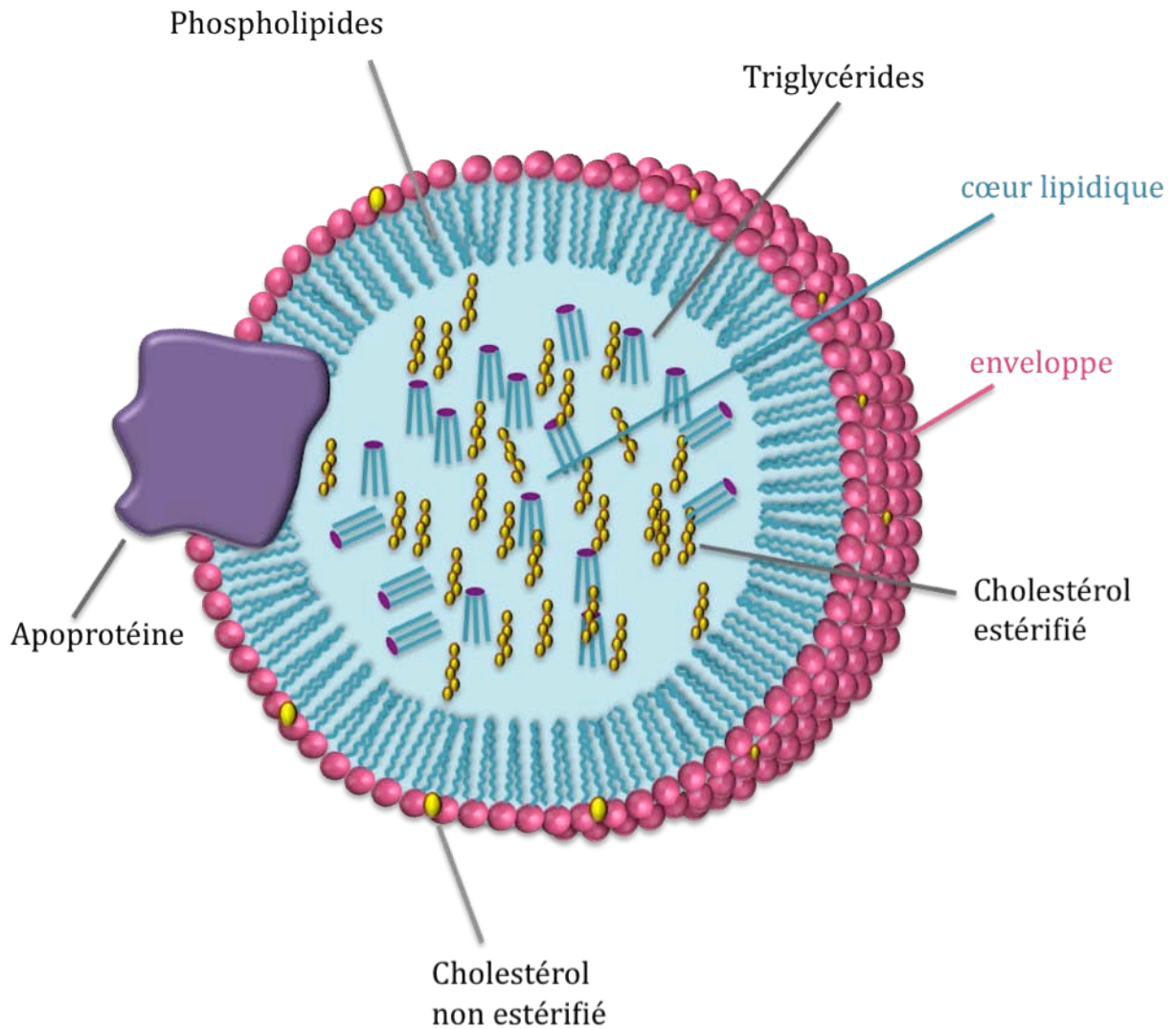


Figure 2. Représentation simplifiée d'une lipoprotéine. Exemple d'une particule de LDL, la LDL est composée de deux parties distinctes, l'enveloppe et le cœur. Le diamètre moyen d'une LDL est de 22nm, le cœur est composé d'environ 170 triglycérides et 1600 esters de cholestérol. L'enveloppe est composée d'environ 700 phospholipides et une molécule d'apoB-100. En plus, la particule contient 600 molécules de cholestérol non estérifié, dont 1/3 se situe dans le centre et 2/3 à la surface (D'après Hevonoja et al., 2000).

Tableau 3. Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines. (D'après Lagrost et al., 2004).

type de lipoprotéine	mobilité électrophorétique	densité (g/ml)	taille (nm)	proportion EC/TG	principales apolipoprotéines (apo)
chylomicrons	pas de migration	0,93	75-1200	1/19	B48, E, C
VLDL	pré β	0,93-1,006	30-80	1/3,3	B100, E, C
IDL	pré β lent	1,006-1,019	27-35	1/3,5	B100, E
LDL	β	1,019-1,063	18-27	1/0,23	B100
HDL2	α	1,063-1,125	9-12	1/0,22	AI, AII, C
HDL3	α	1,125-1,210	7-9	1/0,19	AI, AII, C
pré β HDL	pré β	1,210-1,250	<7 (disques)	nd	AI

chylomicrons sont transportés jusqu'aux tissus périphériques où les TG sont hydrolysés par la lipoprotéine lipase (LPL). La LPL est une enzyme plasmatique localisée au niveau de l'endothélium des capillaires irriguant les tissus utilisant les acides gras libres comme nutriments. Les acides gras libérés sont captés soit par les adipocytes du tissu adipeux et reconvertis en TG pour être stockés, soit dégradés à des fins énergétiques dans le muscle strié ou le cœur. Une partie des chylomicrons est capté par le foie et le cholestérol libéré conduit à la formation de nouvelles lipoprotéines assemblées et sécrétées par le foie, les VLDL.

Le foie est le point de départ du transport des lipides vers les tissus périphériques selon la voie endogène de transport des lipides. Les VLDL sont transformés selon une cascade lipolytique pour former les IDL puis les LDL.

La voie de transport inverse du cholestérol est réalisée par les HDL et fait partie des propriétés anti-athérogènes de ces lipoprotéines. Le cholestérol en excès au niveau des tissus extra-hépatiques est capté par les HDL et ramené au foie pour être excrété dans la bile (Gautier et al., 2010) (Figure 3).

B.2 Les LDL et l'athérosclérose

B.2.1. Métabolisme des LDL

B.2.1.1. Origine des LDL

Les VLDL sont pauvres en protéines (apoB100, apoC-II, apoE) mais renferment 90% de lipides dont la moitié à l'état de TG, le reste étant fait de PL, de cholestérol libre et estérifié. Les VLDL comme les chylomicrons sont transformés par l'action de la LPL. L'hydrolyse des TG par la LPL conduit à la réduction du cœur hydrophobe et donne naissance à des particules intermédiaires, les IDL enrichies en apoB100, apoE et esters de cholestérol. Les IDL subissent à leur tour sous l'action de la lipase hépatique une hydrolyse des TG et donne les LDL. Les LDL sont enrichies en esters de cholestérol et appauvries en TG et ne contiennent plus que une molécule d'apoB100 (Schumaker et al., 1994).

B.2.1.2. Catabolisme des LDL

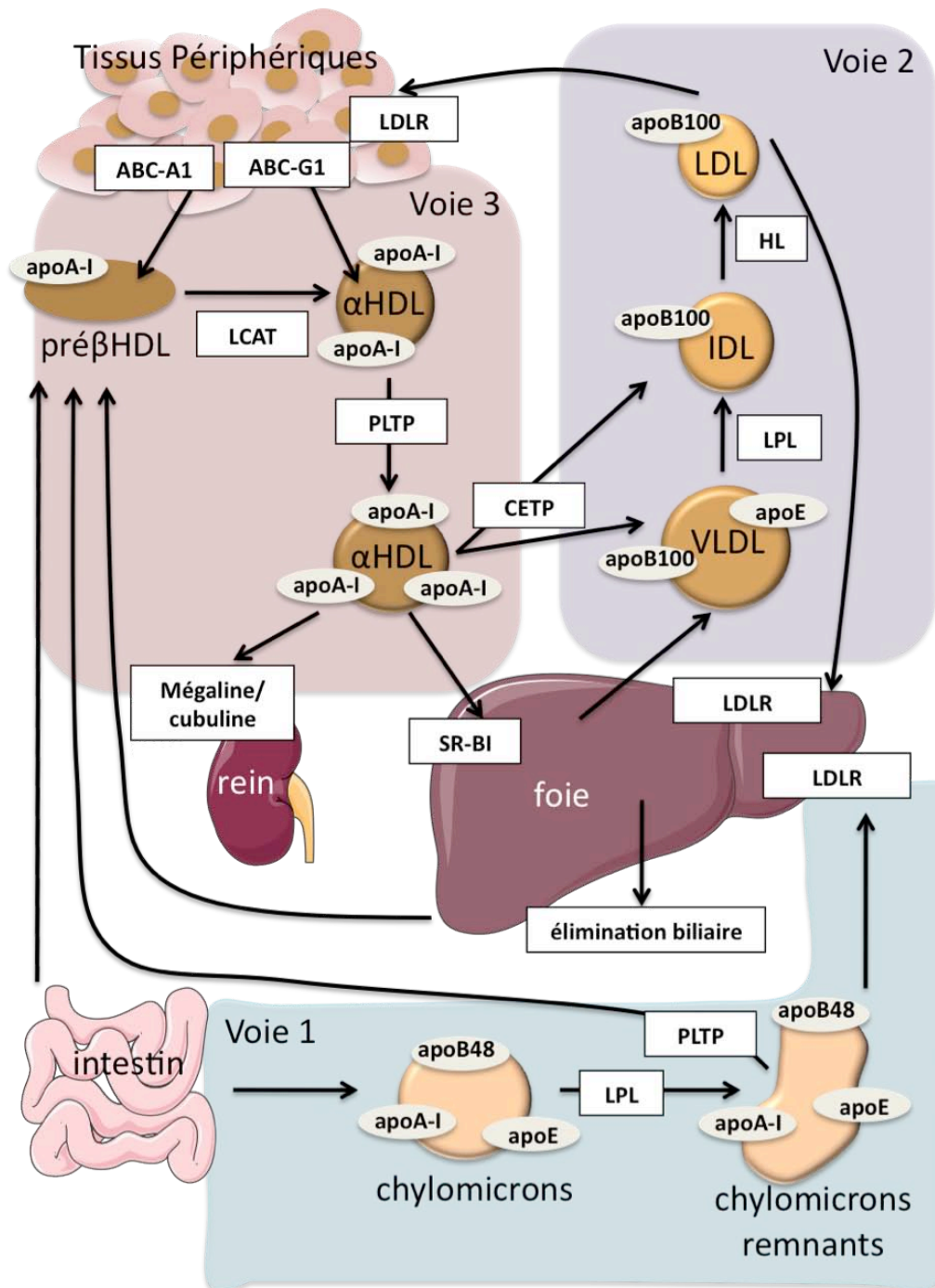


Figure 3. Les trois voies de transport intravasculaire du cholestérol.

Voie 1 : voie entérohépatique, absorption des lipides alimentaires et formation des chylomicrons

Voie 2 : voie d'apport endogène, sécrétion des VLDL (Very Low Density Lipoprotein) riches en triglycérides à partir du foie. Conversion des VLDL en IDL (Intermediate Density Lipoprotein) sous l'action de la LPL, puis en LDL (Low Density Lipoprotein) sous l'action de la LH.

Voie 3 : voie de retour, les lipoprotéines de haute densité (HDL) assurent le transport du cholestérol en excès des tissus périphériques vers le foie. (D'après Gautier et al., 2010).

LPL : lipoprotéine lipase; *LH* : lipase hépatique; *ABCA1* : ATP-binding cassette-type A1; *LCAT* : lecithin/cholestérol acyltransférase ; *ABCG1* : ATP-binding cassette-type G1 ; *PLTP* : phospholipid transfer protein ; *CETP* :cholesteryl ester transfer protein ; *LDLR* : LDL receptor ; *SR-BI* : Scavenger receptor class BI.

Les lipoprotéines impliquées dans la cascade VLDL-IDL-LDL peuvent être internalisées par les différents membres de la famille du récepteur aux LDL (LDLR) qui permettent l'incorporation finale des lipides d'origine hépatique par les tissus périphériques ou par le foie lui-même. Le modèle de captation cellulaire du cholestérol par reconnaissance de la LDL par le LDLR puis par endocytose a été découvert par Brown et Goldstein ce qui leur a valu le prix Nobel de médecine (Brown and Goldstein, 1986).

Le LDLR reconnaît les lipoprotéines porteuses de l'apoB100 (IDL, LDL) (Goldstein and Brown, 1974) ou de l'apoE (VLDL) (Innerarity and Mahley, 1978). Les LDL circulantes se fixent sur leur récepteur LDLR localisé sur la membrane plasmique au niveau de puits recouverts de clathrine. Les complexes LDL/LDLR sont internalisés par endocytose. Le pH à l'intérieur des vésicules d'endocytose conduit à la dissociation des LDL du LDLR qui peut être recyclé vers la membrane plasmique. La fusion des vésicules contenant la lipoprotéine avec les lysosomes conduit à la production d'acides aminés, d'acides gras libres et de cholestérol. Le cholestérol libéré exerce un contrôle du pool cellulaire de cholestérol. L'augmentation de cholestérol libre dans la cellule induit une inhibition du facteur de transcription sterol response element-binding protein (SREBP) (Pai et al., 1998) ce qui induit :

- une inhibition de la synthèse d'une enzyme clé de la synthèse de cholestérol, l'HydroxyMéthylGlutaryl-Coenzyme A (HMG-CoA) réductase.
- une inhibition de la synthèse du LDLR, ce qui permet une diminution de la captation du cholestérol extracellulaire.

Enfin, l'augmentation de cholestérol dans la cellule induit l'activation de l'ACAT (acylCoA-cholestérol-Acyl-Transférase) qui permet de stocker le cholestérol sous forme estérifiée et de diminuer la concentration de cholestérol libre qui peut être toxique pour la cellule à fortes doses. Cependant, l'augmentation de l'estérification du cholestérol provenant des lipoprotéines athérogènes est également à l'origine de la formation des macrophages spumeux (Tabas, 1995 ; Cheng et al., 1995).

B.2.2. Oxydation des LDL

B.2.2.1. Le stress oxydant favorise le développement de la plaque d'athérosclérose

Le stress oxydant, défini par la production exagérée d'ERO par les systèmes enzymatiques des cellules de la paroi artérielle (CE, CML) et des cellules inflammatoires de la lésion (macrophages et lymphocytes T), participe au développement de l'athérosclérose, en particulier, par son rôle dans la modification oxydative des LDL. Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la production des ERO telles que le radical hydroxyle ($\dot{\text{O}}\text{H}$) ou l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot -}$) et les systèmes anti-oxydants représentés par des enzymes (catalase, superoxyde dismutase, glutathion peroxydase), des vitamines (E et C) et divers anti-oxydants (caroténoïdes, betacarotènes, lycopènes et polyphénols) (Yokoyama, 2004).

Parmi les systèmes enzymatiques pro-oxydants, la NAD(P)H oxydase joue un rôle majeur dans le développement de l'athérosclérose. Il a été montré que des souris invalidées pour p47 phox (une des sous-unités de la NAD(P)H oxydase) et apoE (p47 phox^{-/-}, ApoE^{-/-}), développent moins de plaques d'athérosclérose que des souris p47 phox^{+/+}, ApoE^{-/-}. Ceci est dû à une diminution de la production d'ERO au niveau aortique (Barry-Lane et al., 2001). De plus, chez l'homme, la NAD(P)H oxydase est responsable de la production de ERO au niveau d'artères coronaires athérosclérotiques (Azumi et al., 2002).

B.2.2.2. Mécanisme de la peroxydation lipidique

Le stress oxydant dans la lésion favorise l'oxydation des LDL, en particulier sur les substrats préférentiellement oxydables que sont les acides gras polyinsaturés (AGPI). La dégradation en chaîne des acides gras conduit à la formation d'hydroperoxydes instables qui aboutissent à la dégradation de la composante protéique de la LDL. L'oxydation des LDL se déroule en plusieurs étapes représentées sur la figure 4 (Porter et al., 1995) :

- Dans une phase d'initiation, un radical libre (OH^{\cdot} par exemple) soustrait un hydrogène (H) d'un AGPI nommé LH. Ceci conduit à la formation d'un radical alkyle L^{\cdot} .
- Les étapes suivantes sont des étapes de propagation. Le radical alkyle L^{\cdot} peut réagir avec un autre AGPI LH pour donner un autre radical alkyle L^{\cdot} qui se réarrange pour former un diène conjugué et un autre radical alkyle. L'attaque de L^{\cdot} par une molécule d'oxygène conduit à la

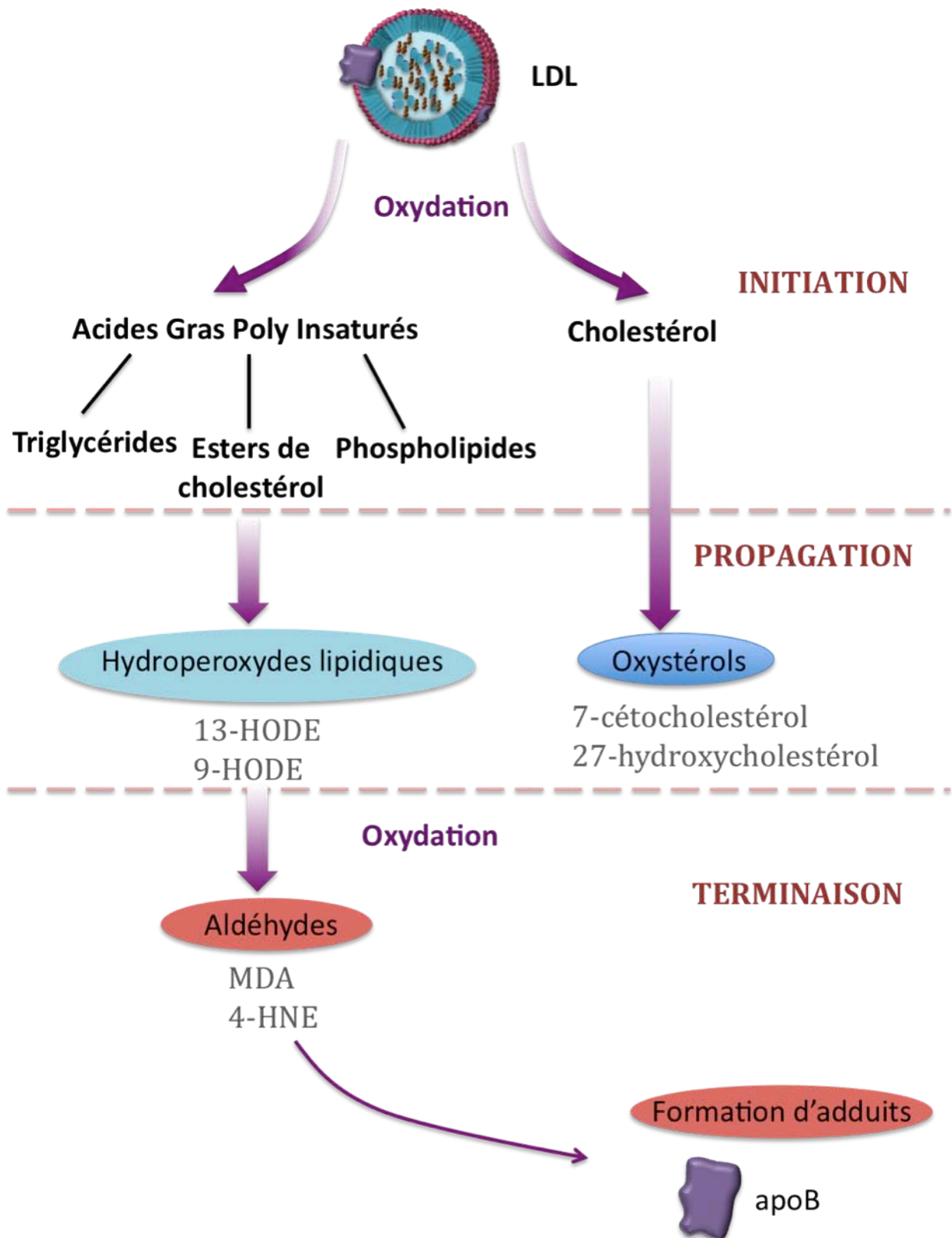


Figure 4. Représentation simplifiée de la peroxydation lipidique.
HODE : acide HydroxyOctaDecaEnoïque; MDA:MalonDiAldéhyde; 4-HNE : 4-HydroxyNonEnal; apoB : apolipoprotéine B; LDL : Low Density Lipoprotein.

formation d'un radical peroxyde LOO^{\cdot} . Le radical peroxyde LOO^{\cdot} arrache à son tour un hydrogène d'un autre APGI et forme ainsi un hydroperoxyde d'acides gras LOOH et régénère le radical L^{\cdot} .

- Ce cycle se poursuit théoriquement à l'infini jusqu'à la phase de terminaison qui survient soit par épuisement du substrat, soit par formation de dérivés stables (alkanes, alcools, cétones, aldéhydes, acides carboxyliques).

B.2.2.3. Les produits de la peroxydation lipidique

➤ Les acides gras oxydés

Au sein de la particule LDL, les AGPI sont présents sous la forme d'esters de phospholipides à la surface et sous forme d'esters de cholestérol ou de triglycérides dans le cœur. Ils sont tous oxydables et peuvent induire des réactions d'oxydation en chaîne des AGPI voisins. L'hydroperoxyde produit à partir de l'acide linoléique est l'acide hydroxyoctadecaénoïque (HODE). Celui produit à partir de l'acide arachidonique est l'acide hydroxyeicosatetraénoïque (HETE). Ces produits d'oxydation des acides gras peuvent être le résultat d'une oxydation non-enzymatique ou enzymatique par les lipoxigénases. Les lipoxigénases sont retrouvées dans les artères athérosclérotiques humaines (Folcik et al., 1995) et contribuent au développement des lésions d'athérosclérose (Heydeck et al., 2001). Ces produits d'oxydation sont les plus abondants retrouvés dans les lésions d'athérosclérose (Waddington et al., 2003) et semblent être corrélés avec l'instabilité des plaques (Mallat et al., 1999).

➤ Les aldéhydes

Les aldéhydes résultent de la dégradation des hydroperoxydes et sont moins stables que ces derniers. Ils peuvent diffuser depuis leur site de production et sont des composés très réactifs et toxiques. La peroxydation enzymatique et non radicalaire des AGPI comportant au moins trois doubles liaisons comme l'acide arachidonique et l'acide docosahexaénoïque peuvent conduire au bis-aldéhyde malondialdéhyde (MDA) (Gueraud et al., 2010). Le 4-hydroxy-2(E)-nonenal (4-HNE) provient de la peroxydation des acides gras $\omega 6$ (Uchida, 2003). Les

aldéhydes interagissent avec l'apoB et plus particulièrement modifient des résidus lysine impliqués dans la reconnaissance de la LDL avec le LDLR (Jessup et al., 1986). La modification de l'apoB par les aldéhydes conduit à une diminution de la reconnaissance de l'apoB par le LDLR mais par une augmentation de la reconnaissance de l'apoB par les récepteurs scavengers des macrophages conduisant à la formation des cellules spumeuses (Steinbrecher, 1999).

➤ Les oxystérols

L'oxydation du cholestérol conduit à la formation d'oxystérols soit par voie enzymatique comme pour le 27-hydroxycholestérol (Lund et al., 1993) soit par voie non enzymatique pour le 7- β -hydroxycholestérol et le 7-cétocholestérol (Brown et al., 1996). Ces trois oxystérols sont parmi les plus abondants dans les LDLox et sont retrouvés dans les plaques athérosclérotiques (Brown et al., 1997). De nombreuses études montrent que les oxystérols sont plus réactifs que le cholestérol non oxydé et induisent des effets pro-inflammatoires et pro-apoptotiques contribuant au développement des plaques. Ainsi, le 7-cétocholestérol et le 7- β -hydroxycholestérol induisent, dans des cellules endothéliales HUVEC, l'expression de molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et sélectines) impliquées dans l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Lemaire et al., 1998). Les oxystérols favorisent également la formation des cellules spumeuses en augmentent l'expression du récepteur scavenger CD36 (Leonarduzzi et al., 2008). Ils induisent également l'apoptose des macrophages (Berthier et al., 2005).

➤ Les phospholipides oxydés

L'oxydation des phospholipides de la couche externe des LDL est réalisée lorsque une molécule d'oxygène est ajoutée dans la chaîne de l'AGPI en position sn-2 ou lorsque celle-ci est clivée. Les principaux produits issus de l'oxydation des phospholipides : le 1-palmitoyl-2-(5-oxovaléroyl)-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine (POVPC), le 1-palmitoyl-2-(glutaroyl)-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine (PGPC) et le 1-palmitoyl-2-(5,6-époxyisoprostanE2)-sn-glycéro-3-phosphatidylcholine (PEIPC), sont surtout présents dans les LDL minimalement oxydées et ont des propriétés pro-inflammatoires (Watson et al., 1997). Les phospholipides oxydés induisent la surexpression de cytokines inflammatoires dont l'IL-8 et le MCP-1 dans

les CE (Gargalovic et al., 2006b). La phospholipase A2 associée aux lipoprotéines (Lp-PLA2) est une enzyme qui hydrolyse les phospholipides oxydés et libère la lysophosphatidylcholine (lyso-PC) qui a des propriétés pro-inflammatoires (Lerman and McConnell, 2008). La mesure de la Lp-PLA2 dans le sang est actuellement utilisée comme marqueur de prédiction du risque cardio-vasculaire (Gorelick, 2008).

B.2.3. LDL oxydées et athérosclérose

B.2.3.1. Les LDL oxydées se retrouvent dans les lésions athérosclérotiques et dans le sang

Des anticorps spécifiques reconnaissant les résidus lysine de l'apoB100 modifiées par les aldéhydes ont permis de montrer que les LDLox sont présentes dans les plaques athérosclérotiques chez le lapin déficient pour le LDLR (Boyd et al., 1989), les souris apoE^{-/-} (Palinski et al., 1994) et chez l'homme (Palinski et al., 1989). Les LDL prélevées à partir de plaques athérosclérotiques ont les mêmes propriétés que les LDL qui sont oxydées in vitro. Elles sont plus denses, elles présentent une plus grande mobilité électrophorétique, elles contiennent plus de cholestérol libre, un plus grand pourcentage de lyso-PC et l'apoB est modifiée. De plus, les LDL des lésions présentent comme les LDLox des propriétés chimiotactiques pour les monocytes (Yla-Herttuala et al., 1989).

Les LDLox sont immunogènes et des auto-anticorps anti-LDLox sont retrouvés dans le sérum chez le lapin et chez l'homme (Palinski et al., 1989). Des titres sériques élevés d'auto-anticorps anti-LDLox sont associés avec un risque élevé de maladie coronarienne (Bui et al., 1996).

Les LDLox sont aussi retrouvées dans la circulation sanguine et représentent un marqueur de risque de l'athérosclérose avancée (Ishigaki et al., 2009). De plus, les LDLox circulantes pourraient participer à la formation des lésions. En effet, la suppression des LDLox circulantes chez la souris apoE^{-/-} prévient totalement la formation des lésions athérosclérotiques (Ishigaki et al., 2008).

B.2.3.2. La reconnaissance des LDLox par les récepteurs scavengers induit la formation des cellules spumeuses

Les LDL non modifiées n'induisent pas la formation des cellules spumeuses. En effet, *in vitro*, les macrophages incubés avec des LDL natives n'internalisent pas un excès de lipoprotéines du à la régulation de l'expression du LDLR par le cholestérol (Goldstein and Brown, 1977). La formation des cellules spumeuses dépend de la reconnaissance des LDLox par les récepteurs scavengers dont l'expression n'est pas rétro-réglée et peuvent donc capter une grande quantité de lipoprotéines et de lipides (Steinbrecher, 1999). Parmi les 7 classes de récepteurs scavengers, SR-AI et SR-AII de la classe A majoritairement exprimés à la surface des macrophages, reconnaissent l'apoB modifiée de la LDL oxydée (Moore and Freeman, 2006). Les phospholipides oxydés sont de bons ligands pour le récepteur CD36 de la classe B des récepteurs scavengers (Podrez et al., 2002). De plus, les oxystérols, particulièrement le 7- α -hydroxycholestérol, induisent l'expression du récepteur CD36 (Brown and Jessup, 1999). Les récepteurs scavengers jouent un rôle important dans le développement des lésions d'athérosclérose. En effet, la délétion de SR-A (Suzuki et al., 1997) ou de CD36 (Febbraio et al., 2000) dans des souris apoE^{-/-} induit une réduction du développement des lésions.

B.2.3.3. Propriétés proathérogènes des LDLox

➤ Les LDLox favorisent la dysfonction endothéliale

Une étude sur des artères isolées de lapin a permis de montrer que les LDLox diminuent la vasodilatation des artères qui est normalement induite par le NO. Or une diminution de la vasomotricité est une caractéristique des artères athérosclérotiques (Kugiyama et al., 1990). De plus, il a été montré que les LDLox induisent une expression de la cavéoline-1 qui inhibe la production du NO en inhibant la eNOS (Feron et al., 1999).

➤ Les LDLox augmentent l'expression de molécules pro-inflammatoires

Les LDLox induisent l'activation des CE. Les LDLox induisent l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 à la surface des CE (Khan et al., 1995). En particulier, il a été montré que la lyso-PC participe à l'induction d'expression de ces molécules et semble donc jouer un rôle important dans l'adhésion des monocytes à leur surface des CE (Kume et al., 1992). De plus, la lyso-PC induit l'expression des facteurs de croissance PDGF et EGF (Epidermal Growth Factor) par les CE, impliqués dans la migration et la prolifération des CML (Kume and Gimbrone, 1994).

Les LDLox induisent l'expression de plusieurs facteurs chimiotactiques par les CE. D'une part l'augmentation d'expression de MCP-1 permet l'attraction des monocytes dans l'espace sous-endothélial (Cushing et al., 1990). D'autre part, l'augmentation d'expression du M-CSF favorise la différenciation et la prolifération des macrophages (Rajavashisth et al., 1990 ; Yla-Herttuala et al., 1991).

➤ Les LDLox participent au développement de la chape fibreuse

Les LDLox participent à la prolifération des CML dans l'intima. Dans le laboratoire, il a été montré que l'effet mitogène des LDLox sur les CML est régulé par l'activation de la voie sphingomyéline/céramide, l'activation des MAPK (Mitogen-Activated Protein kinase) (Auge et al., 1998) et de la voie de survie cellulaire EGFR (EGF récepteur)/PI-3K (phosphatidylinositol 3-kinase) (Auge et al., 2002).

➤ Les LDLox favorisent le développement du cœur lipidique de la plaque

La sphingomyélinase sécrétoire (S-SMase) hydrolyse la sphingomyéline présente dans les membranes plasmiques et dans les particules de LDL. La S-SMase est présente dans les plaques athérosclérotiques et il a été montré in vitro qu'elle pourrait exercer un rôle clé dans l'agrégation des LDLox à l'origine de la facilitation de leur captation par les macrophages et de la formation des cellules spumeuses (Schissel et al., 1998).

➤ Les LDLox favorisent la rupture de la plaque

Les LDLox jouent un rôle dans la déstabilisation de la plaque en affectant la composition en collagène de la chape fibreuse par une augmentation de la production des MMP par les macrophages (Xu et al., 1999).

A côté de ces nombreux effets biologiques des LDLox, il a été montré dans le laboratoire que les LDLox ont des effets cytotoxiques et induisent l'apoptose des CE et des CML (Vindis et al., 2005 ; Ingueneau et al., 2009) ce qui implique une aggravation des lésions. Les voies de signalisation apoptotiques induites par les LDLox seront traitées dans le chapitre *Apoptose et Athérosclérose*.

B.3. HDL et Athérosclérose

Les HDL jouent un rôle important dans la protection contre le développement de l'athérosclérose, ce qui est démontré par la relation inverse entre le taux de HDL-cholestérol (HDL-c) et les risques de maladies cardiovasculaires. L'effet anti-athérogène des HDL est dû en partie à leur capacité à réaliser l'efflux de cholestérol en excès des tissus périphériques vers le foie pour son élimination, ce qui constitue le transport inverse de cholestérol (RCT) (von Eckardstein et al., 2001). Cependant, le rôle anti-athérogène des HDL ne se limite pas au RCT. Du fait de leur composition (apo et enzymes), les HDL regroupent un ensemble de propriétés biologiques qui participent à leur rôle bénéfique contre le développement de l'athérosclérose (Negre-Salvayre et al., 2006).

B.3.1. Taux de HDL-c et risque cardio-vasculaire

De nombreuses données épidémiologiques suggèrent qu'un taux faible de HDL-c est associé à un risque accru de maladie cardiovasculaire (Gordon and Rifkind, 1989). Par convention, la valeur seuil de risque de HDL-c est de 35 mg/dL (0,9 mmol/L) chez l'homme et de 45 mg/dL (1,15 mmol/L) (von Eckardstein et al., 2001). Un taux faible de HDL-c est fréquemment observé chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde prématuré (Genest et al., 1991). Un faible taux de HDL-c et d'apoA-I constitue également un facteur prédictif de risque de survenue d'infarctus du myocarde ou de mort subite chez des patients présentant une angine de poitrine (Bolibar et al., 2000). Corrélativement, l'augmentation du taux plasmatique de HDL-c chez des sujets traités aux fibrates contribue à diminuer les risques de maladies cardiovasculaires (Rubins et al., 1999).

Cependant, à l'inverse du LDL-cholestérol et malgré les données épidémiologiques, le lien de causalité entre HDL-c et maladies cardiovasculaires n'est pas clairement établi (von Eckardstein et al., 2001). Ainsi, la relation inverse entre taux de HDL-c et maladie cardiovasculaire n'est plus vérifiée à partir d'un certain seuil, en effet des taux de HDL-c très élevés semblent favoriser les maladies cardiovasculaires (de Backer et al., 1998). De plus, un taux plasmatique bas de HDL-c s'inscrit souvent dans un ensemble de facteurs définissant le syndrome métabolique (hypertriglycéridémie, hyper-LDLémie, intolérance au glucose,

hyperinsulinémie ...). Il est donc difficile de mesurer le poids réel du HDL-c bas face à l'ensemble de ces autres facteurs pro-athérogènes dans le risque cardiovasculaire (Despres and Marette, 1994).

B.3.2. Métabolisme des HDL

B.3.2.1. Structure et composition des HDL

Les HDL sont traditionnellement définies comme des particules dont la densité est comprise entre 1,063 et 1,21 g/ml. Cependant, les HDL constituent un groupe hétérogène de lipoprotéines qui diffèrent par leur densité, leur taille, leur mobilité électrophorétique, et leur composition en lipides et en apo (Rothblat and Phillips, 2010). Par ultracentrifugation, les HDL peuvent être séparées sur la base de leur densité en deux sous-fractions, HDL2 (1,063-1,125 g/ml) et HDL3 (1,125-1,21 g/ml). Etant donné la relation inverse entre taille et densité de la particule, les particules HDL2 sont les plus grandes (environ 12nm) et les HDL3 les plus petites (environ 7nm) (Havel et al., 1955).

Par ailleurs, les HDL peuvent être séparées en deux grandes sous-populations en fonction de leur mobilité électrophorétique : les α HDL et les pré β -HDL. Les α HDL sont les HDL matures sphériques, elles ont une charge de surface négative et ont une mobilité électrophorétique de type α . Les pré β -HDL sont définies comme les HDL naissantes de forme discoïdale et à mobilité électrophorétique pré β (Castro and Fielding, 1988). Les pré β -HDL sont très minoritaires dans le plasma (5% de l'apo-AI est présente dans les pré β -HDL contre 95% dans les α HDL matures) mais sont néanmoins métaboliquement très actives car elles permettent l'amorçage du RCT.

Les HDL peuvent également être séparées en fonction de leur composition en apo. On distingue les particules LpA-I+A-II qui incluent l'apoA-I et l'apoA-II (ratio 2/1) et les particules LpA-I qui ne contiennent que l'apoA-I. La majorité de l'apoA-I plasmatique humaine (65%) est présente dans les particules LpA-I+A-II contre 25% dans les particules LpA-I (Scanu and Edelstein, 2008).

B.3.2.2. Transport inverse de cholestérol

Le RCT, qui définit le métabolisme des HDL, consiste en cinq étapes (Sviridov and Nestel, 2002) représentées sur la figure 5 :

- 1) l'efflux de cholestérol cellulaire et la formation des pré β -HDL
- 2) l'estérification du cholestérol des HDL par la LCAT (Lecithin cholesterol acyltransferase)
- 3) le transfert du cholestérol des HDL aux lipoprotéines contenant l'apoB
- 4) la conversion des HDL
- 5) la captation du cholestérol des HDL par SR-BI (Scavenger Receptor-class B type I)

B.3.2.2.1. Efflux de cholestérol cellulaire et formation des pré β -HDL

L'origine des pré β -HDL naissantes est mixte : elles peuvent être le produit du remodelage des lipoprotéines contenant l'apoB (chylomicrons ou VLDL) ou provenir d'une sécrétion directe par le foie ou l'intestin.

L'hydrolyse des TG des lipoprotéines à apoB par la LPL conduit à la libération de phospholipides et de molécules d'apo-AI qui constituent le substrat de base pour la formation des pré β -HDL (Musliner et al., 1991). Le remodelage des α HDL sous l'action de diverses enzymes ou lors de la captation finale de cholestérol par le foie permet également de générer des particules pré β -HDL (von Eckardstein et al., 1996).

Le foie (Castle et al., 1991) et l'intestin (Danielsen et al., 1993) synthétisent des molécules d'apo-AI qui par l'action du transporteur ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1) accumulent du cholestérol libre et des PL des cellules périphériques. Ceci définit un autre mode de formation des pré β -HDL (Oram and Yokoyama, 1996).

L'importance de ABCA1 dans l'efflux de cholestérol et dans le métabolisme du HDL-c a été mise en évidence par l'identification de la maladie de Tangier (Fredrickson, 1971) qui est une pathologie génétique récessive autosomale rare causée par des mutations du gène ABCA1. Elle est caractérisée par une absence de HDL-c dans le plasma et une accumulation de cholestérol dans de nombreux tissus. L'accumulation de cholestérol dans les tissus est expliquée par une abolition de l'efflux du cholestérol et des phospholipides cellulaires vers les HDL acceptrices (Francis et al., 1995).

Plusieurs mécanismes sont proposés pour l'action de ABCA1 dans l'efflux de cholestérol. L'apo-AI peut former des complexes avec des phospholipides et du cholestérol via l'activité

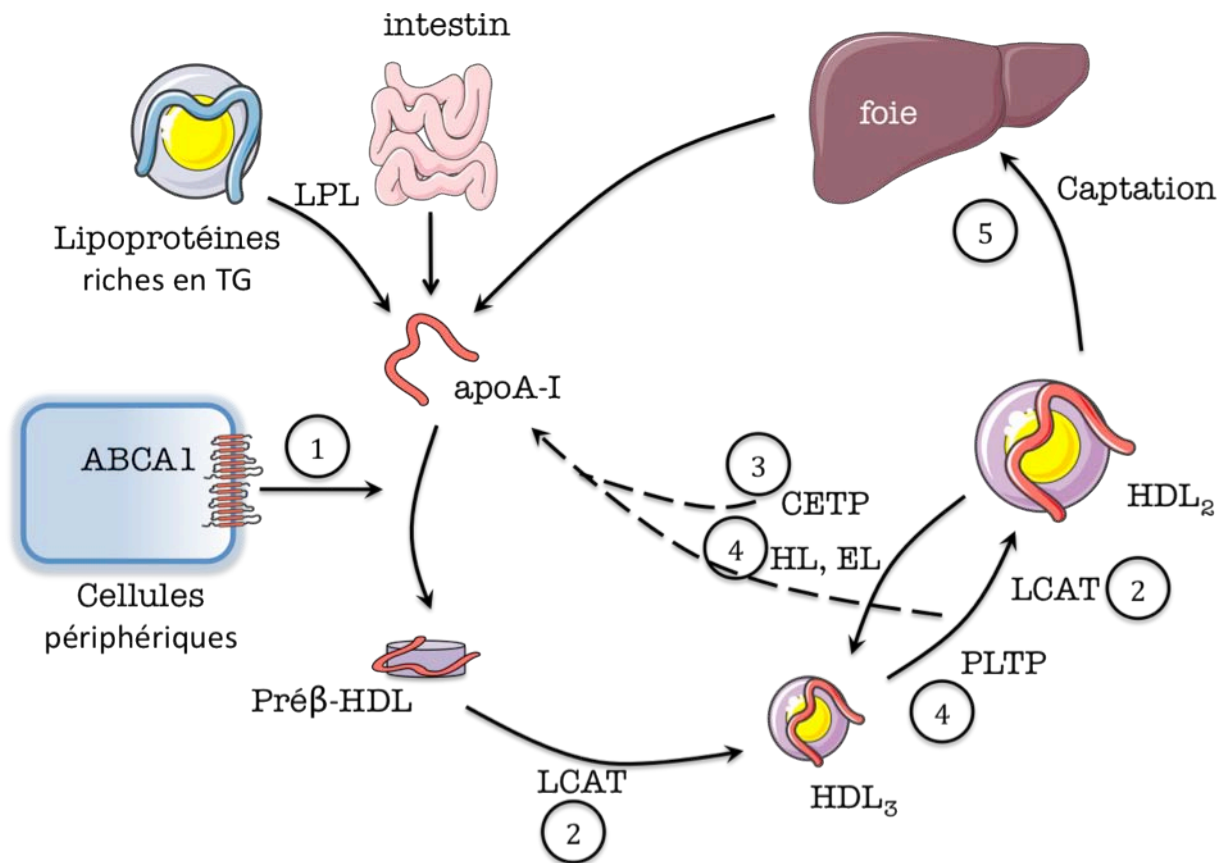


Figure 5. Etapes du transport reverse de cholestérol.

1/ Les HDL naissantes (pré-β-HDL) ou l'apoA-I libre sont produites à partir du foie ou l'intestin, ABCA-1 réalise l'efflux de lipides à partir des cellules périphériques

2/ LCAT réalise l'estérification du cholestérol et génère des particules sphériques qui continuent de grandir

3/ Transfert de cholestérol par action de la CETP qui réalise l'export des esters de cholestérol vers les lipoprotéines contenant l'apoB

4/ Conversion des HDL (hydrolyse des phospholipides par la LH et la LE et conversion des HDL2 en HDL3 par la PLTP)

5/ La captation sélective des esters de cholestérol au niveau du foie et des organes stéroïdogéniques par SR-BI

(D'après von Eckardstein et al., 2001).

HDL: High Density Lipoprotein; apoA :apolipoprotéine A; LCAT : Lecithin cholestérol acyltransférase; ABCA1 : ATP-binding cassette A1; CETP : cholesteryl ester transfer protein; LH : lipase hépatique; LE : lipase endothéliale; PLTP :phospholipid transfer protein; SR-BI : scavenger receptor-BI.

de ABCA1 à la membrane plasmique (Oram et al., 2000). L'autre modèle propose que l'apo-AI puisse se fixer à la membrane à ABCA1 puis être internalisée et ciblée vers les endosomes tardifs où elle recevra des lipides. Les complexes apo-AI/lipides seront alors sécrétés par la cellule par exocytose (Chen et al., 2001).

B.3.2.2.2. Formation des HDL matures

La LCAT est une enzyme plasmatique activée par son co-facteur préférentiel, l'apo-AI (Roosbeek et al., 2001). Elle est aussi activée par l'apoE qui joue un rôle dans l'activation de la LCAT sur les lipoprotéines contenant l'apoB (Zhao et al., 2005). La LCAT réalise l'estérification du cholestérol de la HDL. Cette réaction s'effectue en deux étapes. D'abord la LCAT se fixe sur une HDL et clive un acide gras en position sn-2 de la phosphatidylcholine. Puis cet acide gras est transféré sur une molécule de cholestérol pour former un ester de cholestérol. Les esters de cholestérol étant plus hydrophobes que le cholestérol libre, ils migrent vers l'intérieur de la lipoprotéine. Cette accumulation de cholestérol estérifié au centre de la HDL transforme la pré β -HDL discoïdale et donne naissance aux HDL3 sphériques et pourvues d'un cœur hydrophobe (Jonas, 2000).

La LCAT a deux grands rôles. D'une part, en réalisant la formation d'esters de cholestérol hydrophobe qui migrent au centre de la particule, elle appauvrit la surface de la HDL en cholestérol ce qui permet d'augmenter le gradient de concentration en cholestérol entre la membrane cellulaire et la HDL. D'autre part, l'estérification du cholestérol empêche que celui-ci soit retourné vers la membrane plasmique (Czarnecka and Yokoyama, 1996). Les HDL3 continuent donc de capter du cholestérol libre qui sera estérifié par la LCAT et se transforment en HDL2 enrichies en esters de cholestérol.

B.3.2.2.3. Transfert du cholestérol vers les lipoprotéines contenant l'apoB et remodelage des HDL

L'action de diverses enzymes sur les particules HDL2 les plus larges entretiennent un cycle de régénération des pré β -HDL et d'apo-AI libres qui accumuleront à nouveau du cholestérol et des phospholipides et reformeront des pré β -HDL permettant ainsi de perpétuer le cycle des HDL (Sviridov and Nestel, 2002).

L'enzyme CETP (cholesteryl ester transfer protein) réalise l'échange d'esters de cholestérol des HDL2 avec les TG des VLDL, IDL et LDL. Il y a alors une déstabilisation de l'architecture de la HDL sous l'action de deux lipases. La lipase hépatique (LH) hydrolyse les TG captés par les HDL alors que la lipase endothéliale (LE) hydrolyse les phospholipides (Rader and Jaye, 2000). L'instabilité de la HDL conduit à la formation de HDL3 plus petites et pauvres en lipides et de particules pré β -HDL (Rye et al., 1999).

Le rôle pro ou anti-athérogène de la CETP est discuté. D'une part, la CETP contribue à enrichir les lipoprotéines athérogènes (LDL) en cholestérol même si les esters de cholestérol pris aux HDL sont normalement éliminés de la circulation via la voie du LDLR (Morton, 1999). D'autre part, la CETP régénère des molécules d'apoA-I libres et des particules HDL naissantes et en cela active la voie du RCT (Luo and Tall, 2000).

B.3.2.2.4. Remodelage des HDL

En plus de l'action concertée de la CETP et des lipases hépatiques et endothéliales, les HDL peuvent subir une autre forme de conversion.

La PLTP (phospholipid transfer protein) catalyse la fusion de deux particules HDL3 de tailles intermédiaires (contenant chacune 2 molécules d'apoA-I). Cette fusion donne naissance à une particule HDL2 contenant 3 molécules d'apoA-I et d'une particule pré β -HDL n'en contenant qu'une (Lagrost et al., 1998).

B.3.2.2.5. Captation du cholestérol des HDL au niveau du foie

La captation des esters de cholestérol des HDL par le foie constitue l'étape finale et essentielle du RCT. Le foie est le principal organe permettant de capter le cholestérol en excès des tissus périphériques.

Le récepteur SR-BI joue un rôle majeur dans la captation du cholestérol au niveau hépatique (Acton et al., 1996). La captation sélective des esters de cholestérol des HDL est réalisée suivant un mécanisme n'impliquant pas l'incorporation totale de la particule. La liaison directe des HDL au récepteur SR-BI permet la libération des molécules d'esters de

cholestérol via la formation d'un canal hydrophobe (Williams et al., 1999). Ce mécanisme permet en outre de reformer des particules pré β -HDL.

Le rein peut également constitué un lieu de captation du cholestérol mais selon un mécanisme différent. Le récepteur cubiline réalise l'endocytose de la HDL. Après internalisation la HDL et l'apoA-I sont ciblées aux lysosomes où elles sont dégradées (Moestrup and Kozyraki, 2000).

Les rares HDL contenant l'apoE peuvent être reconnues par le LDLR au niveau du foie et être éliminées par la voie du LDLR (Curtiss and Boisvert, 2000).

Finalement, le cholestérol des HDL capté au niveau du foie est métabolisé dans l'hépatocyte par une voie extralysosomale puis excrété sous forme de cholestérol biliaire.

B.3.3. Propriétés anti-athérogènes des HDL

Outre leur rôle dans le RCT, les HDL possèdent un ensemble de propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires qui participent à leur effet anti-athérogène général (Figure 6).

B.3.3.1. Effet protecteur des HDL sur l'oxydation des LDL

B.3.3.1.1. Effets de l'apoA-I et des autres protéines associées aux HDL

Les propriétés anti-athérogènes des HDL sont largement liées à leur effet inhibiteur sur l'oxydation des LDL.

Les HDL sont capables d'inhiber l'oxydation des LDL in vitro catalysée par les ions métalliques notamment le cuivre (Cu^{2+}) (Ohta et al., 1989). Cet effet est la conséquence de la chélation du Cu^{2+} par deux protéines constitutives de la HDL, la transferrine et la céruloplasmine (Kunitake et al., 1992 ; Huang et al., 1998).

Navab et al. ont montré dans des expériences de coculture de CE et CML modélisant la paroi artérielle que les HDL sont capables de soustraire aux LDL des AGPI oxydés (HODE et HETE) issus de l'action des lipoxygénases (Navab et al., 2000). L'apoA-I joue un rôle particulier dans ce phénomène. En effet, lorsque des LDL isolées à partir d'individus sains contenant des AGPI oxydés sont incubées avec l'apoA-I, HODE et HETE sont transférés des

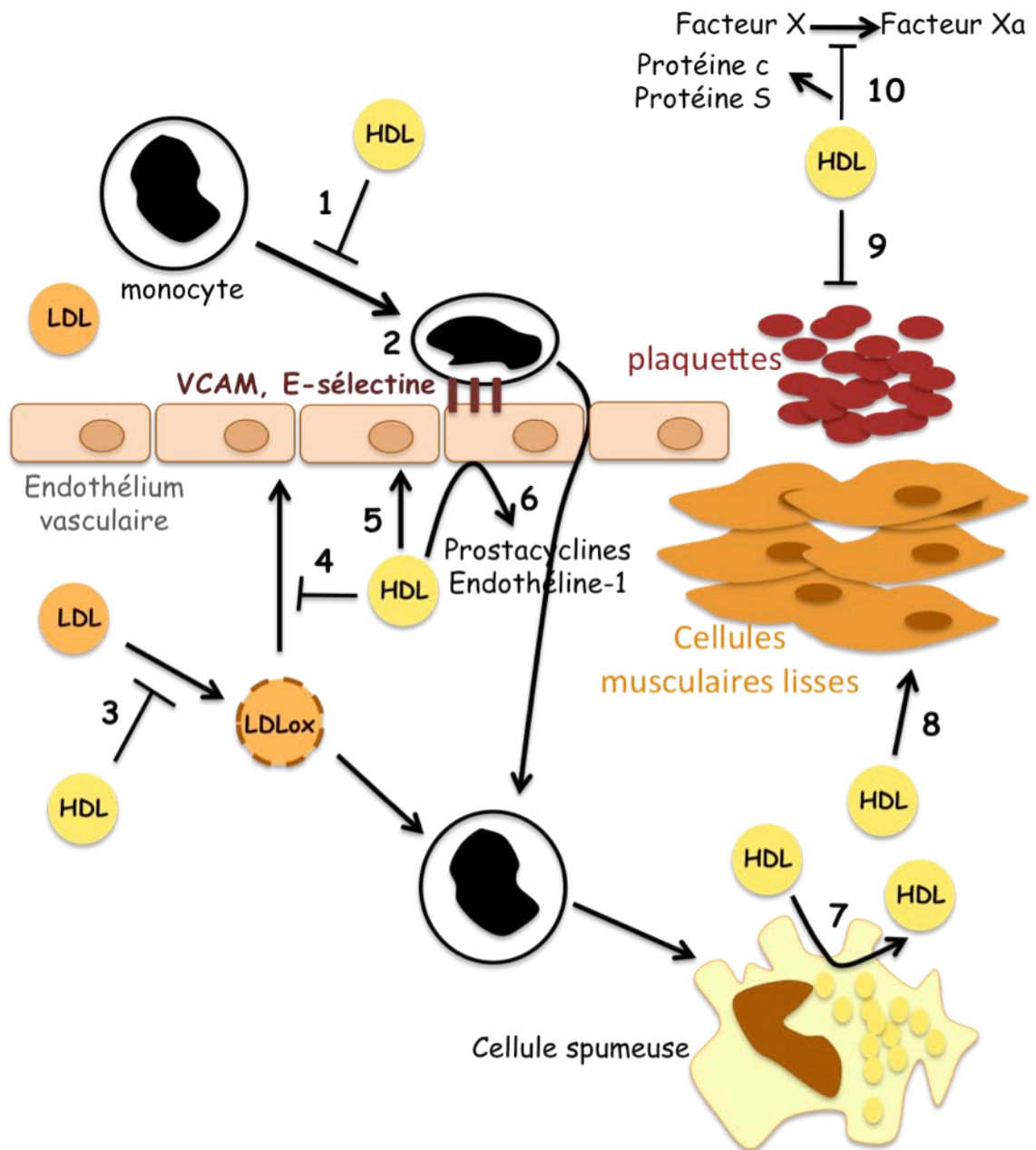


Figure 6. Effets multiples des HDL dans la paroi vasculaire à l'origine de leur action anti-athérogène.

Ces effets incluent :

- (1) L'inhibition de la chimiotaxie des monocytes
- (2) L'inhibition de l'adhésion des monocytes à l'endothélium vasculaire
- (3) L'inhibition de l'oxydation des LDL
- (4) L'inhibition de l'apoptose et de la dysfonction des cellules endothéliales induites par les LDLox
- (5) La stimulation de la prolifération des cellules endothéliales
- (6) La stimulation de la synthèse de prostacyclines et d'endothéline-1 par les cellules endothéliales
- (7) La stimulation du flux de cholestérol des cellules spumeuses
- (8) La stimulation de la prolifération des cellules musculaires lisses
- (9) L'inhibition de l'agrégation des plaquettes
- (10) L'inhibition de la coagulation sanguine

(D'après Nofer et al., 2002) (VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule)

LDL vers l'apoA-I. Par ailleurs, des infusions d'apoA-I chez la souris et chez l'homme rendent les LDL non oxydables (Navab et al., 2000).

De plus, les HDL réduisent des hydroperoxydes d'esters de cholestérol transférés depuis les LDL par l'action de la CETP (Christison et al., 1995). Les HDL convertissent donc des espèces réactives (hydroperoxydes d'esters de cholestérol) en espèces relativement inertes et moins toxiques (hydroxydes) (Sattler et al., 1995). Les HDL sont les transporteurs les plus importants d'hydroperoxydes dans la circulation et jouent un rôle dans leur élimination par le foie (Bowry et al., 1992). Les hydroperoxydes et hydroxydes transportés par les HDL sont rapidement éliminés *in vitro* dans des hépatocytes (Sattler and Stocker, 1993) mais également *in vivo* par le foie et éliminés dans la bile (Fluiter et al., 1996). Les HDL constituent donc un mécanisme de détoxification des lipides oxydés.

B.3.3.1.2. Implication des enzymes associées aux HDL

➤ La paraoxonase

La paraoxonase (PON) est une enzyme calcium-dépendante associée aux HDL capable d'hydrolyser les acides gras oxydés des phospholipides et de réduire l'accumulation de lipides oxydés dans les LDL, réduisant ainsi leurs effets pro-inflammatoires (Aviram and Rosenblat, 2004).

La PON purifiée à partir de HDL humaine catalyse l'hydrolyse des AGPI oxydés en position sn-2 des phospholipides contenus dans les LDLox (Watson et al., 1995).

La PON diminue les capacités pro-inflammatoires des LDLox en hydrolysant des composés tels que le POVPC et le PGPC (Navab et al., 2001) qui stimulent la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-8 et le M-CSF qui induisent l'adhésion entre les monocytes et l'endothélium (Gargalovic et al., 2006b).

Il existe trois PON (PON1, PON2 et PON3) dont le rôle bénéfique dans le développement de l'athérosclérose a été démontré chez la souris. Une invalidation de PON1 ou de PON2 chez la souris conduit à une diminution de l'activité anti-oxydante et anti-inflammatoire des HDL et à une augmentation du développement des lésions d'athérosclérose (Navab et al., 2005 ; Ng et al., 2006). Au contraire, une augmentation de l'expression de PON3 chez la souris apoE^{-/-} diminue la progression de l'athérosclérose (Ng et al., 2007). Chez l'homme, une diminution de

l'activité de la PON1 est associée à une augmentation du risque de maladie coronarienne (Mackness et al., 2002).

➤ La PAF (Platelet-activating factor)-acétylhydrolase (PAF-AH) plasmatique

La PAF-AH est majoritairement associée aux lipoprotéines contenant l'apoB, cependant 20% de la PAF-AH est associée aux HDL (Tselepis et al., 1995). La PAF-AH est une phospholipase A₂ qui hydrolyse les liaisons esters des groupements acyls de courte taille en position sn-2 des phospholipides.

La principale fonction de la PAF-AH est d'hydrolyser le facteur d'activation plaquettaire (PAF) qui est un puissant médiateur lipidique pro-inflammatoire et de le convertir en lysoPAF (Six and Dennis, 2000). Par ailleurs, la PAF-AH est capable de dégrader les phospholipides oxydés (POVPC et PGPC) des LDLox et pourrait donc jouer un rôle protecteur en éliminant les phospholipides oxydés pro-inflammatoires (Watson et al., 1995).

Cependant, le rôle anti-athérogène de la PAF-AH reste discuté car l'hydrolyse des phospholipides oxydés génère également de la lysoPC qui a des propriétés pro-inflammatoires (MacPhee et al., 1999). In vivo cependant, l'augmentation d'expression de la PAF-AH chez la souris apoE^{-/-} diminue le développement des lésions athérosclérotiques (Theilmeier et al., 2000). De plus, il a été montré chez l'homme que des mutations du gène de la PAF-AH entraînant une perte de fonction de la protéine sont associées à une augmentation du risque d'infarctus du myocarde (Yamada et al., 1998).

➤ La LCAT

La LCAT, en plus de sa fonction dans l'estérification du cholestérol, joue un rôle dans la protection de l'oxydation des LDL par les HDL. En effet, la LCAT inhibe la formation d'hydroperoxydes lipidiques dans les LDL (Vohl et al., 1999). La LACT est également capable d'hydrolyser le PAF (Bonelli and Jonas, 1989) et la phosphatidylcholine oxydée générée durant l'oxydation des LDL (Goyal et al., 1997). Une déficience en LCAT conduit à une diminution de l'activité de la PON et de la PAF-AH (Forte et al., 1999) ce qui peut expliquer l'augmentation du risque d'athérosclérose précoce chez les patients présentant un syndrome de déficience en LCAT (Kuivenhoven et al., 1997).

B.3.3.2. Les HDL antagonisent les effets pro-athérogènes des LDLox

B.3.3.2.1. Les HDL améliorent la fonction vasculaire

Plusieurs études chez l'homme montrent que des taux plasmatiques de HDL élevés sont associés avec une augmentation de la relaxation vasculaire (Zeicher et al., 1994). Des infusions de HDL reconstituées (Spieker et al., 2002) ou d'apoA-I (Bisoendial et al., 2003) à des patients hypercholestérolémiques ou présentant des taux plasmatiques faibles de HDL, contribuent à augmenter le taux de HDL-c et améliorent la fonction vasomotrice vasculaire.

Le mécanisme cellulaire sous-tendant cette augmentation de la vasorelaxation implique une modulation de la eNOS et une augmentation de la production de NO (Yuhanna et al., 2001). La eNOS est localisée au niveau de domaines lipidiques particuliers de la membrane plasmique, les cavéoles, dont la structure et la fonction sont liées à leur composition en cholestérol (Feron et al., 1996). Les LDLox induisent une déplétion en cholestérol des cavéoles ce qui a pour effet d'induire la translocation de la eNOS vers des compartiments intracellulaires et donc de diminuer la production de NO (Blair et al., 1999). A l'inverse, les HDL inhibent la translocation de la eNOS induite par les LDLox et restaure la production de NO (Uittenbogaard et al., 2000). Plus particulièrement, les HDL induisent la production de NO via l'interaction entre l'apoA-I et SR-BI. En effet, les souris déficientes pour SR-BI ne produisent pas de NO en réponse aux HDL (Yuhanna et al., 2001).

B.3.3.2.2. Les HDL diminuent l'expression des molécules d'adhésion

Les HDL diminuent un ensemble de voies inflammatoires impliquées dans l'athérogénèse. Les HDL inhibent l'adhésion des monocytes aux CE induite par les LDLox (Navab et al., 1991). En effet, les HDL inhibent l'expression des sélectines induites par les cytokines pro-inflammatoires (Cockerill et al., 2001; Cockerill et al., 1999) et des molécules d'adhésion VCAM et ICAM dans les CE (Ashby et al., 1998). De plus, l'injection de HDL reconstituées à des souris apoE^{-/-} diminue l'expression de VCAM-1 et la formation de lésions d'athérosclérose (Dimayuga et al., 1999).

La diminution de l'expression des molécules d'adhésion par les HDL passe par la modulation de l'activation du facteur de transcription nucléaire pro-inflammatoire NF- κ B (Nuclear factor- κ B). Les LDLox activent la production d'ERO ce qui augmente l'activité du protéasome, la dégradation de l'inhibiteur de NF- κ B (I κ B) et la translocation nucléaire de NF- κ B. A l'inverse, les HDL préviennent l'activation de NF- κ B en diminuant la production de ERO intracellulaires et l'activation du protéasome (Robbesyn et al., 2003).

B.3.3.2.3. HDL et prolifération cellulaire

Les données concernant l'effet des HDL sur la prolifération cellulaire sont assez contradictoires. Des études montrent que les HDL sont en soi de puissants facteurs mitogènes pour les CML en activant la synthèse d'ADN et la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Nofer et al., 2001a) ou potentialisent les effets mitogéniques de facteurs de croissance comme l'EGF ou le PDGF (Resink et al., 1995). Cependant, d'autres études indiquent que les HDL peuvent inhiber l'expression de facteurs de croissance, et en cela pourrait diminuer la prolifération des CML. Par exemple, les HDL diminuent la production de bFGF (Fibroblast Growth Factor basique) par les CML d'aorte bovine traitées par des LDLox et inhibent leur prolifération (Cucina et al., 2006).

L'effet prolifératif des HDL sur les CML pourrait paraître néfaste au vu du rôle crucial de la multiplication des CML dans le développement des lésions athérosclérotiques. Cependant, l'inverse peut également être pris en compte et l'effet prolifératif des HDL sur les CML pourrait avoir un rôle bénéfique sur la stabilité de la plaque en améliorant l'épaisseur de la chape fibreuse (Nofer et al., 2002).

B.3.3.2.4. Effets des HDL sur la migration cellulaire

Les HDL ont différents effets sur la migration cellulaire en fonction du type cellulaire étudié. Un médiateur de l'effet des HDL sur la migration cellulaire est un sphingolipide des HDL, la sphingosine-1 phosphate (S1P). Il a été montré que la S1P inhibe la migration des CML via l'activation du récepteur à la S1P, S1P2, présent sur les CML (Tamama et al., 2005).

De plus, les HDL inhibent l'expression induite par les LDLox par les macrophages de MMP-9 (Xu et al., 1999) qui est impliquée dans la migration des CML (Mason et al., 1999). Ainsi, les HDL pourraient inhiber in vivo l'une des principales caractéristiques du développement des plaques qui est la migration des CML.

A l'inverse, les HDL induisent la migration des CE via la S1P et ses récepteurs S1P1 et S1P3 (Kimura et al., 2003) ou l'apoA-I et SRB-I par un mécanisme dépendant de l'activation de Akt et des MAPK (Seetharam et al., 2006). In vivo, la migration des CE induite par les HDL favorise la réendothélialisation de régions d'artères dénudées de souris, ce qui suggère que les HDL en favorisant l'intégrité de l'endothélium diminuent le risque de formation de lésions d'athérosclérose (Seetharam et al., 2006).

B.3.3.2.5. Effets des HDL sur l'intégrité de la barrière endothéliale

Les HDL maintiennent l'intégrité de la barrière endothéliale et par conséquent la perméabilité sélective aux biomolécules en agissant d'une part sur la migration des CE, comme décrit précédemment, mais également en favorisant les jonctions inter-endothéliales.

L'effet des HDL sur l'intégrité de l'endothélium est médié en partie par la S1P et son récepteur S1P1 qui induisent la fermeture des jonctions serrées (Argraves et al., 2008). L'association entre la S1P et le récepteur S1P1 induit l'activation de la voie Akt puis la formation de complexes entre des protéines constituant les jonctions serrées comme Zonula Occludens-1/ α -caténine (Lee et al., 2006). Par conséquent, les HDL en augmentant la barrière endothéliale sont susceptibles de diminuer la perméabilité de l'endothélium et donc le transport des LDL.

B.3.3.2.6 Les HDL empêchent la formation d'un thrombus

Les LDLox favorisent l'activation des plaquettes et le risque de thrombus qui joue un rôle capital dans la survenue des syndromes coronariens aigus (Korporaal et al., 2007). A l'inverse, les HDL pourraient exercer des effets protecteurs sur la thrombose artérielle en inhibant l'activation et l'agrégation plaquettaire (Aviram and Brook, 1983). Comme montré par Naqvi et al., un taux faible de HDL-c constitue un facteur de risque de la formation d'un thrombus

plaquettaire (Naqvi et al., 1999). Les HDL inhibent l'activation plaquettaire en augmentant la synthèse de NO dans les plaquettes (Chen and Mehta, 1994) par un mécanisme dépendant de la reconnaissance de l'apoE des HDL avec le récepteur à l'apoE des plaquettes et l'activation de la eNOS (Riddell et al., 1999).

La rupture de l'endothélium vasculaire suite à la mort des CE constitue un événement majeur dans la pathogénèse de l'athérosclérose, en favorisant la coagulation et la thrombose. Une des propriétés anti-athérogènes les plus importantes des HDL est son rôle dans la cytoprotection des CE contre divers agents toxiques (Negre-Salvayre et al., 2006). En particulier, les HDL inhibent l'apoptose des CE induite par les LDLox (Suc et al., 1997).

Nous développerons plus en détails dans le chapitre suivant, les voies de signalisation de mort cellulaire induites par les LDLox et l'effet protecteur des HDL sur ces voies.

C/ L'APOPTOSE DANS L'ATHEROSCLEROSE

C.1. Les différents types de mort cellulaire

La mort cellulaire est un processus fondamental nécessaire pour le développement embryonnaire mais également pour le contrôle de l'homéostasie tissulaire dans l'organisme adulte. Trois modes principaux de mort cellulaire ont été décrits : la nécrose, l'apoptose et l'autophagie. L'apoptose et l'autophagie sont des morts cellulaires programmées c'est-à-dire qu'elles sont contrôlées génétiquement alors que la nécrose est considérée traditionnellement comme une mort non régulée (Hotchkiss et al., 2009) (Figure 7).

C.1.1. La nécrose

La nécrose est caractérisée par un gonflement irréversible de la cellule et de ses organelles. La perte de l'intégrité membranaire qui intervient au cours de la nécrose permet un influx d'ions et de liquides extracellulaires qui expliquent le gonflement de la cellule. La perte de l'intégrité membranaire conduit finalement à la lyse de la cellule et au relargage d'enzymes participant à la destruction cellulaire. La nécrose induit une réponse inflammatoire.

C.1.2. L'apoptose

La mort cellulaire par apoptose regroupe un ensemble de caractéristiques morphologiques. Les cellules en apoptose montrent un rétrécissement du noyau, des organites et de la cellule dans son entier. Contrairement à la nécrose, il y a un maintien de l'intégrité membranaire tout au long du processus. L'architecture intracellulaire est déstabilisée due à une dégradation des protéines du cytosquelette, mais également une fragmentation internucléosomale de l'ADN et une condensation de la chromatine. L'apoptose induit également la redistribution des phospholipides membranaires avec une exposition à la surface membranaire des phosphatidylsérines (PS) qui constitue un signal clé pour la phagocytose des cellules en apoptose par les macrophages (Fadok et al., 1992). L'apoptose se termine par le morcellement de la cellule en corps apoptotiques qui augmentent l'efficacité de l'élimination par les macrophages et empêchent l'établissement d'une réponse inflammatoire.

C.1.3. L'autophagie

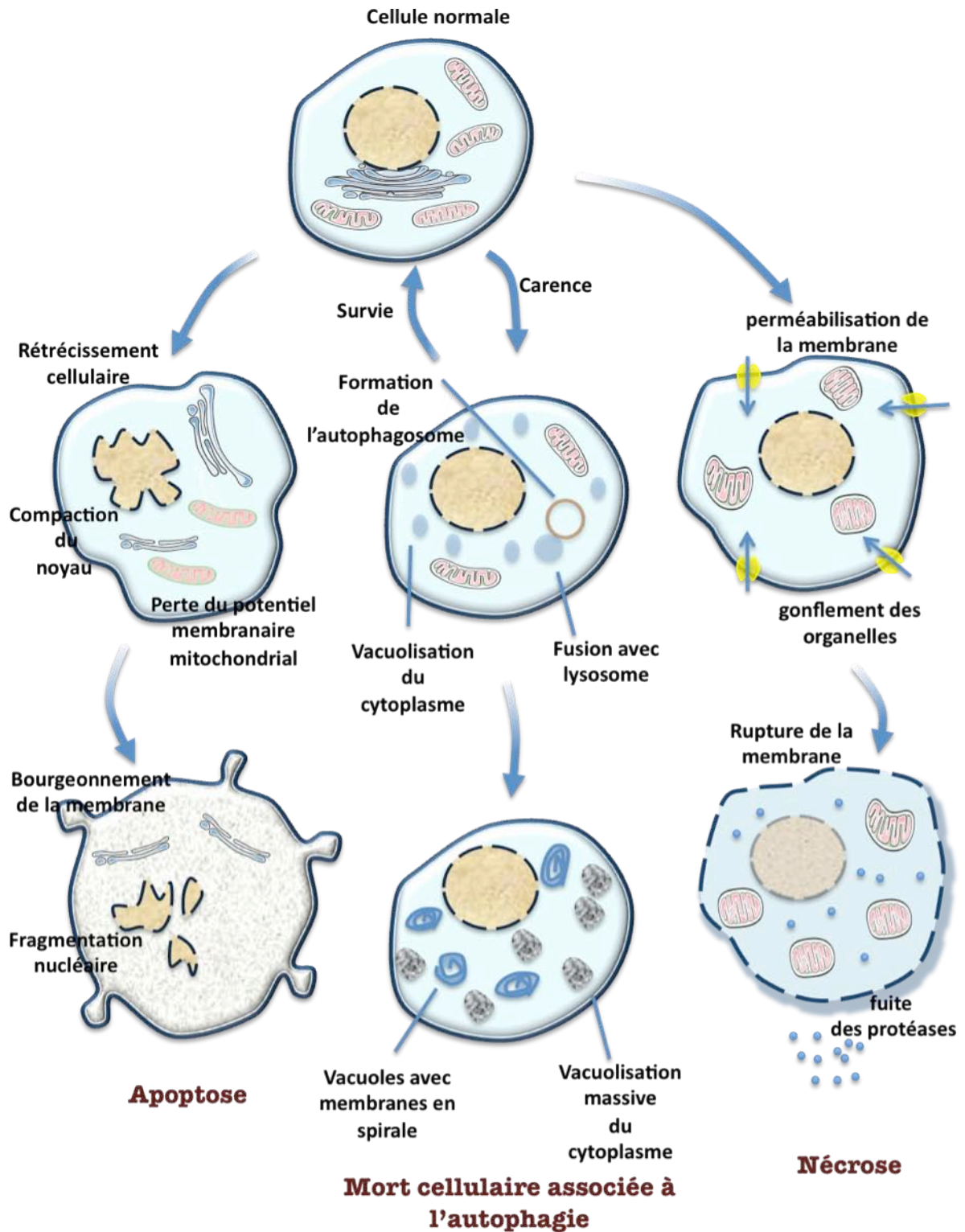


Figure 7. Les trois voies de la mort cellulaire.

Selon les types cellulaires et les stimuli, une des trois voies de mort cellulaire- apoptose, autophagie et nécrose- peut être préférentiellement impliquée. Les caractéristiques morphologiques des trois types de mort cellulaire sont représentés. (D'après Hotchkiss et al., 2009).

L'autophagie est traditionnellement considérée comme un mécanisme déclenché par la cellule pour permettre la survie cellulaire en condition de carence nutritionnelle. En effet, l'autophagie est un processus de dégradation par la voie lysosomale de constituants cellulaires qui fournit à la cellule un apport d'acides aminés ou d'acides gras essentiels à la synthèse protéique ou lipidique. Cependant, une autophagie dérégulée peut également conduire à la mort cellulaire probablement par auto-consommation excessive des constituants vitaux de la cellule. On parle de mort cellulaire associée à l'autophagie plutôt que de mort par autophagie car malgré la présence de nombreuses vacuoles d'autophagie dans des cellules en cours de mort, l'implication directe de l'autophagie dans la mort cellulaire n'est pas clairement établie. En fait, l'autophagie servirait de mécanisme de secours pour induire la mort si l'apoptose est déficiente (Levine and Yuan, 2005).

C.2. Les mécanismes de l'apoptose

Il y a plusieurs voies cellulaires contrôlant l'apoptose, deux voies ont été décrites initialement et sont les mieux caractérisées. Il s'agit de la voie extrinsèque faisant intervenir des récepteurs de mort à la membrane plasmique et de la voie intrinsèque où la mitochondrie joue un rôle central. Ces deux voies conduisent à l'activation de protéases spécifiques, les caspases, qui clivent les résidus aspartates de leurs cibles et sont les véritables effecteurs de l'apoptose (Adams, 2003) (Figure 8).

C.2.1. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque fait intervenir des récepteurs de mort de la membrane plasmique. Les récepteurs de mort sont des membres de la superfamille des TNFR (Tumor Necrosis Factor-receptor) activés par les ligands TNF (Tumor Necrosis Factor). Les récepteurs de mort possèdent dans leur partie cytoplasmique un domaine de mort (DD - death domain) nécessaire à la transmission du signal apoptotique. Les récepteurs à DD comprennent TNFR1, TRAIL/DR (TNF-related apoptosis inducing ligand death receptor) et CD95/Fas et leurs ligands respectifs TNF, TRAIL et FasL (Fas ligand). L'association FasL/Fas induit le recrutement de la molécule adaptatrice possédant un DD, FADD (Fas associated death domain). La liaison de TNF sur TNFR1 induit le recrutement de la molécule adaptatrice

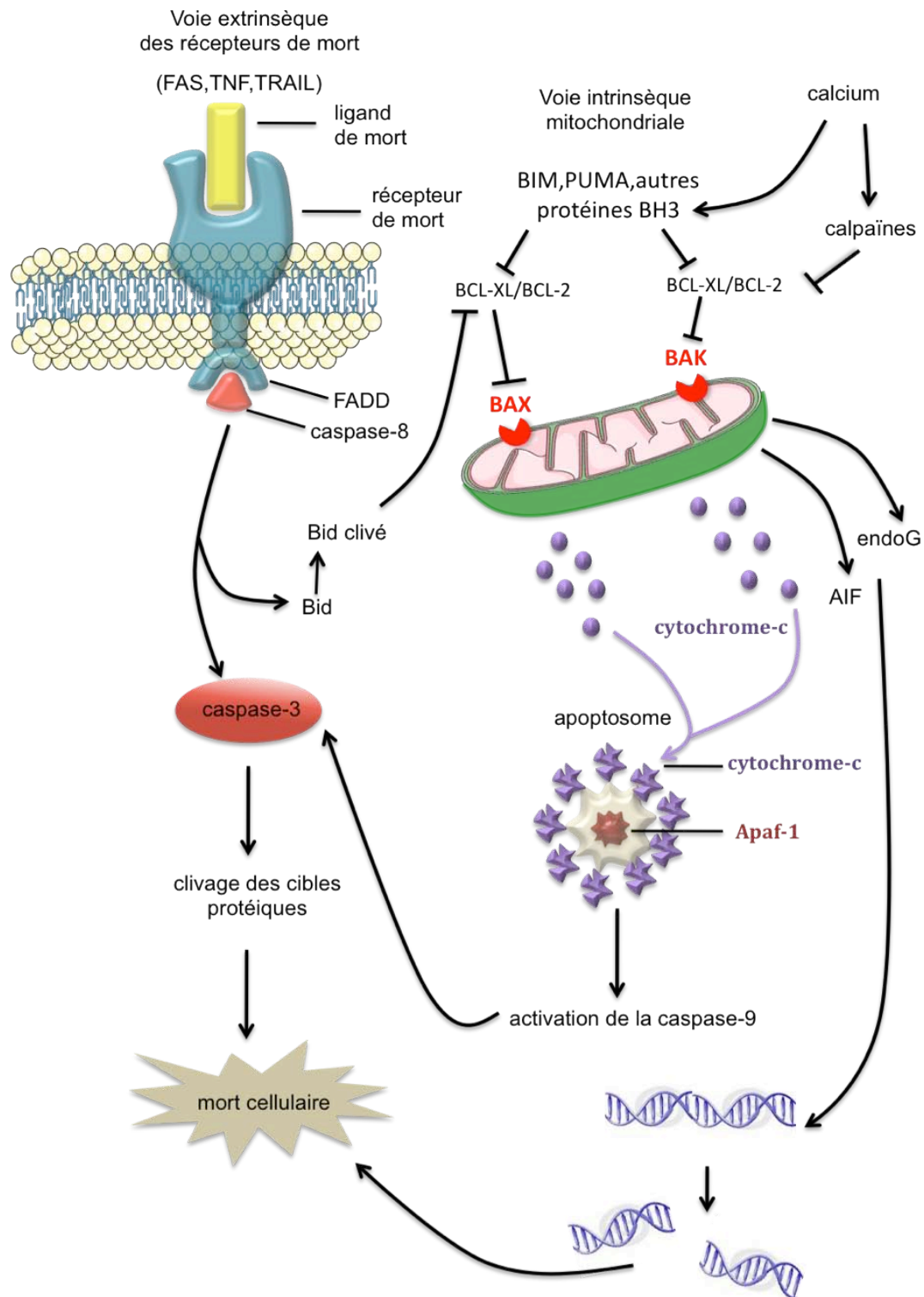


Figure 8. Voies de signalisation apoptotique. (D'après Hotchkiss et al., 2009). *TNF α* : Tumor Necrosis Factor; *TRAIL* : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand; *FADD* : Fas Associated Death Domain; *AIF* : Apoptosis Inducing Factor; *Apaf-1* : Apoptotic Proteases Activating Factor 1; *endoG* : endonucléaseG.

TRADD (TNFRF associated death domain) puis de FADD. L'ensemble ligand/récepteur à DD/TRADD/FADD constitue le complexe multiprotéique de signalisation de mort appelé DISC (Death-inducing signaling complex) (Medema et al., 1997).

FADD et TRADD possèdent dans leur partie N-terminale un domaine effecteur de mort qui lie la procaspase-8. Le recrutement de la caspase-8 au complexe DISC induit l'activation de la caspase-8 et l'activation consécutive des caspases effectrices (-3, -6 et -7).

L'activation des caspases effectrices représente une étape clé dans l'engagement des cellules vers la mort cellulaire. Les caspases effectrices clivent un ensemble de protéines intracellulaires dont des protéines de structure et des protéines régulatrices telles que les lamines, les cytokératines et les poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) et sont directement responsables des changements morphologiques cellulaires importants observés durant l'apoptose (Nicholson, 1999).

C.2.2. La voie intrinsèque

La voie intrinsèque, ou voie mitochondriale, est contrôlée par les membres de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2). Les membres de la famille Bcl-2 peuvent être séparés en trois groupes selon leur nombre de domaine BH (Bcl-2 homology) et leur fonction. Les membres anti-apoptotiques sont Bcl-2 et Bcl-xL et comportent quatre domaines BH (BH 1 à 4). Les membres pro-apoptotiques peuvent être séparés en deux sous-groupes : Bax et Bak qui ont trois domaines (BH 1 à 3), et les membres ne possédant que le domaine BH3 qui sont Bad, Bid et Bim (Adams and Cory, 2001).

Cette voie apoptotique mitochondriale peut être induite par un ensemble de stimuli tels que une augmentation intracellulaire des ERO, un dommage à l'ADN, la voie de l'UPR (Unfolded Protein Response), ou une privation en facteurs de croissance.

Ces stimuli conduisent à l'activation de Bad, Bim ou Bim qui inhibent les membres anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL. Normalement Bcl-2 et Bcl-xL inhibent les membres pro-apoptotiques Bax et Bak mais dans ces conditions, Bax et Bak s'oligomérisent, s'insèrent dans la membrane externe mitochondriale et contrôlent le pore de perméabilité transitoire (PTP). Ceci conduit à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et à la libération de protéines mitochondriales dans le cytosol telles que le cytochrome c, SMAC/diablo (Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP (Inhibitor-of Apoptosis) Binding

protein with LOw pI), AIF (Apoptosis Inducing Factor), et l'endonucléase G qui vont activer des voies de morts cellulaires dépendantes ou non des caspases (Kroemer and Reed, 2000).

La libération du cytochrome c induit la formation de l'apoptosome qui résulte de l'assemblage du cytochrome c avec Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1) et la procaspase-9 (Acehan D mol cell 2002). La caspase-9 activée induit l'activation des caspases effectrices -3 et -7. La caspase-3 clive de nombreux substrats protéiques dont l'endonucléase CAD (caspase-activated DNase) qui transloque vers le noyau, clive l'ADN internucléosomal et induit la condensation de la chromatine (Yuste et al., 2005).

AIF et l'endonucléase G réalisent l'apoptose indépendante des caspases. Une fois libérés de la mitochondrie, ils migrent vers le noyau et fragmentent l'ADN conduisant à la mort cellulaire (Joza et al., 2009).

C.2.3. Le rôle du calcium dans l'apoptose

Le calcium (Ca^{2+}) libre dans le cytoplasme étant toxique pour la cellule, sa concentration est maintenue la plus basse possible par son stockage dans la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (RE). Le Ca^{2+} intracellulaire est finement régulé par un ensemble de pompes et canaux de la membrane plasmique, de la mitochondrie et du (RE). Une augmentation de la concentration de calcium cytosolique est toxique pour la cellule et peut conduire à l'apoptose (Orrenius et al., 2003).

La perturbation de l'homéostasie calcique intracellulaire est impliquée dans la voie de signalisation apoptotique mitochondriale :

- une augmentation de Ca^{2+} libre intracytosolique conduit à l'activation de la calcineurine qui active Bad en le déphosphorylant et induit ainsi la voie intrinsèque mitochondriale (Wang et al., 1999).

- des stimuli pro-apoptotiques comme le céramide ou la staurosporine induisent une augmentation de calcium dans la mitochondrie qui induit l'ouverture du PTP, le relargage de cytochrome c et l'activation des caspases (Szalai et al., 1999).

- le Ca^{2+} active des protéases appelées calpaïnes qui participent activement avec les caspases au clivage de nombreux substrats protéiques au cours de l'apoptose. En fonction de la cible des calpaïnes, elles peuvent avoir une activité pro- ou anti-apoptotique. Ainsi le clivage de Bcl-2 ou Bcl-xL favorise la mort cellulaire.

Comme pour les caspases, le clivage par les calpaines des protéines de structure de la cellule (actine, cytokeratine...) ou des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN comme PARP conduit à la mort cellulaire. Cependant, le clivage des caspases par les calpaines conduit le plus souvent à leur inactivation (Orrenius et al., 2003).

C.3. Rôle de l'apoptose dans le développement des lésions athérosclérotiques

De nombreuses études ont détecté in situ la présence de cellules apoptotiques dans les plaques athérosclérotiques humaines et animales. L'apoptose est quasi absente dans les artères humaines mais est détectée dans les stries lipidiques et augmente fortement dans les plaques avancées. L'apoptose concerne tous les types cellulaires de la plaque (CE, CML et macrophages) (Tedgui and Mallat, 2001).

C.3.1. Apoptose des CE

L'apoptose des CE peut être induite par un grand nombre de stimuli pro-apoptotiques présents dans les plaques athérosclérotiques tels que les cytokines pro-inflammatoires produites par les macrophages et les lymphocytes T (Libby, 2002), les ERO générées par le stress oxydant (Hermann et al., 1997) ou les LDLox (Dimmeler et al., 1997 ; Escargueil-Blanc et al., 1997). L'apoptose des CE est néfaste dans les étapes précoces de l'athérogénèse en favorisant la perméabilité de l'endothélium aux lipoprotéines circulantes (Cancel and Tarbell, 2010) mais aussi dans les étapes tardives en favorisant l'érosion de l'endothélium bordant la plaque athérosclérotique (Tedgui and Mallat, 2001).

L'érosion de l'endothélium sans nécessairement rupture de la plaque est à l'origine des syndromes coronariens aigus ou de la mort subite cardiaque (Farb et al., 1996). L'apoptose des CE contribue à l'érosion des plaques athérosclérotiques et à la formation du thrombus. En effet, l'apoptose des CE entraîne la redistribution des phospholipides membranaires et l'exposition des PS sur le feuillet externe de la membrane plasmique. Or le facteur tissulaire, responsable de l'initiation de la cascade de coagulation et de la formation du thrombus, est activé par les PS (Pei et al., 1993).

L'analyse de plaques athérosclérotiques carotidiennes prélevées par endartériectomie révèle la présence de CE apoptotiques dans 60% des cas. Il semble que les CE apoptotiques soient

localisées dans les zones où le flux sanguin et les forces de cisaillement appliquées à l'endothélium sont faibles (Tricot et al., 2000).

L'apoptose des CE renforce la thrombogénicité des plaques en générant la formation de microparticules libérées dans la circulation sanguine. Ces microparticules sont des structures vésiculaires dérivées de la membrane plasmique de la cellule en apoptose et expriment à leur surface des PS. Les PS exprimés à la surface de ces microparticules peuvent lier les facteurs de coagulation ou le facteur tissulaire et ainsi activer la formation d'un thrombus (Leroyer et al., 2010). La présence de ces microparticules pro-thrombogènes est augmentée dans le sang de patients présentant un syndrome coronarien aigu comparé aux patients avec une angine stable (Mallat et al., 2000).

C.3.2. Apoptose des CML

Dans les étapes initiales de l'athérogénèse, la prolifération des CML contribue largement au développement des lésions. Ainsi, l'inhibition de la prolifération des CML ou l'induction de l'apoptose pourrait permettre de limiter la formation des lésions. En effet, il a été montré que chez l'homme des thérapies anti-prolifératives diminuait la formation de la néo-intima après la pose de stent (Morice et al., 2002). De plus, chez l'animal l'induction de l'apoptose des CML exerce un effet bénéfique sur la formation de la néo-intima (Pollman et al., 1998). Cependant il semble, que l'apoptose des CML dans les stades précoces pourrait également participer à la progression des plaques à cause de l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (Clarke et al., 2008).

Au contraire dans les plaques déjà formées, les CML ont un rôle positif dans la stabilisation des lésions en maintenant l'épaisseur de la chape fibreuse par la production de collagène et de MEC. L'apoptose des CML est donc à ce stade impliquée dans la rupture de la plaque (Weissberg et al., 1996). En effet, l'induction in vivo de l'apoptose des CML dans les stades avancés contribue à la fragilisation des plaques par une diminution de l'épaisseur de la chape fibreuse (Clarke et al., 2006).

C.3.3. Apoptose des macrophages

L'apoptose des macrophages intervient dans tous les stades de développement de la plaque athérosclérotique (Kockx et al., 1998). Comme pour les CML, l'apoptose des macrophages a un rôle bénéfique ou néfaste selon le stade de la lésion athérosclérotique. Plusieurs études dans des modèles animaux montrent que dans les lésions précoces, il y a une relation inverse entre l'apoptose des macrophages et la taille des lésions (Seimon and Tabas, 2009). L'infiltration des monocytes dans l'espace sous-endothélial et la différenciation en macrophages contribuent à la progression des lésions par la sécrétion de molécules pro-inflammatoires (Libby et al., 1996). Dans ce cas, l'apoptose des macrophages au cours des stades précoces pourrait contribuer à retarder la progression des lésions en diminuant la réponse inflammatoire et le recrutement de cellules dans l'espace sous-endothélial (Seimon and Tabas, 2009).

Cependant, les macrophages jouent également un rôle bénéfique dans le développement des lésions d'athérosclérose en réalisant l'épuration des cellules apoptotiques et en évitant ainsi les phénomènes inflammatoires liés à la nécrose secondaire des cellules apoptotiques. Or l'accumulation des lipoprotéines oxydées dans les lésions avancées entre en compétition avec les corps apoptotiques pour la phagocytose par les macrophages (Miller et al., 2003). De plus, les cellules spumeuses sont moins efficaces que les macrophages normaux pour réaliser la phagocytose (Chang et al., 1999). Ainsi, dans les stades avancés des lésions, l'augmentation de l'apoptose des macrophages couplée à une diminution de leur capacité de phagocytose contribuent au développement du cœur nécrotique (Tabas, 2005).

C.4. Signalisations apoptotiques induites par les LDLox

Les effets pro-apoptotiques des LDLox sont transmis par plusieurs voies apoptotiques dépendantes ou indépendantes des caspases (Figure 9).

C.4.1. Activation de la voie extrinsèque

Les LDLox induisent l'apoptose des CE en activant la voie des récepteurs de mort en particulier Fas/FasL. L'utilisation d'anticorps neutralisant FasL protège de l'apoptose induite par les LDLox. Les LDLox renforcent leur effet sur cette voie en augmentant l'expression de FasL à la surface des CE (Sata and Walsh, 1998b). Par ailleurs, des oxystérols présents dans

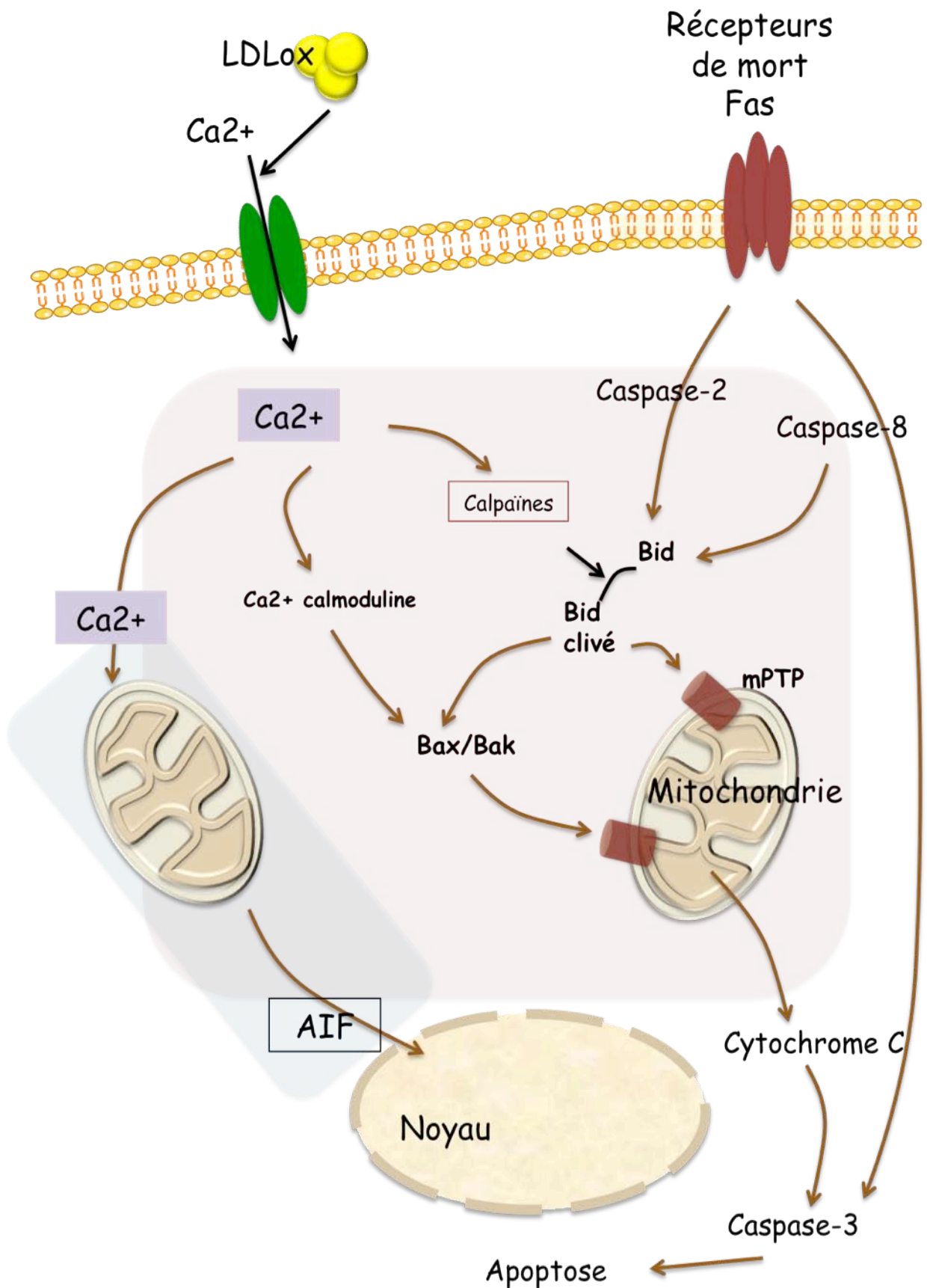


Figure 9. Voies de signalisation apoptotiques induites par les LDL oxydées. (D'après Vindis et al., 2005) AIF : Apoptosis inducing Factor; mPTP : mitochondrial Permeability Transition Pore.

les LDLox, le 7 β -hydroxycholestérol et le 25-hydroxycholestérol, induisent la voie Fas/FasL et l'apoptose des CML (Lee and Chau, 2001).

L'activation de la voie Fas/FasL par les LDLox induit le recrutement de FADD et de pro-FLICE (FADD-homologous ICE-like pro-tease) activée en FLICE qui participe à l'activation des caspases. Or les LDLox inhibent la protéine inhibitrice de FLICE (FLIP) renforçant ainsi l'activation de la voie de mort Fas/FasL (Sata and Walsh, 1998a).

C.4.2. Activation de la voie intrinsèque

Les LDLox, le 7-cétocholestérol et le 25-hydroxycholestérol induisent l'activation de la caspase-3 dans les CML et dans les CE (Ares et al., 1997 ; Nishio et al., 1996) ; Dimmeler et al., 1997). Plusieurs données suggèrent que l'activation de la caspase-3 se fait par la voie intrinsèque mitochondriale :

- Les LDLox induisent le relargage du cytochrome c dans le cytosol (Walter et al., 1998)
- Un inhibiteur du PTP, la cyclosporine A, inhibe le relargage du cytochrome c par les LDLox et l'apoptose (Vindis et al., 2005; Walter et al., 1998)
- Les LDLox modulent l'expression des membres de la famille Bcl-2. Ils induisent l'expression de Bax (Kataoka et al., 2001), et inhibent l'expression de Bcl-2 et Bcl-xL (Li et al., 1998) favorisant ainsi l'établissement de la voie intrinsèque.

Des inhibiteurs de caspases à large spectre (Z.VAD.FMK) ou plus spécifique contre la caspase-3 (Z-DVED.FMK) réduisent significativement mais non totalement l'apoptose induite par les LDLox (Wintergerst et al., 2000 ; Yang and Sinensky, 2000) ; Vindis et al., 2005). Le fait que les inhibiteurs de caspases ne bloquent pas totalement l'apoptose induite par les LDLox suggère qu'une voie supplémentaire indépendante des caspases soit impliquée. En effet, les LDLox induisent le relargage de AIF de la mitochondrie et sa translocation vers le noyau par un mécanisme indépendant des caspases (Zhang et al., 2004 ; Vindis et al., 2005).

C.4.3. Rôle du calcium dans l'apoptose induite par les LDLox

Les LDLox induisent dans des CE de façon précoce des petites augmentations de Ca²⁺ cytosolique sous forme d'oscillations (Sanson et al., 2008). Mais ils induisent également une forte augmentation de calcium cytosolique appelé pic calcique qui intervient après 10 à 12

heures de stimulation. Ce pic calcique est intense et soutenu durant 4 à 6 heures (Escargueil-Blanc et al., 1997; Escargueil-Blanc et al., 1994).

Les oxystérols peuvent également induire un influx de Ca^{2+} et l'apoptose consécutive des CE et des CML (Ares et al., 2000; Ares et al., 1997). Le 7-cétocholestérol induit, dans une lignée de monocytes humains THP1, une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire qui conduit à l'apoptose par la voie intrinsèque mitochondriale via l'activation de BAD (Berthier et al., 2004) et de Bim qui inhibe l'effet anti-apoptotique de Bcl-2 (Berthier et al., 2005).

L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique induite par les LDLox a pour conséquence d'induire de nombreuses enzymes dépendantes du Ca^{2+} qui sont des endonucléases qui détruisent l'ADN ou des protéases qui altèrent le cytosquelette (Escargueil-Blanc et al., 1994 ; Meilhac et al., 1999). Le Ca^{2+} peut également activer les calpaïnes, ce qui conduit au clivage de Bid, au relargage du cytochrome c et finalement à l'activation de la caspase-3 (Porn-Ares et al., 2003 ; Vindis et al., 2005).

Le mécanisme participant à l'influx de Ca^{2+} dans le cytosol et à l'apoptose a été récemment décrit dans le laboratoire (Ingueneau et al., 2009). Récemment, un canal membranaire impliqué dans l'influx de Ca^{2+} induit par les LDLox a été identifié. Les LDLox induisent la translocation de TRPC1 (Transient receptor potential canonical 1) vers la membrane plasmique dans les structures cavéole/cavéoline-1. L'activation de TRPC1 participe à l'influx de Ca^{2+} intracellulaire à l'origine de l'activation de la voie mitochondriale conduisant à l'apoptose (Ingueneau et al., 2009).

C.5. Effet antiapoptotique des HDL

Les HDL protègent de l'apoptose induite par plusieurs stimuli pro-apoptotiques comme le TNF- α (Sugano et al., 2000), la privation en facteurs de croissance (Nofer et al., 2001b) ou les LDLox (Suc et al., 1997). L'effet anti-apoptotique des HDL dépend de l'apoA-I mais aussi de la S1P. Les effets cellulaires anti-apoptotiques des HDL ne sont que partiellement connus et font intervenir des mécanismes dépendant de la voie intrinsèque mitochondriale, du Ca^{2+} ou l'activation de voie de survie comme Akt (Negre-Salvayre et al., 2006). L'effet anti-apoptotique des HDL est également lié à la capacité d'efflux de cholestérol par les HDL. En effet, les HDL inhibent l'apoptose des macrophages induite par les LDLox en augmentant l'efflux de 7-cétocholestérol via le transporteur ABCG1 (Terasaka et al., 2007).

Les HDL inhibent l'apoptose des CE induite par une privation en facteur de croissance en bloquant la voie mitochondriale par une inhibition de la dissipation du potentiel mitochondrial, de la génération des ERO et de la libération de cytochrome c dans le cytoplasme. En conséquence, les HDL préviennent l'activation des caspases-3 et -9. De plus, la liaison de la HDL sur SR-BI et l'apport concomitant de S1P sur les récepteurs S1P1 et S1P3, active la voie Akt qui phosphoryle et inactive la protéine pro-apoptotique BAD (Nofer et al., 2001b).

Il semble que la sous-fraction HDL3c, plus petite et plus dense, exerce une activité anti-apoptotique plus importante que la sous-fraction HDL2. Les HDL3c bloquent la signalisation apoptotique intrinsèque induite par les LDLox (de Souza et al., 2010). L'apoA-I joue un rôle important dans l'effet anti-apoptotique des HDL3c. En effet, les HDL3c de patients présentant un syndrome métabolique ont une altération de la composition en apoA-I et une capacité diminuée à protéger les CE contre l'apoptose induite par les LDLox (de Souza et al., 2008). Dans le laboratoire, il a été montré que l'effet protecteur des HDL pourrait impliquer une inhibition des mécanismes à l'origine de l'influx calcique (Suc et al., 1997).

Parallèlement aux voies principales de l'apoptose décrites dans ce chapitre, il existe une voie de signalisation apoptotique initiée au cours d'un stress du réticulum endoplasmique. Les voies de signalisations apoptotiques induites suite à ce stress et leurs conséquences physiopathologiques dans l'athérosclérose seront détaillées dans le chapitre suivant.

D/ LE STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE

D.1. Généralités sur le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organelle majeur de la cellule eucaryote. Le RE est un réseau membranaire étendu qui délimite un espace luminal continu s'étendant à travers le cytoplasme. Le RE constitue ainsi un compartiment isolé du cytosol qui permet de maintenir un milieu pro-oxydant et riche en Ca^{2+} essentiel à ses fonctions. L'espace luminal du RE occupe 10% du volume cellulaire total alors que l'ensemble de ses membranes représente près de la moitié des membranes cellulaires. Parmi les fonctions majeures du RE, on retient le processus de biogénèse des protéines comprenant leur synthèse et leur maturation par des modifications post-traductionnelles. Le RE est également un lieu de stockage du Ca^{2+} intracellulaire très important grâce à la présence de transport actif de Ca^{2+} du cytoplasme vers la lumière du RE.

Le RE est formé de 3 parties distinctes : l'enveloppe nucléaire, le réticulum endoplasmique rugueux (RER) et le réticulum endoplasmique lisse (REL), auxquelles on associe des domaines de contacts avec d'autres organelles notamment la mitochondrie, l'appareil de Golgi et la membrane plasmique.

Le RER et le REL se distinguent aisément d'un point de vue morphologique en microscopie électronique. Le RER tire son nom de la présence de nombreux ribosomes à sa surface qui lui confèrent un aspect granuleux, alors que le REL exempt de ribosome présente une forme plus repliée ou tortueuse.

Dans les cellules à forte capacité de synthèse protéique, le RER est particulièrement abondant, en effet les ribosomes qui lui sont associés sont le site de la synthèse protéique. Le RER participe spécifiquement à la synthèse des protéines luminales du RE, des protéines de l'appareil de Golgi, des endosomes, des lysosomes et des protéines sécrétées.

Le REL exerce des fonctions distinctes suivant le type cellulaire. Dans les cellules musculaires squelettiques et cardiaques, il est le lieu de stockage du Ca^{2+} impliqué dans la contraction cellulaire. Dans les cellules hépatiques, il participe à la glycogénèse et la

glycogénolyse, au métabolisme de certains médicaments et à la synthèse stéroïdienne (Baumann and Walz, 2001).

D.2. Fonctions du réticulum endoplasmique

D.2.1. Stockage du calcium intracellulaire

Le RE joue un rôle central dans la régulation du Ca^{2+} intracellulaire. Il représente un réservoir important de Ca^{2+} permettant le relargage de Ca^{2+} dans le cytosol en réponse à divers stimuli et il assure le pompage du Ca^{2+} en excès dans le cytosol après une stimulation (Burdakov et al., 2005). La concentration de Ca^{2+} libre dans le cytoplasme est de 100nM, la concentration totale de Ca^{2+} dans le RE est de 1mM (dont 200 μM de Ca^{2+} libre, le reste étant associé à des molécules de liaison CaBPs (luminal Ca^{2+} binding protein)).

La concentration de Ca^{2+} intraluminaire est régulée par la présence de récepteurs canaux à la surface des membranes du RE, les IP3R (inositol-1,4,5-trisphosphate receptor) et les RyR (ryanodine receptor), qui permettent la sortie de Ca^{2+} vers le cytosol et des pompes SERCA (Sarco(endoplasmic reticulum Ca^{2+} -transport ATPase) qui assurent l'entrée de Ca^{2+} dans le RE.

D.2.1.1. Les canaux IP3R

L'IP3R est un récepteur canal intracellulaire qui permet le relargage de Ca^{2+} dans le cytoplasme depuis le RE. L'IP3R appartient à une superfamille de canaux ioniques à six domaines transmembranaires. L'IP3R fonctionnel est un tétramère, la séquence linéaire de chaque sous-unité est composée d'une partie N-terminale lieu du domaine de liaison de l'IP3 (inositol-1,4,5-trisphosphate) et comportant également un domaine suppresseur inhibant la liaison de l'IP3, et d'une région C-terminale contenant les six domaines transmembranaires qui forment le canal calcique. Chez les mammifères, trois isoformes codées par trois gènes différents ont été identifiées, IP3R type 1 à 3, ayant des affinités différentes pour l'IP3

probablement du à des différences au niveau du domaine suppresseur (Mikoshiha, 2007). Les IP3R sont majoritairement localisés au niveau du RE mais ils sont également retrouvés au niveau de la membrane plasmique, du noyau, de l'appareil de Golgi et des vésicules sécrétoires (Taylor et al., 2009).

L'IP3R est activé par l'IP3, second messenger produit à partir du phosphatidyl inositol bisphosphate (PIP2). A part l'IP3, le principal régulateur de l'IP3R est le Ca^{2+} qui agit selon un effet biphasique avec une activation du canal lorsque la concentration cytosolique de Ca^{2+} est faible et une inhibition lorsque la concentration est forte. Il semble que le Ca^{2+} puisse réguler directement l'IP3R par des domaines de liaison au Ca^{2+} cytosolique (Taylor and Laude, 2002). Il a été montré que Bcl-2 interagit avec le domaine régulateur de l'IP3R par son domaine BH4, cette interaction permet d'inhiber l'efflux de Ca^{2+} du RE qui joue un rôle déterminant dans l'induction de l'apoptose (Rong et al., 2009).

D.2.1.2. Les canaux RyR

Les RyR sont des récepteurs canaux localisés dans les membranes de RE qui régulent la sortie de Ca^{2+} du RE. Ce sont des homotétramères composés de sous-unités de 550 kDa. Le canal est formé d'une large partie transmembranaire composé de six à huit segments, les deux extrémités N- et C-terminales sont localisées dans le cytoplasme (Hamilton and Serysheva, 2009).

Trois isoformes de RyR ont été identifiées chez les mammifères (RyR1, RyR2, RyR3) partageant 65% d'homologie. Les muscles squelettiques expriment majoritairement l'isoforme RyR1 et en faible quantité RyR3. L'isoforme du muscle cardiaque et du cerveau est RyR2. L'activité des RyR est modulée par de nombreux agents dont le Ca^{2+} et l'ATP. Le Ca^{2+} exerce un effet biphasique sur l'activité de RyR1 et RyR2, causant une activation à faible concentration de Ca^{2+} cytosolique et une inhibition à forte concentration (Laver, 2009).

D.2.1.3. La pompe SERCA

La pompe SERCA permet, grâce à un transport actif de Ca^{2+} , de rétablir le niveau normal de Ca^{2+} dans le cytosol mais aussi de reconstituer le stock intraluminal de Ca^{2+} , après une stimulation cellulaire.

La pompe SERCA est une chaîne polypeptidique unique repliée en quatre domaines majeurs : un domaine transmembranaire composé de dix hélices transmembranaires et trois domaines cytosoliques.

Les deux sites de liaison aux ions Ca^{2+} se situent au niveau du domaine transmembranaire. Le transport de deux ions Ca^{2+} nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Le transport se fait par un mécanisme de changement de conformation de la molécule qui passe d'un état de haute affinité pour le Ca^{2+} du côté cytosolique de la membrane du RE à un état de basse affinité du côté lumenale permettant ainsi le relargage des ions (Wuytack et al., 2002). Les vertébrés possèdent 3 gènes SERCA (ATP2A1-3) chacun codant plusieurs isoformes de protéines : SERCA1a/b, SERCA2a/b, SERCA3 a/b/c/d/e. Toutes les isoformes sont adressées au RE, cependant elles n'ont pas le même profil d'expression, ainsi les isoformes SERCA1a/b sont présentes au niveau du réticulum sarcoplasmique des muscles striés squelettiques à contraction rapide. L'isoforme SERCA2 est l'isoforme ubiquitaire, SERCA2a est exprimée dans le réticulum sarcoplasmique du cœur et des muscles lisses et striés squelettiques à contraction lente. SERCA2b est présente dans tous les autres types cellulaires et présente la plus grande affinité pour le Ca^{2+} à cause de la présence d'une extension au niveau C-terminale de la protéine (Vandecaetsbeek et al., 2009). La pompe SERCA est régulée par le NO par une S-glutathiolation sur le groupement thiol la cystéine -674 qui active l'entrée de Ca^{2+} dans le RE, ceci est impliqué dans un grand nombre de phénomènes biologiques tels que la relaxation ou la migration des CML. Or un stress oxydant important peut inhiber l'activité des SERCA par des modifications irréversibles des groupements thiol et ainsi diminuer la réponse au NO de l'endothélium, à l'origine de la dysfonction endothéliale et de l'athérosclérose (Tong et al., 2010).

D.2.1.4. Signalisation calcique induite par les pompes et canaux du RE

Une augmentation de la concentration cytosolique de Ca^{2+} due à une entrée de Ca^{2+} extracellulaire induit le relargage de Ca^{2+} depuis le RE selon un mécanisme d'auto-amplification appelé « Calcium-Induced calcium Release » (CICR). Le CICR induit par les

RyR ne dépend que de l'activation par le Ca^{2+} , alors que le CICR induit par les IP3R dépend de l'activation par le Ca^{2+} et l'IP3 (Endo, 2009).

Par ailleurs, l'IP3, qui induit un relargage du stock de Ca^{2+} du RE, engendre une entrée rapide de Ca^{2+} extracellulaire selon un mécanisme appelé « entrée capacitive de calcium ». L'entrée capacitive de Ca^{2+} permet l'établissement d'un pic calcique intracellulaire pouvant être impliqué dans certaines voies apoptotiques dépendantes du Ca^{2+} (Shan et al., 2008).

D.2.2. Maturation des protéines par les chaperones du RE

Les protéines sont synthétisées dans le cytosol cependant une étape de maturation dans le RE est nécessaire pour certaines. Il s'agit des protéines solubles soit sécrétées par la cellule ou restant dans la lumière du RE et des protéines membranaires de la membrane plasmique et d'autres organelles. Le RE participe ainsi à la maturation d'environ un tiers des protéines humaines synthétisées.

Les protéines sont adressées au RE au cours de leur traduction et comportent dans leur chaîne polypeptidique une séquence signal reconnue par la protéine SRP (signal recognition particule). Le complexe formé par la chaîne polypeptidique liée à la SRP est alors adressé à la membrane du RE où se trouve le récepteur à la SRP. La chaîne polypeptidique migre par un canal du RE appelé translocon qui permet suivant le type de protéine, une translocation totale ou partielle dans la lumière du RE. Dans la lumière du RE, les protéines sont alors prises en charge par des protéines chaperones qui permettent la formation des ponts disulfure et le repliement de la protéine dans sa forme native (Rapoport, 2007).

La maturation des protéines est assurée par la présence de trois classes de chaperones dans la lumière du RE : 1) les chaperones à site lectine, calnexine et calreticuline, 2) les chaperones de la famille Hsp70 (BiP/GRP78, GRP170/ORP150), 3) les chaperones de la famille HSP90, GRP94 et 4) les thiol oxidoréductases.

D.2.2.1. Les chaperones à site lectine

Les chaperones à site lectine sont la calnexine et la calreticuline, elles présentent une forte homologie dans leur séquence d'acides aminés, leur structure et leur fonction. Leur principale différence réside dans leur localisation au sein du RE.

La calreticuline est une protéine de 46 kDa localisée dans la lumière du RE. Elle est adressée au RE grâce à la présence d'une séquence spécifique à son extrémité N-terminale. Elle possède le motif KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) qui permet sa rétention dans le RE.

La calnexine est une protéine transmembranaire de type I de 90 KDa enchâssée à la membrane du RE, elle possède en N-terminal une séquence signal d'adressage au RE, un domaine transmembranaire, l'extrémité C-terminale se trouve dans le cytoplasme et contient la séquence RKPRRE (Arg-Lys-Pro-Arg-Arg-Glu) qui permet sa rétention dans le RE (Michalak et al., 2002).

Les chaperones à site lectine participent au cycle de glycosylation/déglycosylation des protéines. Dans la lumière du RE, la protéine subit une N-glycosylation par ajout de groupements glycans sur les résidus asparagine de la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr. Ces groupements glycans très hydrophiles permettent de masquer les régions hydrophobes qui pourraient empêcher le repliement correct de la chaîne polypeptidique. Ce sont des chaînes de carbohydrates composés de neuf mannoses arrangés en trois branches et trois glucoses. Après hydrolyse par des glucosidases des deux premiers glucoses, la protéine est reconnue par la calnexine et la calreticuline. Lorsque le dernier glucose est hydrolysé, les chaperones se détachent de la protéine. Si celle-ci présente un repliement correct, elle peut quitter le RE. Si de mauvaises conformations persistent, un nouveau glucose est transféré au groupement N-glycan faisant entrer la protéine dans un nouveau cycle de reconnaissance par les chaperones à site lectine jusqu'à ce qu'elle atteigne sa conformation native (Pearse and Hebert, 2010). Les chaperones à site lectine lient une oxydoréductase ERp57 (ER protein of 57 kDa) qui appartient à la famille des protéines disulfide isomérase (PDI) et qui stabilise le repliement de la protéine en catalysant la formation de ponts disulfures (Michalak et al., 2009).

En plus de son rôle de chaperone, la calreticuline lie 50% du Ca^{2+} du RE. En effet, elle contient un domaine-C à son extrémité C-terminale où une forte présence d'acides aminés chargés négativement crée un domaine de liaison aux ions Ca^{2+} .

D.2.2.2. Les chaperones de la famille Hsp70

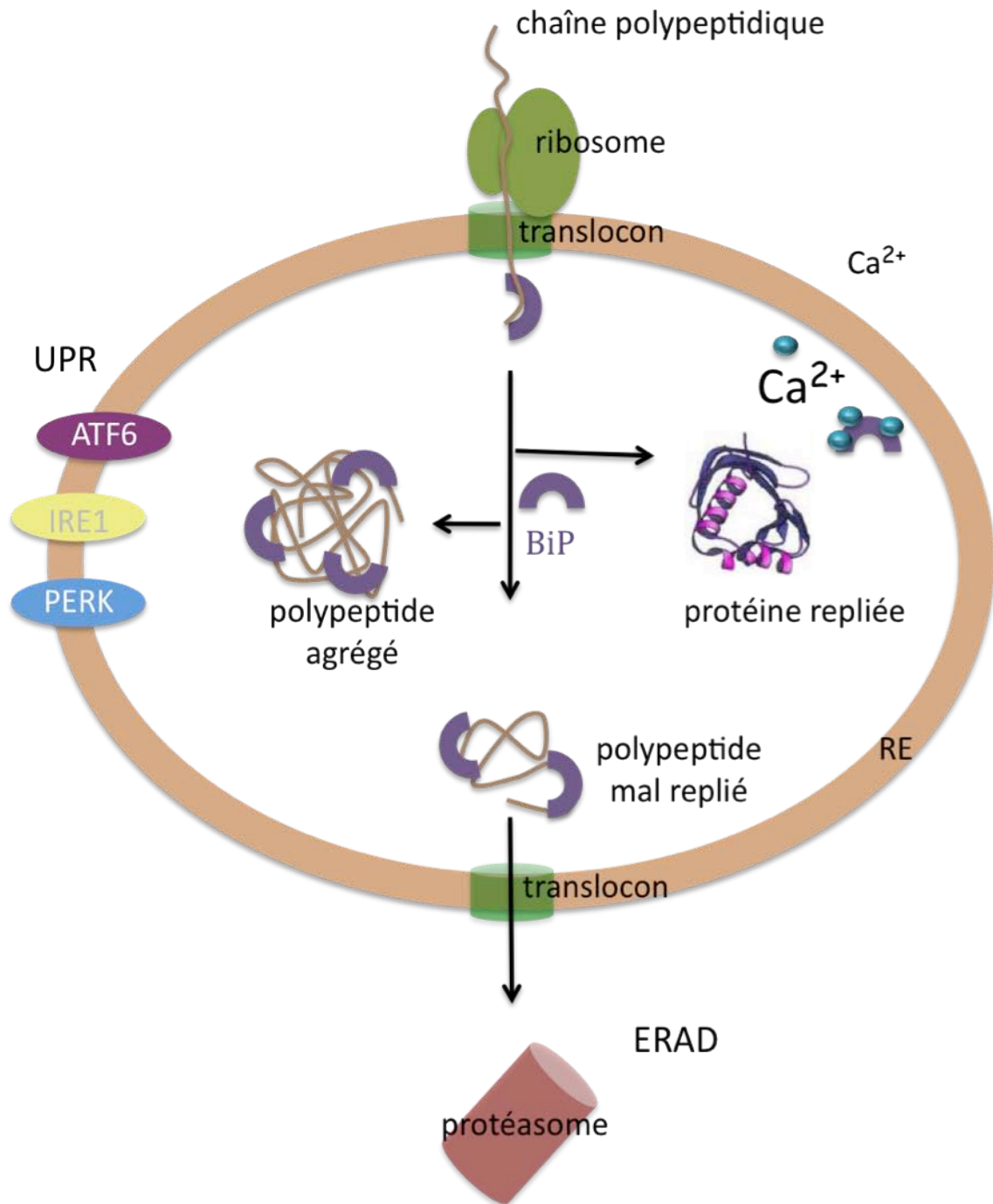


Figure 10. Les différentes fonctions de la chaperone BiP. (D'après Dudek et al., 2009).

ERAD: Endoplasmic Reticulum associated protein degradation ; UPR : Unfolded protein response ; RE ; réticulum endoplasmique; IRE1 : inositol requiring enzyme ; ATF6 :activating transcription factor ; PERK : PKR (protein kinase regulated by RNA) like endoplasmic Reticulum Kinase.

Les chaperones de la famille Hsp70 sont composées d'un domaine N-terminal adénosine triphosphatase (ATPase) de 44 kDa et d'un domaine C-terminal de liaison au substrat de 15 kDa (Mayer and Bukau, 2005). Ces chaperones participent à la maturation des protéines en se fixant sur des régions hydrophobes de la protéine naissante selon un cycle ATPase. La chaperone se fixe sur son substrat dans un état ATP de faible affinité. L'association avec des co-chaperones permet l'hydrolyse de l'ATP en ADP+Pi, dans cet état la chaperone acquiert son maximum d'affinité pour le substrat. L'échange d'un ADP par un ATP par les nucléotide exchange factor permet la libération du substrat. La famille Hsp70 regroupe GRP78/BiP, le membre le plus abondant et GRP170/ORP150 qui est minoritaire dans la lumière du RE (Dudek et al., 2009).

BiP (Binding Immunoglobulin Protein), initialement identifiée comme un cofacteur de l'assemblage des immunoglobulines, est également appelée GRP78 (Glucose-Regulated Protein 78 kDa) et représente l'une des chaperones dont les fonctions sont les mieux caractérisées (Dudek et al., 2009) (Figure 10) :

- BiP participe avec le translocon à l'import des protéines dans la lumière du RE.
- en masquant les sites hydrophobes des protéines mal repliées, elle prévient ainsi leur agrégation.
- BiP assure l'élimination des protéines mal repliées. En effet, BiP achemine les protéines non conformes vers le protéasome par une rétro-translocation via le translocon. Les protéines mal repliées sont alors ubiquitinées et dégradées par le protéasome. Ce système est connu sous le terme de ERAD (Endoplasmic Reticulum Associated Degradation).
- BiP lie le Ca^{2+} avec une faible affinité. Son activité est inhibée par de fortes concentrations en Ca^{2+} , à l'inverse une déplétion en Ca^{2+} stimule son activité ATPase.
- de plus, BiP est l'un des acteurs majeurs de l'induction de l'UPR (Unfolded Protein Response).

La protéine ORP150 (Oxygen regulated Protein 150 kDa) a été découverte dans une étude visant à identifier les protéines exprimées en conditions d'hypoxie sévère. En conditions hypoxiques, ORP150 joue un rôle important dans la maturation des protéines grâce à sa capacité de fixer l'ATP avec une plus grande affinité que les autres chaperones du RE (Heacock and Sutherland, 1986). Plusieurs études montrent un rôle de ORP150 dans la maturation des protéines en conditions de stress, notamment du VEGF (vascular endothelial growth factor) dans des macrophages en conditions d'hypoxie (Ozawa et al., 2001) ou du

collagène dans des fibroblastes cultivés dans un milieu pauvre en glucose (Cechowska-Pasko et al., 2007).

De nombreuses études rapportent le rôle anti-apoptotique de ORP150 :

- l'expression de ORP150 est induite dans des neurones soumis à un environnement hypoxique (Kuwabara et al., 1996). Dans ces conditions, ORP150 inhibe l'apoptose des neurones en bloquant le relargage du cytochrome c et l'activation de la caspase-3 (Tamatani et al., 2001).

- des expériences d'ischémie/reperfusion dans le rein ou dans le coeur de rat, montre que ORP150 est induite dans ces organes et participe à la survie des cellules rénales et des cardiomyocytes (Bando et al., 2004b ; Aleshin et al., 2005).

D.2.2.3. La famille des chaperones Hsp90

Comme GRP78, GRP94 possède un domaine de liaison à l'ATP au niveau de la région N-terminale, son activité dépend de l'hydrolyse de l'ATP (Ostrovsky et al., 2009). A la différence de GRP78 qui prend en charge les protéines non repliées, GRP94 intervient sur les protéines partiellement repliées libérées par GRP78. GRP94 favorise en particulier la biosynthèse de certaines protéines sécrétées ou membranaires comme les immunoglobulines (Melnick et al., 1994) ou les Toll-like récepteurs (Randow and Seed, 2001). En plus de son rôle de chaperone, GRP94 est l'une des protéines qui possède la plus grande capacité de liaison du Ca^{2+} dans la lumière du RE et joue un rôle important dans l'homéostasie calcique (Macer and Koch, 1988). De nombreuses études montrent des propriétés anti-apoptotiques de GRP94. En effet, une surexpression de GRP94 peut notamment inhiber l'apoptose dans une lignée cellulaire de neuroblastome en maintenant l'homéostasie calcique de la cellule et en inhibant l'activation de la caspase-3 et des calpaïnes (Bando et al., 2004a).

D.2.2.4. Les thiol-oxydoréductases

L'espace luminal du RE est un environnement oxydant permettant l'activité d'enzymes qui catalysent la formation des ponts disulfures dans la chaîne polypeptidique en cours de maturation, ce processus est la maturation oxydative des protéines (figure 11) et est effectuée

par une famille d'enzymes appelées "Protéines disulfide Isomérase (PDI)" qui comporte actuellement 19 membres. Les PDI contiennent une séquence signal induisant la localisation dans le RE et au moins un domaine thioredoxine-like. Le site catalytique de l'enzyme contient un motif CXXC comportant deux cystéines plus deux autres acides aminés. Lorsque le site actif de l'enzyme est oxydé, il catalyse l'échange entre des groupements thiol et une liaison disulfure dans une protéine acceptrice. A l'inverse, lorsque le site actif est réduit, il peut réarranger des ponts disulfures non natifs par son activité isomérase/réductase (Appenzeller-Herzog and Ellgaard, 2008). Après oxydation de la protéine et formation de ponts disulfures, PDI est ensuite oxydée par ERO1 (Endoplasmic Reticulum Oxidoreductase 1), une oxydase FAD (Flavine Adenine Dinucleotide)-dépendante, elle-même oxydée par l'oxygène (Tu and Weissman, 2004).

De nombreuses études montrent que PDI est impliquée dans la protection contre la mort cellulaire. Dans certaines pathologies neurodégénératives ou lors d'ischémie cérébrale, l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE conduit à une dysfonction du RE et à la mort neuronale (Hu et al., 2000). Or, l'induction de PDI permet de diminuer l'accumulation de protéines mal repliées au sein du RE et participe à la survie des neurones soumis à l'hypoxie (Tanaka et al., 2000). L'étude post-mortem de cerveaux de patients présentant des maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer montre que l'activité enzymatique de PDI est inhibée par S-nitrosylation des résidus cystéines du site catalytique. Cette inhibition de PDI conduit à une accumulation de protéines mal repliées et à la mort des neurones (Uehara et al., 2006). PDI joue également un rôle bénéfique lors de l'ischémie cardiaque. En effet, son expression est augmentée en condition d'hypoxie et protège de l'apoptose les CE des capillaires du myocarde (Tian et al., 2009).

D.3. Le Stress du Réticulum endoplasmique

Toute perturbation des fonctions du RE provoque un stress du RE caractérisé par une accumulation de protéines immatures dans la lumière du RE. Ce stress conduit à l'établissement d'un ensemble de voies de signalisation cytoplasmiques et nucléaires collectivement appelées Unfolded Protein Response (UPR) (Figure 12). Trois évènements cellulaires majeurs sont activés au cours de l'UPR :

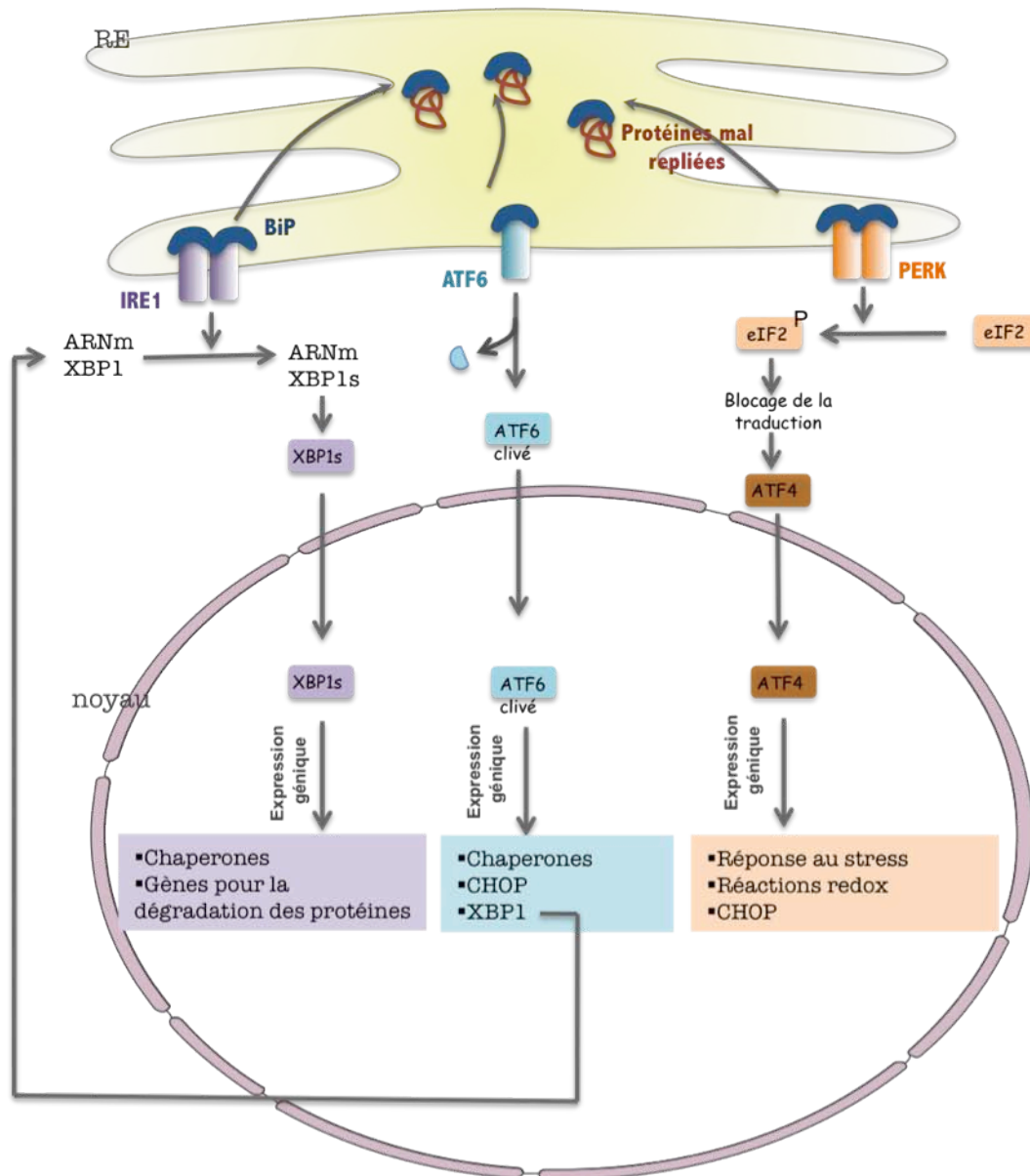


Figure 12. La réponse UPR.

La dissociation de BiP (Binding Immunoglobulin Protein) sur les trois senseurs du stress du RE entraîne l'activation des voies de l'UPR (Unfolded Protein Response). PERK est activé en premier et inhibe la traduction des ARNm, puis ATF6 et IRE1. L'activation des trois facteurs de transcription de l'UPR, XBP1s, ATF6 et ATF4 entraîne l'activation des gènes de chaperonnes ou pour la dégradation des protéines. L'action de l'UPR a pour conséquence de restaurer l'homéostasie du RE. (D'après Szegezdi et al., 2006).

IRE1 : Inositol-requiring kinase 1; *PERK* : PKR (protein kinase regulated by RNA) like endoplasmic Reticulum Kinase; *ATF* : Activating Transcription Factor; *RE* : Réticulum Endoplasmique; *eIF2 α* : eucaryotic translation Initiation Factor -2, α subunit; *CHOP* : C/EBP homologous protein; *XBP1s* : X-box-binding protein 1 spliced form.

- la diminution de l'afflux de nouvelles protéines dans le RE en diminuant la traduction de nouveaux ARNm
- l'augmentation de la transcription de certains gènes, notamment des chaperones du RE, qui vont permettre d'accroître la capacité de maturation des protéines dans le RE
- la dégradation des protéines mal repliées par le système ERAD

De nombreuses situations peuvent engendrer un stress du RE :

- l'accumulation de protéines virales dans le RE au cours d'une infection virale (von dem Bussche et al., 2010)
- la perturbation de la N-glycosylation des protéines dans la lumière du RE en cas de privation en glucose (Benavides et al., 2005)
- un déséquilibre de l'environnement redox de la lumière du RE causé par l'hypoxie ou des agents oxydants, interfère avec la formation des ponts disulfure et engendre l'accumulation de protéines mal repliées (Frandsen et al., 2000)
- une hyperglycémie chez la souris conduit à une augmentation de la synthèse d'insuline par les cellules β du pancréas. Dans le même temps, les cellules β déclenchent physiologiquement l'UPR pour limiter la synthèse protéique et l'apport de pro-insuline dans le RE (Harding et al., 2001).

A l'origine des voies de signalisation de l'UPR se trouvent des « senseurs » du stress du RE. Ces senseurs au nombre de trois, sont des protéines transmembranaires enchâssées dans la membrane du RE avec une extrémité N-terminale dans le lumen permettant l'activation et une partie C-terminale cytoplasmique effectrice. Il s'agit de PERK (PKR (protein kinase regulated by RNA) like endoplasmic Reticulum Kinase), IRE1 α (Inositol-requiring kinase 1) et ATF6 (Activating Transcription Factor 6) (Figure 13). La chaperone BiP exerce un mécanisme commun de régulation des senseurs par association/dissociation sur l'extrémité N-terminale.

D.3.1. La réponse UPR

D.3.1.1. Régulation des senseurs du stress du RE par BiP

La chaperone BiP joue en rôle central dans l'activation des voies de l'UPR. En absence de stress, BiP exerce un contrôle négatif sur les senseurs en se fixant sur leur l'extrémité N-

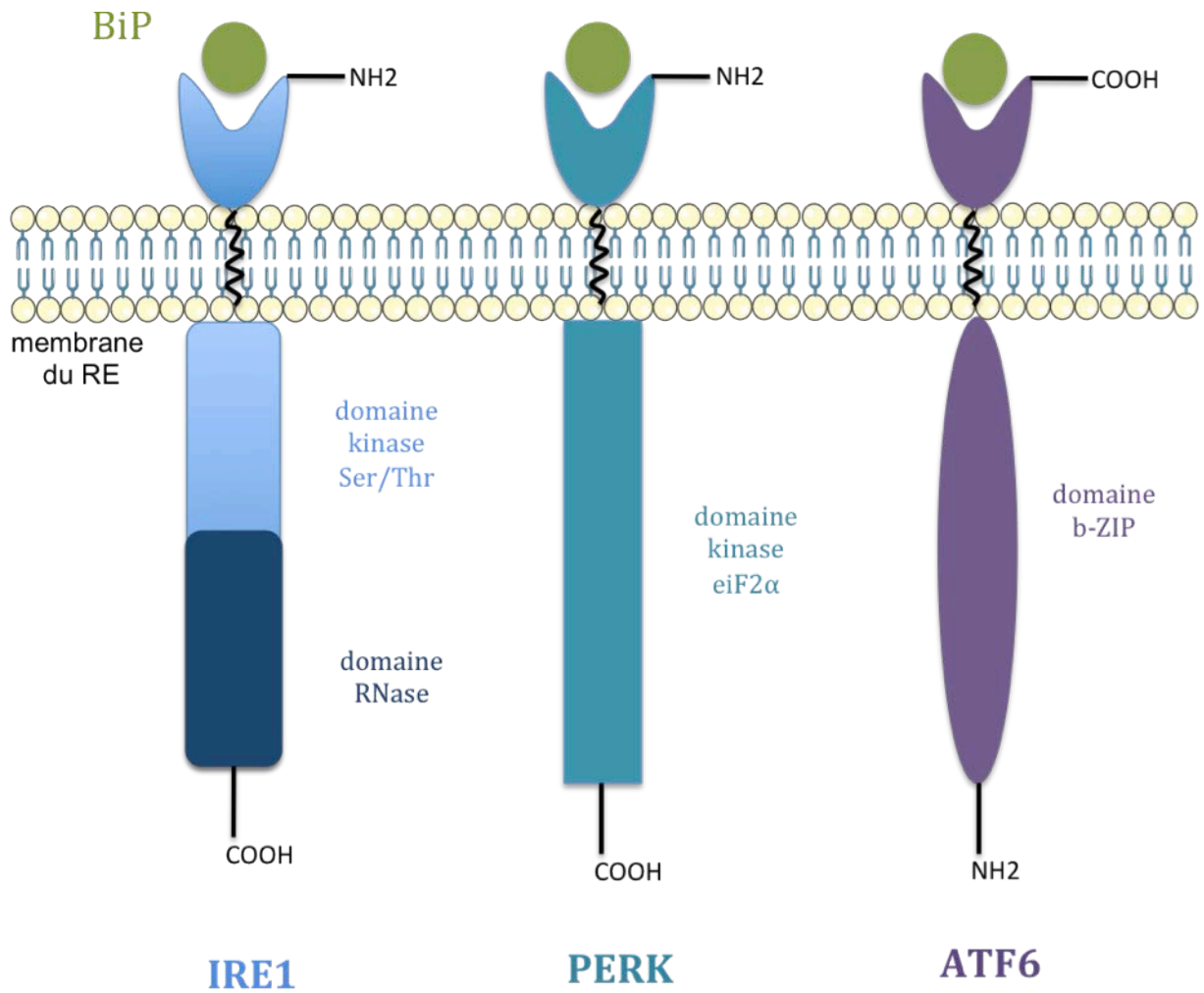


Figure 13. Représentation schématique des trois senseurs du stress du RE, IRE1, PERK et ATF6. Les domaines de chaque senseur et l'association avec BiP dans la lumière du RE sont représentés (D'après Zhang et Kaufman, 2004).

terminale luminale. En condition de stress du RE, la concentration de protéines mal repliées dans la lumière du RE augmentent et entrent en compétition avec le domaine luminal des senseurs. BiP se détache alors pour prendre en charge la maturation de ces protéines permettant ainsi l'activation des senseurs PERK, IRE1 α et ATF6. Ce modèle s'est appuyé sur des expériences de co-immunoprécipitation où BiP est fixé au senseur en absence de stress, les complexes BiP/senseurs sont rompus suite à une perturbation du RE et sont rapidement rétablis à la fin du stress. Le relargage de BiP induit l'homodimérisation de IRE1 α et PERK et leur activation par autophosphorylation (Bertolotti et al., 2000 ; Okamura et al., 2000 ; Ma et al., 2002). L'activation de ATF6 se fait selon un mécanisme différent. ATF6 contient deux séquences d'adressage au Golgi qui sont démasquées lors de la dissociation de BiP et ATF6. Ceci conduit à la translocation de ATF6 du RE vers le Golgi où il acquiert sa forme active (Shen et al., 2002).

D.3.1.2. Cascades de signalisation de l'UPR

D.3.1.2.1. La voie PERK : inhibition générale de la traduction

La réponse la plus précoce du stress du RE est l'activation de la voie PERK qui va induire la diminution transitoire de la traduction des ARNm pour diminuer la charge de nouvelles protéines à maturer dans le RE (Harding et al., 1999). Ce mécanisme est contrôlé par le facteur de traduction eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2) qui joue un rôle clé dans la régulation de la synthèse des protéines chez les eukaryotes (Proud, 2005). Le facteur eIF2 α est régulé par phosphorylation, il existe quatre kinases de eIF2 α qui répondent chacune à un stress particulier : GCN2 (General Control Nonderepressible 2) activé par une déprivation en acides aminés, PKR (double-stranded RNA-dependent protein kinase) activé par des ARN double brins produits au cours de la réplication virale, HRI (heme regulated inhibitor) qui limite la synthèse protéique dans des cellules erythroïdes déficientes en hème, et PERK. PERK est une Ser/Thr protéine kinase qui contient deux domaines principaux : un domaine kinase présentant des similitudes avec les autres eIF2 kinases en c-terminal, et un domaine N-terminal luminal similaire à IRE1 α , activée par l'accumulation de protéines immatures dans le RE. PERK phosphoryle la sérine 51 de la sous-unité α de eIF2, empêchant

ainsi la formation du complexe d'initiation de la traduction $eIF2\alpha$ -GTP- $tRNA_i^{Met}$, ce qui conduit à l'atténuation générale de la traduction.

Cependant, malgré l'inhibition générale de la traduction, $eIF2\alpha$ phosphorylé active sélectivement la traduction des ARNm de ATF4 appartenant à la famille bZIP des facteurs de transcription (Harding et al., 2000b) et de ATF5 potentiellement impliqué dans la différenciation neuronale et le cancer (Zhou et al., 2008). La traduction d'ATF4 est régulée par la présence d'uORFs (upstream Open Reading Frames) en 5'-UTR de l'ARNm qui l'inhibe en absence de stress et permet son induction en cas de stress. ATF4 permet la transcription de gènes, comportant dans leur promoteur une séquence de 19 nucléotides CCAAT-N₉-CCAAG appelées Endoplasmic Reticulum stress response element (ERSE) (Yoshida et al., 2000), qui codent pour les chaperones du RE GRP78 et GRP94, pour des gènes impliqués dans le métabolisme et le transport d'acides aminés, et dans la résistance au stress oxydant (Scheuner et al., 2001 ; Ron, 2002) ; Harding et al., 2003).

PERK est important pour la survie cellulaire en cas de stress du RE. L'invalidation de PERK dans fibroblastes embryonnaires murins (MEF) soumis à un stress du RE conduit à une augmentation de protéines mal repliées dans le RE et à la mort cellulaire (Harding et al., 2000b). De plus des souris mutées pour la Ser51 de $eIF2\alpha$ présentent un défaut d'inhibition de la synthèse protéique en cas de stress du RE et une diminution de la survie (Scheuner et al., 2001). La perte de fonction de PERK chez l'homme conduit à un syndrome récessif autosomal rare, le syndrome de Wolcott-Rallison caractérisé par un diabète néonatal insulino-dépendant et une destruction des cellules β pancréatiques (Delepine et al., 2000).

ATF4 induit la transcription de GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible protein 34) (Jiang et al., 2004). GADD34 lie la sous-unité catalytique de la protéine phosphatase 1 (PP1) et induit la déphosphorylation de $eIF2\alpha$ (Ma and Hendershot, 2003). Ainsi ATF4 et GADD34 exercent un rétrocontrôle sur $eIF2\alpha$ et inhibent son action sur la diminution générale de la traduction.

D.3.1.2.2. La voie ATF6 : augmentation de la capacité de maturation du RE

ATF6 existe sous deux isoformes, ATF6 α et ATF6 β mais seul ATF6 α est essentiel pour l'induction des gènes cibles de l'UPR (Thuerauf et al., 2004). ATF6 est une glycoprotéine

transmembranaire de type II, sa partie N-terminale est orientée vers le cytoplasme et contient un motif basic leucine zipper (bZIP), sa partie C-terminale est localisée dans la lumière du RE. Le stress du RE induit la translocation de ATF6 du RE vers le Golgi où il est clivé par les protéases S1P et S2P (Chen et al., 2002). S1P clive dans un premier temps la partie luminale, puis S2P clive l'extrémité N-terminale ce qui conduit à la libération du domaine cytosolique contenant le motif bZIP. Celui-ci migre dans le noyau pour activer la transcription d'une trentaine de gènes impliqués dans l'augmentation de la capacité de maturation des protéines par le RE. Ainsi, ATF6 active la transcription de gènes de chaperones notamment BiP/GRP78 et GRP94 (Haze et al., 1999), d'enzymes participant à la maturation des protéines comme PDI et de protéines impliquées dans le système ERAD (Adachi et al., 2008). Dans une lignée cellulaire n'exprimant pas S2P, ATF6 n'est pas converti dans sa forme active et l'induction de BiP est abolie (Lee et al., 2002 ; Ye et al., 2000). Outre son activité transcriptionnelle, ATF6 induit également l'expansion du RE par un mécanisme dépendant de la synthèse des phospholipides membranaires (Bommiasamy et al., 2009).

Les MEF invalidés pour ATF6 α montrent un défaut d'induction des chaperones du RE suite à un stress du RE, ce qui sensibilise les cellules à l'apoptose (Yamamoto et al., 2007).

D.3.1.2.3. La voie IRE1 α -XBPI

IRE1 α est une protéine transmembranaire de type I d'environ 100 kDa qui possède un domaine Ser/Thr kinase et un domaine endoribonucléase. Deux isoformes ont été identifiées chez les mammifères, IRE1 α qui est la forme ubiquitaire et IRE1 β exprimé uniquement dans le tube digestif (Tirasophon et al., 1998 ; Wang et al., 1998).

L'activation de IRE1 α dépend de la formation d'oligomères d'IRE1 α composés de 2 ou 4 molécules d'IRE1 α (Li et al., 2010) qui entraîne la trans-autophosphorylation et l'activation des domaines kinase/RNase de l'extrémité cytosolique (Korennykh et al., 2009). L'activation de IRE1 α induit l'épissage d'un intron de l'ARNm du facteur de transcription X-box-binding protein 1 (XBP1) pour former la forme épissée XBP1s (XBP1spliced) qui est libérée dans le cytosol (Yanagitani et al., 2009). ATF4 et ATF6 activent la transcription de XBP1 qui sera par la suite activée par la voie IRE1 α (Yoshida et al., 2001).

XBP1s est un facteur de transcription de 41 kDa appartenant à la famille bZIP. XBP1s induit la transcription de nombreuses chaperones et enzymes du RE impliqués dans la maturation des protéines (Lee et al., 2003) en s'hétérodimérisant avec la protéine NF-Y (nuclear factor-Y) ou avec ATF6 pour la reconnaissance du motif CCAAT des séquences ERSE (Yamamoto et al., 2007). XBP1s exerce un rôle dans la protection contre le stress oxydatif en activant la transcription d'une enzyme antioxydante, la catalase (Liu et al., 2009).

D.3.2. Transition de l'UPR vers l'apoptose

Les voies de l'UPR agissent initialement pour permettre au RE de retrouver son homéostasie et donc à la cellule de survivre. Cependant si le stress est sévère et que l'homéostasie n'est pas rétablie, ces mêmes voies de l'UPR peuvent basculer vers la mort cellulaire (Figure 14).

D.3.2.1. La voie IRE1 α -TRAF2-JNK

Bien qu'il soit montré que la voie IRE1 α favorise la survie cellulaire, la surexpression de IRE1 α induit l'apoptose dans des cellules HeLa (Iwawaki et al., 2001).

IRE1 α s'associe avec TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), une protéine adaptatrice qui lie le domaine cytosolique du TNFR. L'association entre IRE1 α et TRAF2 permet le recrutement de ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) (Nishitoh et al., 2002), une protéine de stress de la famille des MAP kinases et permet l'activation de JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Matsuzawa et al., 2002 ; Urano et al., 2000). JNK est le point de départ d'une cascade de signalisation apoptotique complexe qui comprend l'activation par phosphorylation d'une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2, Bim (Putcha et al., 2003) et l'inhibition de la protéine anti-apoptotique, Bcl-2 (Yamamoto et al., 1999). La voie IRE1 α /TRAF2/JNK participe ainsi à la voie intrinsèque apoptotique en activant une libération de Ca²⁺ du RE, le relargage de cytochrome c et l'activation des caspases 3 et 9 (Klee et al., 2009).

D.3.2.2. Le facteur de transcription CHOP

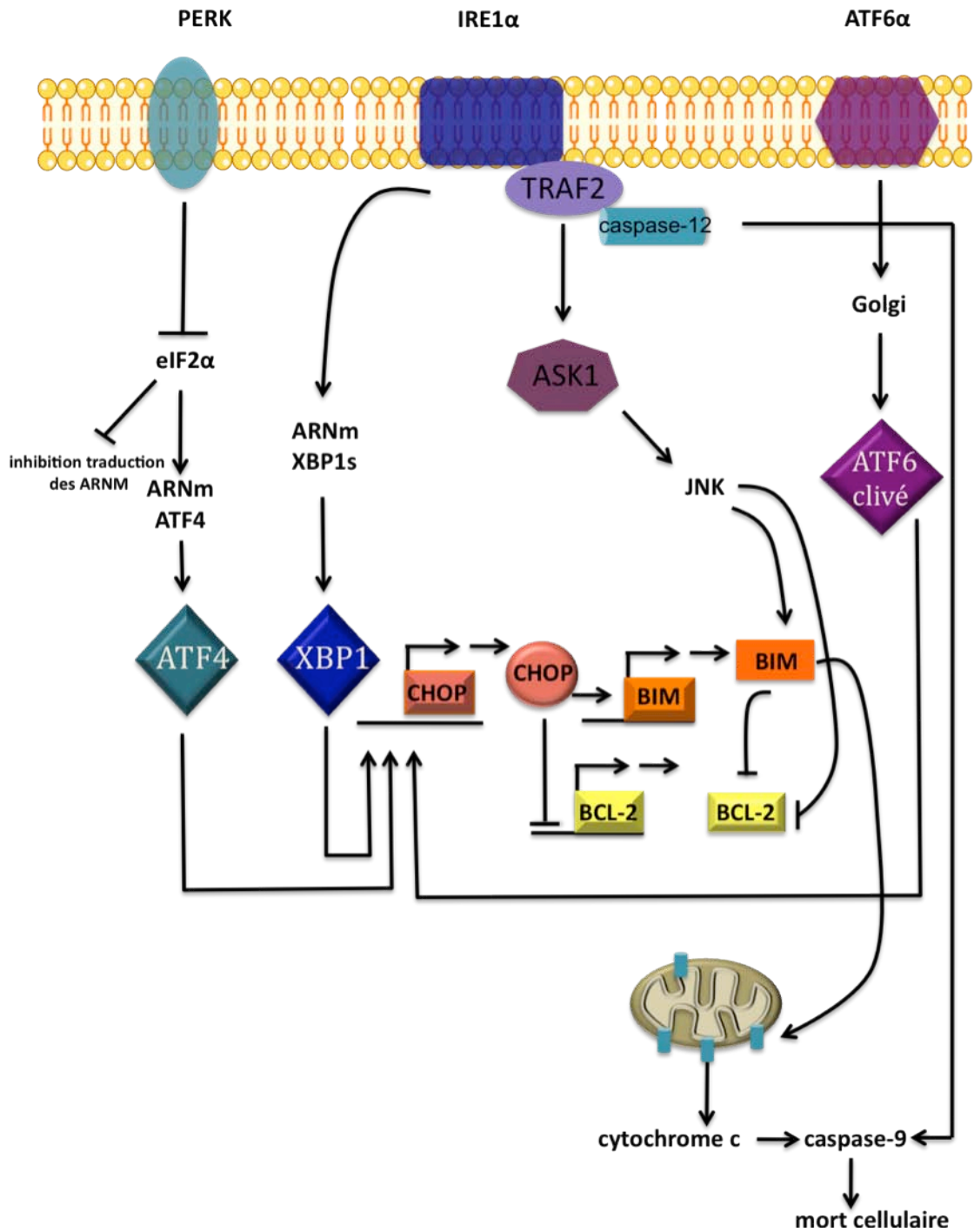


Figure 14. Connexions entre l'UPR et les voies de mort cellulaire.

IRE1α (inositol-requiring kinase 1) lie TRAF2 (TNF recepto-rassociated factor 2) qui induit l'activation de JNK (Jun N-terminal kinase) via ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1). ATF6, ATF4 et XBP1 induisent la transcription du facteur pro-apoptotique CHOP (C/EBP homologous protein) qui modulent l'expression des molécules de la famille Bcl-2. JNK active Bim et inhibe Bcl-2, ce qui a pour conséquence d'activer la libération du cytochrome c et la caspase-9 (D'après Kim et al., 2008).

Les facteurs de transcription ATF4 (Fawcett et al., 1999 ; Harding et al., 2000a) et ATF6 (Gotoh et al., 2002) induisent la transcription du facteur de transcription pro-apoptotique CHOP (C/EBP homologous protein). CHOP, aussi appelé growth arrest-DNA damage inducible 153 (GADD153), fait partie d'une famille de facteur de transcription CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) leucine zipper.

CHOP participe à l'apoptose induite par le stress du RE. En effet, les MEF CHOP^{-/-} sont résistantes à la mort cellulaire induite par des agents chimiques responsables d'un stress du RE comme la tunicamycine (perturbateur de la N-glycosylation des protéines) ou la thapsigargine (inhibiteur des pompes SERCA du RE) (Zinszner et al., 1998).

Dans le modèle génétique de souris diabétiques Akita, le développement du diabète est caractérisé par une diminution de la masse des cellules β pancréatiques et s'accompagne d'un stress du RE avec une induction de BiP et de CHOP. Un stress du RE chronique induit l'apoptose des cellules β pancréatiques via CHOP et joue un rôle important dans la réduction de la masse des îlots pancréatiques observée dans le diabète de type II (Oyadomari et al., 2002).

Au niveau moléculaire, l'activité pro-apoptotique de CHOP s'effectue par la régulation des protéines de la famille Bcl-2. D'une part, CHOP régule négativement l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (McCullough et al., 2001). D'autre part, CHOP provoque la translocation de la protéine pro-apoptotique Bax du cytosol à la mitochondrie où elle induit le relargage du cytochrome c (Gotoh et al., 2004). CHOP induit la transcription de deux autres protéines pro-apoptotiques : PUMA, qui conduit à l'activation consécutive de Bax (Cazanave et al., 2010), et Bim qui induit la mort cellulaire en perméabilisant la membrane mitochondriale externe (Puthalakath et al., 2007).

L'activité pro-apoptotique de CHOP s'exerce également via la régulation de la transcription de gènes impliqués dans la mort cellulaire. Notamment TRB3 (Tribble 3) (Shang et al., 2009) ou CHAC1 (cation transport regulator-like protein 1) (Mungrue et al., 2009) qui participent à l'apoptose dépendante du stress du RE.

D.3.2.3. La voie de la caspase-12

La caspase-12 est présente chez la souris et le rat mais n'est pas présente chez tous les humains. Un polymorphisme du gène de la caspase-12 provoque la production d'une caspase-12 tronquée ou entière mais seulement dans les populations africaines (Saleh et al., 2004). Chez l'homme, la caspase-4 présente cependant une forte homologie avec caspase-12 et est impliquée dans la mort cellulaire induite par le stress du RE (Matsuzaki et al., 2010 ; Huang et al., 2010).

La caspase-12 est localisée au niveau de la membrane externe du RE. Elle est induite par des inducteurs du stress du RE comme la thapsigargine et la tunicamycine. De plus des cellules MEF invalidées pour la caspase-12 sont protégées de l'apoptose induite par la tunicamycine ou la thapsigargine mais pas de l'apoptose induite par des agents apoptotiques indépendants du stress du RE (cycloheximide). Ces résultats indiquent que la caspase-12 joue un rôle spécifique dans l'apoptose dépendante du stress du RE (Nakagawa et al., 2000).

L'activation de la caspase-12 peut se faire par plusieurs mécanismes. Le clivage de la pro-forme de la caspase 12 est réalisé soit par les calpaïnes soit par les caspases 3/7 qui génèrent respectivement des fragments de 38 et 35 kDa. Les caspase 3/7 opèrent un clivage supplémentaire en C-terminal pour donner la forme active de la caspase-12 (Martinez et al., 2010). TRAF2 interagit également avec la caspase-12 et induit son activation suite au stress du RE (Yoneda et al., 2001).

D.4. Stress du RE et athérosclérose

Malgré le rôle essentiel bénéfique de l'UPR en cas de stress transitoire pour la survie cellulaire, un stress du RE chronique favorise la survenue de dysfonction tissulaire et de maladie (Kaufman, 2002). En effet, la mort cellulaire induite par le stress du RE est impliquée dans certaines pathologies comme le diabète de type II (Oyadomari et al., 2002), les maladies neurodégénératives (Nakagawa et al., 2000) ou l'ischémie (Little et al., 1996). Actuellement, de nombreux travaux montrent que le stress du RE joue un rôle dans l'athérogénèse et la vulnérabilité des plaques athérosclérotiques en participant à l'apoptose de tous les types cellulaires constituant la plaque (Tabas, 2010).

D.4.1. Détection du stress du RE dans les plaques d'athérosclérose

L'analyse de plaques athérosclérotiques de souris apoE^{-/-} révèle la présence de marqueurs de l'UPR (GRP78, PERK et CHOP) à tous les stades de développement des plaques (Zhou et al., 2005). Chez l'homme, il existe une corrélation entre le stress du RE et l'instabilité des plaques. Il a été montré que l'expression des marqueurs du stress du RE dans les CML et les macrophages de segments d'artères coronaires est accrue dans des plaques athérosclérotiques instables ou rompues par rapport à des plaques stables (Myoishi et al., 2007).

De nombreux inducteurs du stress du RE sont présents dans la plaque d'athérosclérose. Les LDLox ou les produits d'oxydation lipidique comme le 4-HNE (Sanson et al., 2009) et le 7-cétocholestérol (Brown and Jessup, 1999) ou le cholestérol libre (Feng et al., 2003) pourraient favoriser l'instabilité des plaques en participant à l'apoptose des cellules vasculaires.

D.4.2. Effets pro-athérogènes du stress du RE sur les CE

L'analyse du phénotype des CE d'artères de porc a permis de montrer que les zones artérielles athéro-susceptibles c'est-à-dire soumises à un flux sanguin perturbé expriment des marqueurs du stress du RE (Civelek et al., 2009). Dans ces régions, l'UPR et particulièrement l'expression de GRP78 est induit et pourrait constituer une réponse adaptative pour limiter le stress (Feaver et al., 2008). Cependant, l'expression soutenue de XBP1s dans les régions athéro-susceptibles participe à l'apoptose des CE, ce qui suggère qu'un stress du RE chronique pourrait favoriser la formation des lésions (Zeng et al., 2009).

Au delà du rôle que pourrait jouer le stress du RE dans la dysfonction endothéliale, il pourrait également favoriser la synthèse de cytokines pro-inflammatoires qui permettent le recrutement des monocytes. Ainsi, le 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-3-glycérophosphorylcholine (PAPCox), un phospholipide oxydé constituant les LDLox, qui est retrouvé dans les plaques d'athérosclérose avancées (Berliner and Watson, 2005), induit une réponse UPR. Le PAPCox active ainsi l'expression de chémokines pro-inflammatoires comme IL-8, MCP1 et IL-6 via ATF4 et XBP1 (Gargalovic et al., 2006a). De plus, la PLA2, présente dans les lésions athérosclérotiques, hydrolyse les LDLox et génère des particules

pro-inflammatoires appelées LDL phospholipolysées (LDL-X) (Karabina et al., 2006). Ces particules ont la capacité d'induire une réponse UPR et la production de cytokines pro-inflammatoires (Gora et al., 2010).

D.4.3. Effets pro-athérogènes du stress du RE sur les CML

Plusieurs inducteurs du stress du RE présents dans la plaque causent l'apoptose des CML via un mécanisme commun qui semble être l'augmentation de la production d'ERO intracellulaires et l'induction de l'UPR, c'est le cas pour le 7-cétocholestérol et le cholestérol libre. Le 7-cétocholestérol induit la voie IRE1 α -JNK qui conduit à l'activation de la transcription de Nox4, une enzyme de la famille des NAD(P)H oxydases, responsable de la génération d'ERO intracellulaires. L'augmentation des ERO induit alors l'apoptose via l'activation de CHOP (Pedruzzi et al., 2004). A l'inverse, l'antioxydant N-acétylcystéine supprime la production des ERO produites par le 7-cétocholestérol et protège des CML d'artères coronaires humaines de l'apoptose par le stress du RE (Myoishi et al., 2007). Par ailleurs, un excès de cholestérol libre entraîne une dysfonction mitochondriale à l'origine de l'augmentation de la production d'ERO, de l'induction de CHOP et de l'apoptose des CML (Kedi et al., 2009).

L'apoptose des CML peut favoriser la déstabilisation des plaques en diminuant le collagène des plaques, une étude montre que le stress du RE pourrait jouer un rôle clé dans ce phénomène. En effet, le Bortezomib, un inducteur du stress du RE, provoque une apoptose associée à CHOP et au clivage des caspase-12 et -3 *in vitro* et sur des explants de plaques athérosclérotiques de souris apoE^{-/-}. De plus, le Bortezomib chez la souris apoE^{-/-} conduit à une mort des CML et à une diminution du contenu en collagène des plaques (Van Herck et al., 2010).

D.4.4. Effets pro-athérogènes du stress du RE sur les macrophages

Le stress du RE joue un rôle central dans l'apoptose des macrophages, ce qui favorise l'augmentation du cœur nécrotique. Le cholestérol libre en excès participe à l'apoptose des macrophages via l'induction de CHOP. En effet, des macrophages CHOP^{-/-} sont résistants à

l'apoptose induite par le cholestérol libre. De plus, dans des lésions athérosclérotiques avancées de souris apoE^{-/-}, l'expression de CHOP est co-localisée avec les macrophages et les zones riches en cholestérol libre, ce qui suggère que le stress du RE dans les macrophages participe à la progression des lésions (Feng et al., 2003). L'analyse de plaques athérosclérotiques de souris apoE^{-/-}CHOP^{-/-} et de souris apoE^{-/-}CHOP^{+/+} a montré que les souris apoE^{-/-}CHOP^{-/-} ont des plaques réduites et une diminution de l'apoptose des macrophages et de la nécrose, CHOP est donc un facteur qui favorise la progression des plaques (Thorp et al., 2009).

Diminuer le stress du RE et l'apoptose consécutive des macrophages dans les plaques pourrait être bénéfique. En effet, une chaperone chimique, l'acide 4-phénylbutyrique, diminue l'apoptose induite par le stress du RE des macrophages in vitro et in vivo chez la souris apoE^{-/-}, ce qui réduit le développement des lésions (Erbay et al., 2009).

De nombreuses observations lient le stress du RE au processus d'autophagie. Les implications de l'autophagie dans la survie et la mort cellulaire ainsi que son rôle dans le développement des plaques d'athérosclérose seront traitées dans le prochain chapitre.

E/ L'AUTOPHAGIE

E.1. Généralités sur l'autophagie

E.1.1. Les différents types d'autophagie

Le terme autophagie désigne un processus d'autodigestion de matériel cellulaire par la voie de dégradation lysosomale. Il existe plusieurs types d'autophagie. La microautophagie permet la séquestration de petites portions de cytoplasme dans les lysosomes par invagination de la membrane lysosomale. L'autophagie dépendante des chaperones permet l'adressage de protéines solubles mal repliées aux lysosomes. La macroautophagie communément appelée autophagie permet la dégradation des protéines à durée de vie longue et des organites endommagés (Mizushima et al., 2008).

E.1.2. La macroautophagie ou autophagie

L'autophagie apparaît à partir de membranes isolées (ou phagophore) qui vont englober une partie du cytoplasme et se réarranger de façon dynamique pour former une structure en double membrane appelée autophagosome (Juhász and Neufeld, 2006). La formation de l'autophagosome est régulée par les gènes ATG et protéines atg pour « AuTophagy-related » (Klionsky et al., 2003). Une trentaine de gènes ATG ont été identifiés chez la levure, 18 gènes orthologues ont été identifiés chez les eucaryotes supérieurs. A la fin du processus autophagique, l'autophagosome fusionne avec un lysosome pour former un autolysosome. Dans cet autolysosome, les enzymes du lysosome dégradent le matériel cytoplasmique séquestré (Figure 15).

En condition basale, l'autophagie est essentielle pour l'homéostasie cellulaire. Elle permet l'élimination de matériel toxique pour la cellule et fournit un apport de constituants de base pour la synthèse protéique ou lipidique. Cependant, l'autophagie est un processus complexe qui peut aussi dans certaines conditions participer à la mort cellulaire et est impliquée dans de nombreuses pathologies humaines.

E.2. Machinerie moléculaire de l'autophagie

E.2.1. Les étapes du processus autophagique

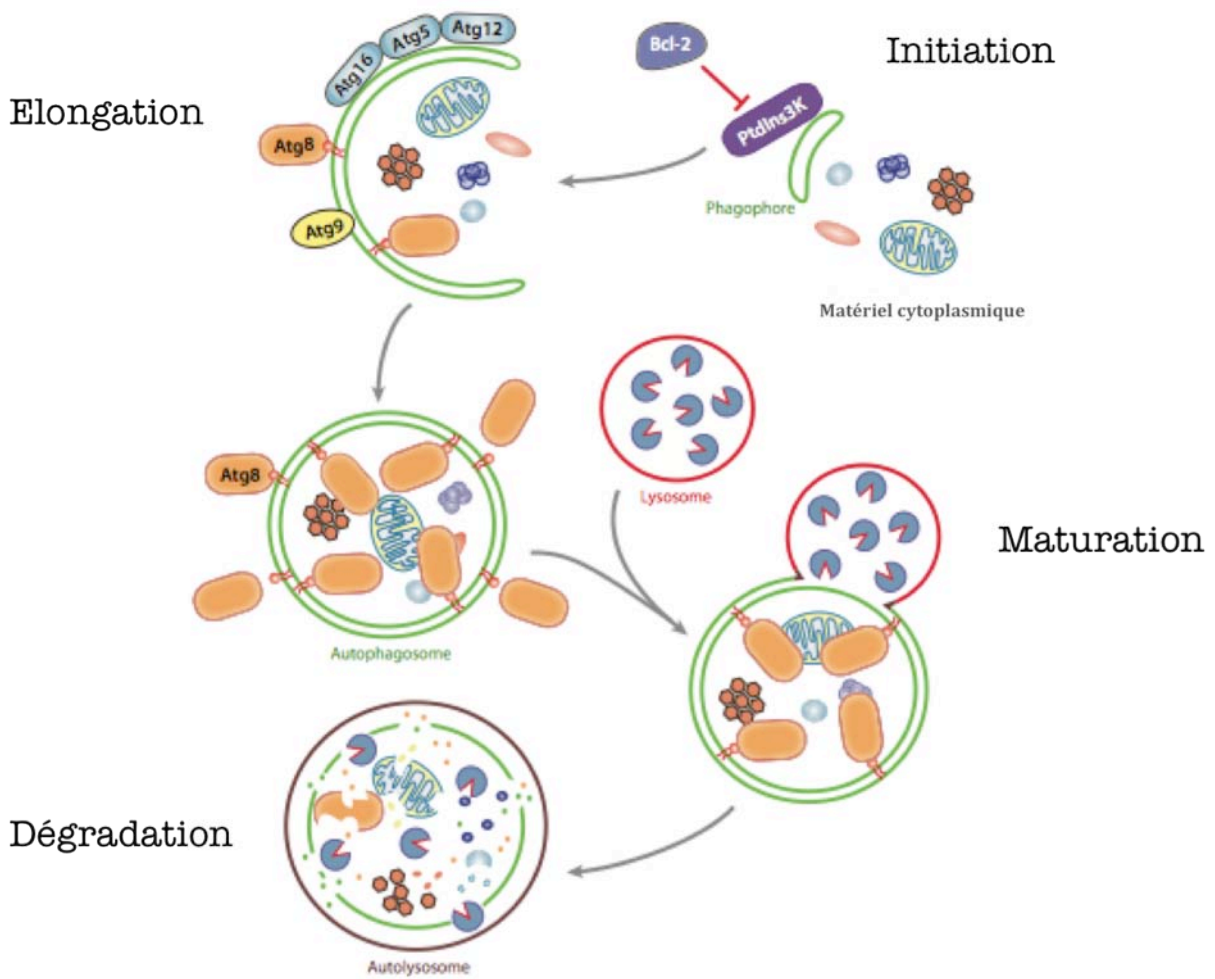


Figure 15. Représentation schématique du processus de macroautophagie.

Le processus se déroule en quatre étapes :

- 1/ Initiation du phagophore
 - 2/ Elongation de l'autophagosome
 - 3/ Fusion/maturation avec le lysosome
 - 4/ Formation de l'autolysosome et dégradation protéolytique du matériel
- (D'après He et al., 2009).

E.2.1.1. Origine des membranes de l'autophagosome

Les autophagosomes se formeraient dans des structures dynamiques, appelées omégasomes. Ces structures sont riches en phosphatidylinositol 3-phosphate PI(3)P et bourgeonnent à partir des membranes du RE à proximité de vésicules contenant l'enzyme phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PI3K) qui serait la source de PI(3)P. Les omégasomes servent à localiser les protéines Atg pour permettre la formation de l'autophagosome (Axe et al., 2008). Une étude récente en tomographie électronique a confirmé la relation entre RE, omégasome et phagophore (Hayashi-Nishino et al., 2009).

Même si l'origine membranaire des autophagosomes a longtemps été débattue, la machinerie moléculaire nécessaire à la formation de l'autophagosome est bien détaillée. La formation de l'autophagosome se déroule en 3 étapes : initiation de la biogénèse de la membrane, élongation de la membrane isolée et fermeture des bords de la membrane pour former l'autophagosome (Figure 16).

E.2.1.2. Initiation de l'autophagosome

E.2.1.2.1. La protéine mTOR (mammalian Target of Rapamycin) régule la formation du complexe initiateur de l'autophagie

Chez les mammifères, le complexe initiateur de l'autophagie est composé de ULK1 (unc-51-like kinase 1), FIP200, et Atg13 (Mercer et al., 2009). L'initiation de l'autophagie est régulée par le complexe mTORC1. En conditions riches en nutriments, mTORC1 est associée avec le complexe ULK1/Atg13/FIP200. mTORC1 phosphoryle et inhibe ULK1 et Atg13 empêchant l'initiation de l'autophagie (Ravikumar et al., 2010). En condition de carence nutritionnelle ou avec la rapamycine (inhibiteur de mTOR), mTORC1 se dissocie du complexe résultant en une diminution de la phosphorylation de Atg13 et ULK1 et l'activation de ULK1 (Hosokawa et al., 2009). ULK1 est une sérine-thréonine kinase qui va à son tour phosphorylé Atg13, FIP200 et ULK1 lui même (Yeh et al., 2010) et permettre l'activation de l'initiation de l'autophagie.

E.2.1.2.2. Le complexe PI3K de type I

La formation de l'autophagosome requiert ensuite l'activité de la PI3K de classe III qui est responsable de la production de PI(3)P importante pour la formation de l'autophagosome (Simonsen and Tooze, 2009). La PI3K de classe III forme le complexe PI3K de type I regroupant Beclin-1, p150 et Atg14 (Itakura et al., 2008). La 3-méthyladénine (3-MA) et la wortmannine inhibe l'activité de la PI3K de classe III et inhibe la formation de l'autophagosome. Ces deux inhibiteurs sont fréquemment utilisés comme inhibiteur de l'autophagie (Petiot et al., 2000 ; Blommaert et al., 1997). L'inactivation de Beclin-1 par siRNA conduit également à une inhibition de la formation des autophagosomes (Liang et al., 2008).

E.2.1.3. Elongation de l'autophagosome

L'élongation des membranes du phagophore dépend de deux systèmes de conjugaison ubiquitin-like.

E.2.1.3.1. Le complexe Atg12-Atg5-Atg16L

La conjugaison de Atg12 à Atg5 est essentielle à l'élongation du phagophore (Mizushima et al., 2001). Atg12 (protéine ubiquitin-like) est conjuguée à Atg5 via l'action de Atg7 (enzyme ubiquitin-E1-like) et Atg10 (enzyme ubiquitin-E2-like) (Mizushima et al., 1998). Le complexe Atg12-Atg5 est ensuite associé à Atg16L et s'oligomérisse pour former un large complexe Atg12-Atg5-Atg16L à la membrane de l'autophagosome en élongation (Mizushima et al., 2003). Le complexe Atg12-Atg5 recrute le deuxième système ubiquitin-like de LC3 à la membrane de l'autophagosome (Mizushima et al., 2001).

E.2.1.3.2. LC3

LC3 est une protéine ubiquitin-like qui est d'abord clivée par Atg4 pour donner la forme LC3-I cytosolique de 18kDa. LC3-I est alors activée par Atg7 (enzyme E1 ubiquitin-like) (Tanida et al., 2001) puis transférée vers Atg3 (enzyme E2 ubiquitin-like) (Tanida et al., 2002). LC3-I est conjuguée par Atg3 à un phosphatidylethanolamine (PE) qui produit la

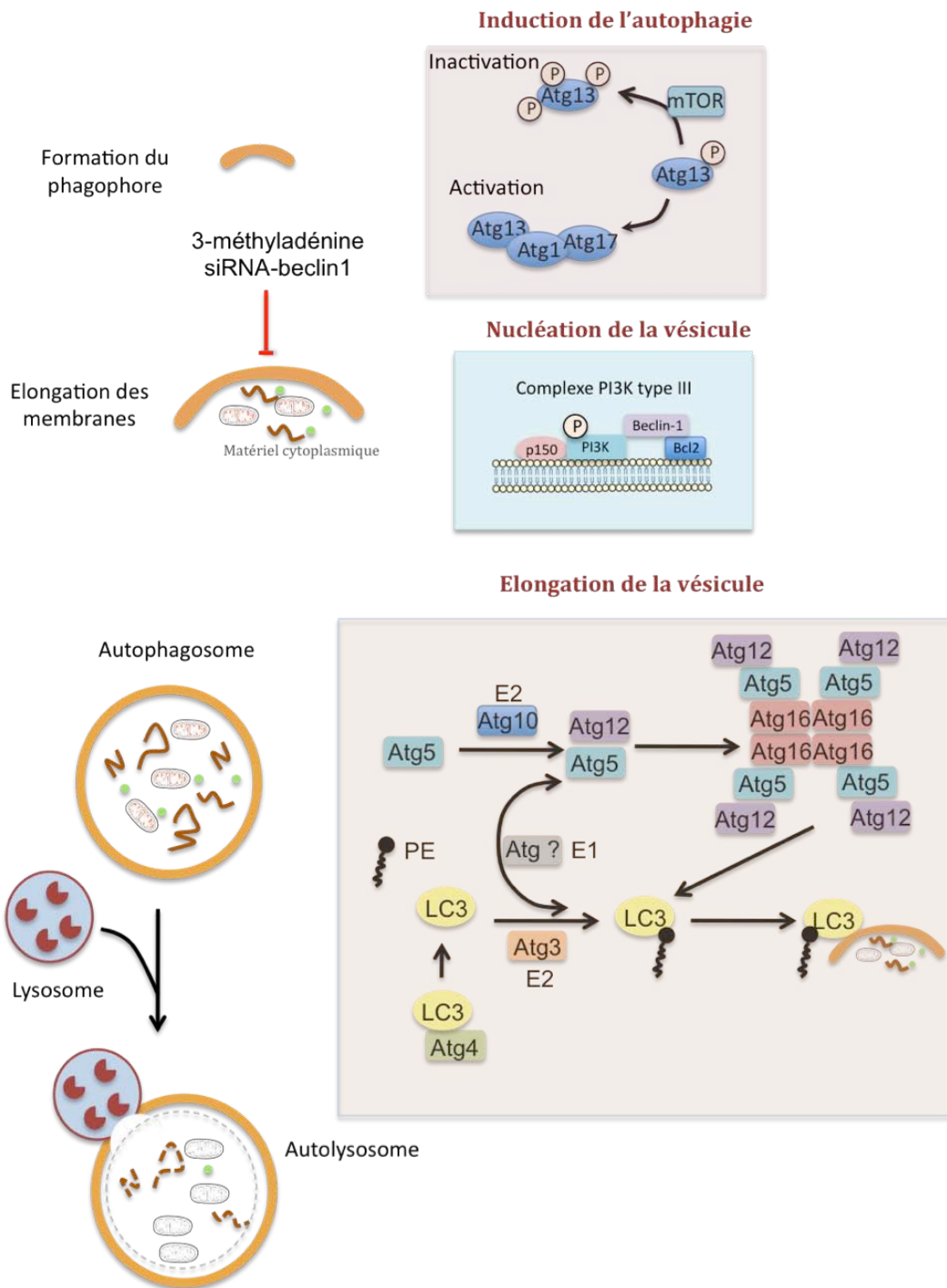


Figure 16. Régulation moléculaire de l'autophagie.

La figure représente les complexes régulateurs de l'autophagie :

1/ Le complexe initiateur régulé par mTOR

2/ Le complexe PI3-kinase de type I qui permet la nucléation de la vésicule

3/ Les deux systèmes de conjugaison ubiquitin-like qui régulent l'élongation de l'autophagosome

Des inhibiteurs de l'autophagie (3-Méthyladénine, si-RNA Beclin-1) sont notés (flèches rouges).

(D'après Maiuri et al., 2007).

PE : phosphatidyléthanolamine ; *E1* : Enzyme ubiquitin-like 1 ; *E2* : Enzyme ubiquitin-like 2.

forme LC3-II de 16 kDa localisée au niveau des membranes autophagosomales (Kabeya et al., 2004). LC3-II est largement utilisée comme marqueur de l'autophagie car il a été montré que la quantité de LC3-II est corrélée au nombre d'autophagosomes (Kabeya et al., 2000).

E.2.1.4. Maturation de l'autophagosome

Le processus d'autophagie se termine par l'étape de maturation où le phagosome nouvellement formé va fusionner avec le système endosomal/lysosomal pour former l'autolysosome. L'autophagosome fusionne d'abord avec les endosomes précoces par l'intermédiaire du complexe COPI (Razi et al., 2009) et avec les endosomes tardifs par l'intermédiaire du système ESCRT (endosomal sorting complex required for transport). La perte du complexe ESCRT-III dans des neurones conduit à une accumulation d'autophagosomes et pourrait participer à la neurodégénération (Lee et al., 2007).

La fusion de l'autophagosome avec les vésicules endosomales précoces et tardives donne l'amphisome qui fusionne avec le lysosome pour former l'autolysosome (Simonsen and Tooze, 2009). En particulier, une protéine de la famille des SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factors attachment protein receptors), VAMP7, contrôle l'étape finale de la fusion entre amphisome et lysosome (Fader et al., 2009). La fusion de l'autophagosome avec le lysosome contenant une forte quantité d'enzymes hydrolytiques permet la dégradation du matériel emprisonné.

E.2.2. Rôle du Ca^{2+} dans la régulation de l'autophagie

Parmi les voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'autophagie, le Ca^{2+} joue un rôle complexe et peut activer ou inhiber l'autophagie selon des voies dépendantes ou indépendantes de mTOR.

Une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique par un traitement à la vitamine D, l'ATP ou la thapsigargine dans des cellules MCF-7 induit la formation d'autophagosomes. L'augmentation de Ca^{2+} cytosolique active la CaMKK β (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase- β) qui à son tour active l'AMPK (AMP kinase). L'AMPK inhibe mTOR et permet ainsi l'induction de l'autophagie (Hoyer-Hansen et al., 2007).

A l'inverse, le Ca^{2+} cytosolique peut inhiber l'autophagie selon un mécanisme dépendant de l'activation des calpaïnes (Williams et al., 2008).

E.3. Rôle de l'autophagie dans la survie et la mort cellulaire

E.3.1. L'autophagie est initialement un mécanisme enclenché pour la survie cellulaire

E.3.1.1 L'autophagie permet de maintenir l'homéostasie énergétique en condition de carence en nutriments

Une étude *in vivo* chez la souris a permis de montrer que l'autophagie est activée rapidement après la naissance. L'activation de l'autophagie durant cette période permet de fournir un apport en acides aminés et de maintenir l'homéostasie énergétique pendant la période néonatale (Kuma et al., 2004). Chez la souris transgénique exprimant la protéine de fusion GFP-LC3, une période de jeûne de 24 heures active l'autophagie dans le foie, le muscle, le cœur et le pancréas (Mizushima et al., 2004).

La dégradation des protéines et de matériels cytoplasmiques par l'autolysosome génère des acides gras et des acides aminés qui seront réutilisés par la cellule pour produire de nouvelles protéines, maintenir le niveau d'ATP dans la cellule et augmenter la survie cellulaire (Levine and Yuan, 2005 ; Yin et al., 2009).

E.3.1.2 L'autophagie est activée en réponse à un stress

E.3.1.2.1. L'hypoxie active l'autophagie

L'activation de l'autophagie par HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor-1 α) en condition d'hypoxie contribue à augmenter la survie cellulaire. L'autophagie favorise la survie des cellules cancéreuses en hypoxie, ce qui serait délétère pour l'efficacité de certaines stratégies anti-cancéreuses (Liu et al., 2010 ; Rouschop et al., 2010). Cependant, l'autophagie induite par l'hypoxie pourrait à l'inverse jouer un rôle bénéfique pour la neuroprotection en éliminant les mitochondries endommagées des neurones (Wu et al., 2010).

E.3.1.2.2. Le stress du RE active l'autophagie

De nombreux travaux montrent qu'il existe un lien entre l'activation de l'UPR et l'autophagie. Des inducteurs pharmacologiques du stress du RE comme la tunicamycine et la thapsigargine induisent la formation d'autophagosomes (Criollo et al., 2007 ; Gozuacik et al., 2008). La voie IRE1 α /JNK est impliquée dans l'induction de l'autophagie par le stress du RE (Ogata et al., 2006). L'autophagie peut également être induite par la voie PERK/ATF4. L'activité transcriptionnelle de ATF4 active l'autophagie d'une part en augmentant l'expression de Atg12 qui permet la conversion de LC3 (Kouroku et al., 2007) et d'autre part en activant directement la transcription de LC3 (Rzymiski et al., 2010). L'activation de l'autophagie par ATF4 confère une résistance à la mort cellulaire notamment au cours de l'hypoxie (Rouschop et al., 2010).

E.3.1.2.3. L'élimination de protéines mal repliées par l'autophagie augmente la survie cellulaire

Plusieurs études montrent que l'autophagie, par son rôle dans la dégradation des protéines à durée de vie longue, pourrait intervenir comme renfort du système ERAD lorsque celui-ci est dépassé. L'inactivation de Atg7 ou de Atg5 chez la souris conduit à une neurodégénération due à une mort neuronale importante causée par une accumulation de protéines polyubiquitinées dans les neurones. Dans ces conditions, l'autophagie est essentielle à la survie cellulaire neuronale en éliminant les protéines dégradées (Komatsu et al., 2006 ; Hara et al., 2006). L'autophagie peut également intervenir dans la dégradation de protéines mutantes impliquées dans le développement de certaines myopathies (Fujita et al., 2007).

E.3.2. Autophagie et mort cellulaire

Même si le rôle de l'autophagie dans la survie cellulaire est établi, de nombreuses études ont avancé l'hypothèse que l'autophagie serait également impliquée dans la mort cellulaire. En effet, on observe une accumulation d'autophagosomes dans des cellules subissant une mort cellulaire, ce qui a suggéré l'existence d'un lien entre autophagie et apoptose. L'interaction entre autophagie et apoptose est en réalité complexe et les données sur ce sujet sont souvent contradictoires (Eisenberg-Lerner et al., 2009).

E.3.2.1. Définition de la mort par autophagie

Le terme de mort cellulaire de type II a été donné à la mort cellulaire autophagique en opposition à la mort cellulaire de type I qui définit l'apoptose. Ces deux types de mort sont distinguables d'un point de vue morphologique et moléculaire. La mort par autophagie est caractérisée par une accumulation excessive d'autophagosomes et d'autolysosomes et la dégradation des organelles. Elle est également caractérisée par des cellules rondes, la présence d'une membrane convolutive et perméable mais ne fait pas intervenir les caspases (Yu et al., 2004). Comme pour l'apoptose, l'autophagie n'entraîne pas de réponse inflammatoire (Levine and Yuan, 2005).

La mort autophagique intervient au cours de la métamorphose chez les insectes ou lors du développement embryonnaire chez les mammifères. Elle est également impliquée dans plusieurs pathologies humaines telles que la cardiomyopathie dilatée ou la maladie de Parkinson. Enfin, certains traitements causent une mort autophagique de cellules cancéreuses humaines (Levine and Yuan, 2005).

E.3.2.2. Interrelation entre apoptose et autophagie

Selon les nombreuses données de la littérature sur l'étude du lien entre autophagie, apoptose et mort cellulaire, deux concepts se dégagent : soit l'autophagie et l'apoptose agissent en synergie pour induire la mort cellulaire ou à l'inverse l'autophagie bloque l'apoptose pour permettre la survie cellulaire (Eisenberg-Lerner et al., 2009).

E.3.2.2.1. Association entre l'apoptose et l'autophagie pour induire la mort cellulaire

Dans le cas où l'autophagie et l'apoptose coopèrent pour induire la mort cellulaire, si l'apoptose est bloquée, l'autophagie prend le relais pour induire la mort cellulaire. C'est le cas des MEF doublement invalidées pour Bax et Bak (MEF Bax^{-/-}Bak^{-/-}) qui ne font pas d'apoptose (Lum et al., 2005 ; Shimizu et al., 2004). La privation en facteur de croissance des MEF Bax^{-/-}Bak^{-/-} induit une réponse autophagique qui permet dans un premier temps à la cellule de maintenir le niveau d'ATP et la survie pendant plusieurs semaines. Cependant,

l'autophagie persistante conduit finalement à la mort cellulaire (Lum et al., 2005). Par ailleurs, le traitement par l'étoposide ou la staurosporine, deux inducteurs d'apoptose, de MEF Bax^{-/-} Bak^{-/-} conduit à une mort cellulaire par autophagie dépendante de Atg5 et Beclin-1 (Shimizu et al., 2004). De plus, l'inhibition de l'apoptose avec un inhibiteur général des caspases, le Z-VAD-FMK, induit une mort cellulaire dépendante de l'autophagie dans une lignée de macrophage RAW264.7 et de fibroblastes murins L929 (Xu et al., 2006 ; Yu et al., 2004).

E.3.2.2.2. Autophagie et apoptose ont des effets antagonistes sur la mort cellulaire

Dans ce cas, l'autophagie ne conduit pas à la mort cellulaire mais atténue l'apoptose en rétablissant dans la cellule des conditions propices à la survie cellulaire, comme précédemment cité en atténuant le stress du RE ou en apportant des nutriments à la cellule. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie par la 3-MA ou par extinction de la Beclin-1 par siRNA peut provoquer l'apoptose de cellules soumises à des conditions de carence nutritionnelle (Boya et al., 2005 ; Gonzalez-Polo et al., 2005).

E.3.2.3 Rôle de Beclin-1 dans la mort cellulaire par autophagie

La génération de souris hétérozygotes beclin-1^{+/-} (le phénotype beclin-1^{-/-} est létal) a montré que Beclin-1 est un gène suppresseur de tumeur car ces souris développent des tumeurs spontanées à l'âge adulte. Ce résultat suggère que Beclin-1 participe à une voie de mort cellulaire qui peut conduire à un développement cellulaire anormal et à des tumeurs (Yue et al., 2003).

E.3.2.3.1. Interaction entre Beclin-1 et Bcl-2

Beclin-1 contient un domaine BH3 (Bcl-2-homogy-3) qui lui permet de lier Bcl-2 et Bcl-X_L. Bcl-2 empêche la formation du complexe Beclin-1/PI3K indispensable à l'initiation de l'autophagie. Une mutation de Beclin-1 qui empêche la liaison avec Bcl-2 induit un excès

d'autophagie qui conduit à la mort cellulaire (Pattingre et al., 2005). Dans des cellules cancéreuses mammaires, la suppression de Bcl-2 induit la mort cellulaire par activation de l'autophagie (Akar et al., 2008).

E.3.2.3.2. JNK participe à la mort autophagique

JNK induit la phosphorylation de Bcl-2 ce qui provoque la dissociation des complexes Bcl-2/Beclin-1 et l'induction de l'autophagie (Wei et al., 2008). La durée d'activation de JNK semble influencer le devenir de l'autophagie : une activation transitoire pourrait induire une autophagie allant vers la survie (Wei et al., 2008) alors que l'activation prolongée de JNK pourrait induire un niveau élevé d'autophagie qui conduirait à la mort cellulaire (Yu et al., 2004 ; Park et al., 2009).

E.3.2.3.3. Régulation de l'activité de Beclin-1 par la Death associated protein kinase (DAPK)

DAPK induit la phosphorylation de Beclin-1, ce qui conduit à la dissociation de Beclin-1 avec Bcl-X_L et Bcl-2 et à l'induction de l'autophagie (Zalckvar et al., 2009). La régulation de la dissociation de Beclin-1/Bcl-2 ou Bcl- X_L par DAPK pourrait participer à la mort cellulaire par autophagie, en effet il a été montré que DAPK induit la mort cellulaire autophagique induite par le stress du RE (Gozaucik et al., 2008).

E.4. Autophagie et athérosclérose

L'intérêt porté au rôle de l'autophagie dans l'athérosclérose a considérablement augmenté depuis quelques années. Alors que de nombreuses études montrent le rôle essentiel de l'apoptose et du stress du RE dans le développement des plaques d'athéroscléroses, le rôle de l'autophagie dans la formation et la stabilisation des plaques reste encore peu connu. Des données montrent que l'autophagie est induite dans les plaques avancées par les lipides oxydés, l'inflammation ou le stress oxydant, même si la détection de l'autophagie dans les plaques est difficile due à des limites techniques. Certaines études montrent que l'autophagie

serait plutôt anti-athérogène et favoriserait la stabilisation des plaques (Martinet and De Meyer, 2009).

E.4.1. Induction de l'autophagie par les lipides oxydés

E.4.1.1. Induction de l'autophagie par le 4-HNE

Le 4-HNE forme des adduits sur les protéines qui les rendent non fonctionnelles et peuvent devenir toxiques pour la cellule si elle ne les élimine pas. Il a été montré que le 4-HNE induit l'autophagie dans des CML aortiques de rat, ce qui permet l'élimination des protéines modifiées. Une induction renforcée de l'autophagie par la rapamycine permet une élimination accrue de ces protéines modifiées. A l'inverse, l'inhibition de l'autophagie par le 3-MA empêche l'élimination des protéines modifiées par le 4-HNE et augmente la mort cellulaire (Hill et al., 2008).

E.4.1.2. Induction de l'autophagie par les LDL oxydées

Les LDLox induisent l'autophagie dans une lignée cellulaire endothéliale humaine EA.hy926. Après 24 heures de traitement par les LDLox, les cellules montrent une intense formation d'autophagosomes révélée en microscopie électronique et une vacuolisation importante correspondant au stade final de la fusion entre autophagosomes et lysosomes. A l'inverse, un traitement avec des LDL natives induit de rares autophagosomes (Nowicki et al., 2007).

E.4.1.3. Induction de l'autophagie par le cholestérol libre et le cholestérol oxydé

Un excès de cholestérol libre dans les CML induit une réponse autophagique qui joue un rôle important dans la survie cellulaire (Xu et al., 2010). A l'inverse, le traitement des CML par le 7-cétocholestérol induit une mort cellulaire complexe associée à des marqueurs de l'autophagie comme une vacuolisation cytoplasmique et l'induction de LC3-II (Martinet et al., 2004).

E.4.2. Effets protecteurs de l'autophagie dans l'athérosclérose

E.4.2.1. Protection de l'autophagie contre le stress oxydant dans la plaque

L'autophagie protège du stress oxydant les cellules de la plaque d'athérosclérose. L'augmentation des ERO intracellulaires induit la formation de protéines oxydées et endommage les organelles. L'élimination des composants cellulaires oxydativement endommagés par l'autophagie favorise la survie cellulaire. A l'inverse, un excès d'ERO intracellulaires peut conduire à une dégradation de la membrane lysosomale. La fusion entre autophagosomes et lysosomes est alors altérée et, l'impossibilité d'éliminer les protéines ou les organelles dégradés conduit à la mort cellulaire (Kiffin et al., 2006).

E.4.2.2. Interaction entre statines et 7-cétocholestérol : protection de la mort des CML par l'autophagie

Les statines sont utilisées dans la prévention des risques cardiovasculaires et exercent un ensemble d'effets bénéfiques dont la réduction du LDL cholestérol et la stabilisation des plaques. Cependant, à forte concentration, les statines peuvent induire l'apoptose des CML. Une étude *in vitro* sur des CML a montré que de fortes doses de statines et de 7-cétocholestérol ont des effets synergiques sur la mort cellulaire en induisant respectivement l'apoptose et l'autophagie. Cependant, à des doses plus faibles de statines, l'induction de l'autophagie par le 7-cétocholestérol devient protectrice et inhibe l'apoptose induite par les statines (Martinet et al., 2008).

E.4.2.3. L'autophagie régule indirectement la concentration d'apoB dans la circulation sanguine

L'apoB est la protéine majeure des lipoprotéines athérogènes. Il a été montré que l'autophagie participe à la régulation de la sécrétion de l'apoB dans des hépatocytes de rat. L'addition d'acides gras polyinsaturés à des cultures d'hépatocytes conduit à la production d'ERO. L'apoB produite par le RE est modifiée par oxydation et forme des agrégats. L'élimination de ces agrégats par le processus autophagique conduit à une diminution de l'export d'apoB par les hépatocytes. L'autophagie participe donc indirectement à diminuer la concentration de lipoprotéines contenant l'apoB dans la circulation sanguine (Pan et al., 2008).

E.4.2.4. L'autophagie permet la dégradation des LDL oxydées

Les protéines modérément oxydées sont dégradées par le protéasome. A l'inverse, les protéines fortement oxydées ne sont pas dégradées par le protéasome, s'accumulent dans la cellule et deviennent toxiques. Il a été montré que les LDLox altèrent le fonctionnement du protéasome ce qui favorise la mort cellulaire (Vieira et al., 2000). Les LDLox induisent, dans des CE, une autophagie qui permet la dégradation des LDLox dans les autolysosomes et constitue ainsi une voie alternative au protéasome. La dégradation des LDLox par la voie de l'autophagie pourrait ainsi diminuer la mort des CE de la plaque (Zhang et al., 2010).

E.4.2.5. L'autophagie pourrait contribuer à la stabilisation de la plaque

Les macrophages jouent un rôle important dans la déstabilisation de la plaque athérosclérotique. Une étude a été réalisée sur des lapins soumis à un régime hypercholestérolémique auxquels ont été posés des stents recouverts d'un inhibiteur de mTOR, l'évérolimus, au niveau des plaques athérosclérotiques. Les stents recouverts d'inhibiteurs de mTOR ont un effet important dans la prévention de la resténose. Cette étude montre en plus que les stents recouverts d'évérolimus induisent une réponse autophagique dans les macrophages de la plaque qui conduit à la mort cellulaire et à l'élimination des macrophages. Ainsi, ces stents en induisant une mort autophagique des macrophages, qui par ailleurs ne provoquent pas de réactions inflammatoires consécutives, pourraient augmenter la stabilité des plaques (Verheye et al., 2007).

E.4.3. Effets délétères de l'autophagie dans l'athérosclérose

E.4.3.1. La formation de céroïdes par l'autophagie conduit à une altération de l'autophagie et à la mort cellulaire

En condition de stress oxydant important, une forte quantité de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est produit par la mitochondrie et diffuse dans le lysosome. L'autophagie de protéines contenant du fer induit la libération de fer dans le lysosome qui réagit avec l' H_2O_2 pour former des radicaux hydroxyles. Ces radicaux participent à la peroxydation des lipides et à la formation de céroïdes. Les céroïdes sont des complexes de protéines associées à des lipides oxydés et sont retrouvés dans les plaques d'athérosclérose avancées.

La formation des céroïdes résulte en une altération de la capacité d'autophagie car les enzymes lysosomales sont utilisées pour la dégradation des céroïdes et non plus pour les nouveaux autolysosomes formés. Finalement, l'altération de l'autophagie conduit à l'apoptose (Martinet and De Meyer, 2009).

E.4.3.2. Une autophagie excessive conduit à la mort des CMLV

L'autophagie est protectrice en condition basale mais en excès elle peut induire la mort cellulaire, cela a été en particulier montré sur des CMLV isolées à partir de plaques athérosclérotiques. Le TNF α induit une réponse autophagique caractérisée par une intense vacuolisation du cytoplasme et une augmentation d'expression de LC3-II et Beclin-1 via l'activation de JNK. L'induction de l'autophagie est corrélée à la mort autophagique des CMLV, ce qui suggère que l'autophagie pourrait favoriser la déstabilisation des plaques en induisant la mort des CMLV de la chape fibreuse (Jia et al., 2006).

II-MATERIELS et METHODES

II- Matériels et Méthodes

1. MATERIELS ET REACTIFS UTILISES

Les matériels et réactifs utilisés sont donnés dans le tableau 4.

2. CULTURE CELLULAIRE

2.1. Types cellulaires

La lignée HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cell-1) obtenue chez CDC (Atlanta, GA, USA) est entretenue dans un milieu de culture MCDB-131 supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 40 µg/mL de glutamine, 10 µg/mL de streptomycine et 100U/mL de pénicilline.

La lignée humaine macrophagique U-937 obtenue chez ATCC (LGC Standards S.a.r.l, Molsheim, France) est cultivée dans un milieu RPMI-1640-Glutamax™ supplémenté avec 10% de SVF, 10 µg/mL de streptomycine et 100U/mL de pénicilline.

La lignée de cellules endothéliales murines CRL-2181 obtenue chez ATCC est cultivée dans un milieu DMEM-Glutamax™ supplémenté avec 10% de SVF, 10 µg/mL de streptomycine et 100U/mL de pénicilline.

Les fibroblastes embryonnaires murins (MEF) CHOP^{-/-} et les MEF sauvages sont un don de David Ron (New York University Medical Center, NY, USA). Les MEFs CHOP^{-/-} et sauvages sont cultivés dans du DMEM-Glutamax™ supplémenté avec 10% de SVF comme précédemment décrit (Zinszner et al., 1998).

La lignée HMEC-1 est transfectée par un plasmide contenant la PDI mutée en N-terminal et C-terminal taggée par c-myc (pCR3.1/PDI mutant) à l'aide de lipofectamine comme agent de transfection (Invitrogen) comme précédemment décrit (Tanaka et al., 2000). 24 heures après la transfection, les colonies de cellules exprimant le plasmide et résistantes à la gentamicine sont sélectionnées en les plaçant dans un milieu de culture MCDB-131 10% SVF contenant 0,4 mg/mL de gentamicine G418 (1,5 mg/mL) (PAA laboratories). L'expression de la PDI mutante est vérifiée par Western-Blot.

Tous les types cellulaires sont cultivés en atmosphère humide en présence de 5% de CO₂ et à 37°C.

Avant chaque expérience, les cellules sont déprivées en sérum en les plaçant dans leur milieu respectif ne contenant pas de SVF pendant 24h. Avant les expériences, les cellules

Tableau 4. Matériels, réactifs et anticorps utilisés.

Nom du réactif	Fournisseur	Utilisation/Concentrations
Types Cellulaires		
HMEC-1	CDC (Atlanta, GA, USA)	Lignée de cellules endothéliales humaines
CRL-2181	ATCC (LGC standards, France)	Lignée de cellules endothéliales murines
U-937	ATCC	Lignées de monocytes/macrophages humains
MEFs CHOP-/-	David Ron (NYU medical center, USA)	Fibroblastes embryonnaires murins
Milieux de culture		
RPMI-1640	Invitrogen AC	Culture des U-937
MCDB-131	Invitrogen AC	Culture des HMEC-1
DMEM	Invitrogen AC	Culture des CRL-2181 et des MEFs
Supplémentation des milieux de culture		
Sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF)	Invitrogen AC	Culture cellulaire (10%)
Glutamine	Gibco	Culture cellulaire (40µM)
Pénicilline	Gibco	Culture cellulaire (100U/mL)
Streptomycine	Gibco	Culture cellulaire (100µg/mL)
Gentamicine G418	PAA laboratoire	Sélection et culture des cellules transfectées (1mg/mL)
Transfection cellulaire		
Lipofectamine	Invitrogen AC	Agent de tranfection des vecteurs PDI mutant
Hyperfect	Quiagen	Agent de transfection des siRNA
Plasmide pCR3.1/PDI mutant N et C-term taggé c-Myc	Don de T.Nakamura , San Diego, USA	plasmide codant pour une PDI mutée au niveau du site enzymatique
ON-TARGET plus SMART POOL L-004819-00	Dharmacon	SiRNA CHOP
ON-TARGET-plus SMART POOL L-010552-00	Dharmacon	siRNA beclin-1
ON-TARGET plus SMART POOL L-004842-00	Dharmacon	siRNA CaMKKβ

Tableau 4. Matériels, réactifs et anticorps utilisés.

Nom du réactif	Fournisseur	Utilisation/concentrations
Réactifs		
Western-Blot		
Bis-acrylamide	Euromedex	Gel polyacrylamide WB
Membrane PVDF	Millipore	Transfert protéines WB
ECL chemiluminescence kit	Amersham Pharmacia	Révélotion WB
Immunohistochimie		
EnVision®+ Dual Link System-HRP (DAB+)	Dakocytomation	Immunohistochimie
Réactifs		
4-hydroxynonéal (4-HNE)	Calbiochem	Produit d'oxydation lipidique
Inhibiteurs		
3-Méthyladénine (3-MA)	SIGMA Aldrich	Inhibiteur de l'autophagie
EGTA	SIGMA Aldrich	Chélateur de Ca ²⁺ extracellulaire (0,4mM)
SP600125	SIGMA Aldrich	Inhibiteur de JNK (10µM)
N-acétylcystéine (NAC)	SIGMA Aldrich	Anti-oxydant (10mM)
Evaluation viabilité cellulaire/apoptose/nécrose		
3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT)	Euromedex	Etude de la viabilité cellulaire
SYTO-13	Molecular Probes Invitrogen	Caractérisation de la mort cellulaire (0,6µM)
Iodure de propidium	Molecular Probes Invitrogen	Caractérisation de la mort cellulaire (15µM)
Coloration May-Grunwald-Giemsa	Merck	Détection des cellules apoptotiques
Cytométrie		
Kit human annexinV/FITC	Abcys SA	Evaluation de l'externalisation des PS
Kit PKH26-GL	SIGMA aldrich	Colorant fluorescent rouge des membranes cellulaires
Kit PKH67-GL	SIGMA aldrich	Colorant fluorescent vert des membranes cellulaires
RT-PCR quantitative		
Kit SV Total Isolation system	Promega	Extraction des ARN totaux
High Capacity cDNA reverse transcription kit	Applied Biosystems	Transcription reverse des ARNm en ADNc
Fast SYBR Green MasterMix	Applied Biosystems	Détection de l'amplification des ADNc
Mesure du calcium intracellulaire		
Fluo-3/AM	Invitrogen	Sonde calcique intracellulaire (5µM)

Tableau 4. Matériels, réactifs et anticorps utilisés.

Nom du réactifs	Fournisseur	Utilisation/ concentrations
Anticorps		
anti-Phospho-eiF2 α	Cell Signaling	WB (1/1000)
anti-LC3	Cell Signaling	WB (1/1000)
anti-Beclin-1	Cell Signaling	WB (1/1000)
anti-Phospho-JNK	Cell Signaling	WB (1/1000)
anti-Phospho-IRE1 α	Affinity Bioreagents	WB (1/10000)
anti-Caspase-12	Acris Antibodies	WB (1/1000)
anti-CHOP	Santa cruz biotechnology	WB (1/1000)
anti-phospho-AMPK (thr 172)	Cell signaling	WB (1/1000)
anti-phospho-mTOR (ser 2448)	Cell signaling	WB (1/1000)
β -actin	SIGMA aldrich	WB (1/5000)
anti-PDI	IBL, Japan	WB (1/1000)
anti-PH4B	IBL, Japan	WB (1/1000)
anti-c-Myc	IBL, Japan	WB (1/1000)
Anticorps secondaires couplés à la peroxydase (HRP)	Santa cruz Biotechnology	WB Anti-lapin (1/10000) Anti-souris (1/5000)
Anticorps secondaires couplés alexa Fluor	molecular probes	Immunocytochimie
Séquences primers Q-PCR		
FWD 5'-CAGATGAAAATGGGGGTACCT-3' REV 5'-AGAAGCAGGGTCAAGAGTGGT-3'	Invitrogen	CHOP
FWD 5'-GCAGGTGCAGGCCAGT-3' REV 5'-GAATGCCCAACAGGATATCAGACT-3'	Invitrogen	XBP1 S
FWD 5'-CCTCCCGCTTCGCTCTCT-3' REV 5'-GCTGGCGACGAAAAGA-3'	Invitrogen	GAPDH
FWD 5'-CACTCAAGTTCTTTCTGCC-3' REV 5'-ATCGTCTTCTCCATGTCTG-3'	Invitrogen	PH4B

II- Matériels et Méthodes

U937 sont préalablement différenciées en macrophages en les traitant durant 48h avec 1 ng/ml de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) (SIGMA).

2.2. Transfection par les siRNA

Les HMEC-1 sontensemencées et cultivées pendant 24h puis transfectées par les siRNA lorsqu'elles sont à 60% de confluence. Les siRNA CHOP (Dharmacon (Surrey, UK) (ON-TARGET plus SMART POOL L-004918-00) et Beclin-1 (Dharmacon ON-TARGET-plus SMART pool L-010552-00) sont utilisés à la concentration finale de 100nM et transfectés avec l'Hyperfect selon les conditions préconisées par le fabricant (Quiagen, Courtaboeuf, France). Les siRNA CHOP et Beclin-1 sont incubés pendant 48h et l'extinction de la protéine cible est vérifiée par Western Blot.

3. PREPARATION ET OXYDATION DES LDL

3.1. Préparation des LDL

Les LDL sont isolées à partir de pools de plasmas humains, provenant de sujets sains, par ultracentrifugation différentielle sur gradient de bromure de potassium (ultracentrifugeuse Beckman L5.65 ; rotor vertical Vti50). Les LDL séparées du surnageant sont purifiées par dialyse contre une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline) à 150mM de NaCl contenant 0.3 mM d'EDTA. La concentration en apoprotéine B (apoB) est déterminée par immunonéphélométrie laser (système Behring). Les LDL sont ensuite stérilisées par filtration (filtre millipore 0.22 µm) et conservées à 4°C jusqu'à utilisation.

3.2. Oxydation des LDL

Les LDL ajustées à la concentration de 2 g/L avec du PBS, sont oxydées par irradiation sous une lampe à UV-C (lampe OSRAM, 254nm, 0.5 Mw/cm², à 10 cm de la lampe) en présence de cuivre (CuSO₄ à 5µM final) pendant 2 heures, puis stérilisées par filtration.

II- Matériels et Méthodes

Pour nos expériences, les LDL sont minimalement oxydées, c'est-à-dire qu'elles ne subissent pas d'altération majeure de l'apoB. Elles contiennent de 71 à 104 nmol d'hydroperoxydes lipidiques par mg d'apoB et de 6,4 à 9,7 nmol de TBARS par mg d'apoB.

4. IMMUNODETECTION

4.1. Extraction et dosages des protéines cellulaires

4.1.1. Extraction des protéines totales

Après stimulation, les cellules sont lavées dans du PBS + 1mM orthovanadate de sodium (OV) et 1mM phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) et grattées à l'aide d'un rubber policeman. Les cellules sont centrifugées à 4000 rpm pendant 4 minutes puis solubilisées dans un tampon d'extraction (Tris pH 7,4 10 mM, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, déoxycholate de sodium 1%, sodium dodécyl sulfate (SDS) 0,1%, OV 1 mM, fluoride de sodium 5 mM, PMSF 1 mM, leupeptine 1µg/L, aprotinine 1µg/mL), lysées mécaniquement à la seringue et incubées 30 minutes sur la glace. Le lysat cellulaire est centrifugé à 13000 rpm pendant 10 minutes. Les protéines contenues dans le surnageant sont dosées par la méthode colorimétrique de Bradford.

4.1.2. Immunoprécipitation

Les lysats protéiques totaux sont obtenus comme précédemment décrit. 1 mg de protéines sont repris dans 500 µL de tampon d'extraction et incubés avec 5 µg d'anticorps immunoprécipitant sous agitation pendant une nuit à 4°C. 5 mg de billes de A-sépharose sont ensuite ajoutées et incubées 1h à 4°C sous agitation. Après centrifugation à 1500 rpm pendant 1 min, les culots sont lavés 5 fois avec du tampon d'extraction puis repris dans 15 µL de tampon de dénaturation 2X (Tris 200 mM pH6,8, SDS 8%, glycérol 40%, bleu de bromophénol 0,4%) puis dénaturé à 95°C pendant 5 minutes.

4.1.3. Extraction de protéines à partir de tissus

II- Matériels et Méthodes

Des vaisseaux issus d'endartériectomie sont utilisés pour l'immunohistochimie (IH) et pour les Western Blot. L'extraction de protéines à partir de ces tissus est réalisée suivant le même protocole mais nécessite une étape préalable de broyage. Les tissus sont broyés dans un tampon d'extraction (Tris pH 7,4 10 mM, NaCl 150 mM, 1% Triton X-100, déoxycholate de sodium 1%, sodium dodécyl sulfate (SDS) 0,1%, OV 1 mM, fluorure de sodium 5 mM, PMSF 1 mM, leupeptine 1µg/L, aprotinine 1µg/mL), lysés 30 minutes dans la glace et placés à -20°C. Après centrifugation 15 min à 14000 rpm, les protéines sont dosées dans le surnageant à l'aide de la méthode colorimétrique de Bradford.

4.2. Electrophorèse des protéines en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et Western-Blot (WB)

Les échantillons (40µg de protéines) sont repris dans du tampon de dénaturation 4X (Tris 200 mM, pH 6,8 ; SDS 8% ; glycérol 40% ; bleu de bromophénol 0,4%) (1 volume de tampon de dénaturation pour 3 volumes d'échantillon), chauffés 5 min à 95°C pour être dénaturés. Ils sont ensuite déposés sur gel de polyacrylamide pour la séparation par électrophorèse. Les protéines sont ensuite électrotransférées en milieu liquide sur une membrane de PVDF. Les sites de liaison non spécifiques sont saturés pendant 2h à température ambiante (TA) par une solution de TBS 1X contenant 0,1% de Tween 20 (pH 7,4) (TBST) et 3% de BSA, puis la membrane est incubée sous agitation pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire. La membrane est alors rincée 6 fois 10 minutes avec du TBST puis incubée 1h à TA avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La membrane est révélée à l'aide du kit de chimioluminescence (ECL). Afin de vérifier que les quantités de protéines déposées sont identiques dans chaque condition testée, la membrane est déshybridée puis réincubée avec un anticorps anti-βactine et à nouveau révélée.

4.3. Immunocytochimie

Les cellules sont cultivées et stimulées sur des lamelles de verre. Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 15 minutes à 4°C, puis perméabilisées avec du PBS 0,1% Triton X100 pendant 10 minutes. Après saturation des sites de liaison non spécifiques

II- Matériels et Méthodes

pendant 1 heure dans du PBS 3% BSA, les lamelles sont incubées pendant 1h avec l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome est déposé dans les mêmes conditions. Les lamelles sont ensuite montées avec une goutte de Fluoprep sur lame et la fluorescence est visualisée au microscope à contraste de phase et en fluorescence.

4.4. Immunohistochimie

Les artères humaines proviennent d'endartériectomie (Service de Chirurgie Cardiovasculaire du CHU Rangueil, Pr. Cerène). Après enrobage au Tissu-Tek, les prélèvements sont congelés à l'azote liquide, puis conservés à -80°C. Les coupes (7µM) sont effectuées au cryomicrotome puis fixées 5 minutes à l'acétone. Le kit utilisé est le kit EnVision® + Dual Link System-HRP (DAB+) (DakoCytomation). Dans un premier temps, toute activité de peroxydase endogène est inhibée en incubant l'échantillon avec du Dual Endogenous Enzyme Block pendant 5 à 10 minutes. Puis les sites non spécifiques sont bloqués avec 10% de sérum provenant de la même espèce que l'anticorps secondaire. L'échantillon est incubé 30 minutes avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS 2% BSA, puis 30 minutes avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué dans du PBS 2% BSA. La peroxydase est révélée en incubant les échantillons 5 à 10 minutes avec du tampon contenant de la 3',3'-diaminobenzidine. Après contre coloration avec de l'hématoxyline, le montage des lames est réalisé, après déshydratation, avec le milieu de montage Eukitt.

5. MESURE DU CALCIUM INTRACELLULAIRE

Le calcium libre cytosolique est mesuré grâce à la sonde Fluo3/acétométhyl ester (AM) (Molecular Probes). Après deux rinçages avec une solution saline d'HBSS (HBS 135mM, NaCl 5,9 mM, KCl 1,2 mM, MgCl₂ 1,5mM, CaCl₂ 1,5mM, HEPES 11,6 mM, glucose 11,5 mM pH 7,3), les cellules sont incubées avec la sonde (reconstituée dans 88µL de DMSO) dans de l'HBSS supplémenté avec 5µM de Fluo3/AM, 0,02% de pluronic F-127 et 1 mg/mL de BSA, pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules sont rincées une fois à l'HBSS supplémenté et une fois à l'HBSS, grattées dans 500µL d'HBSS, puis la fluorescence est mesurée

II- Matériels et Méthodes

(longueur d'onde d'excitation = 488 nm ; longueur d'onde d'émission = 526 nm). Les résultats de fluorescence sont normalisés avec le taux de protéines et exprimés en pourcentage du contrôle.

6. EVALUATION DE LA CYTOTOXICITE : APOPTOSE ET NECROSE

6.1. Test de viabilité cellulaire au MTT

Le MTT (bromure de 3-[4,5- diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) est un sel de tétrazolium (jaune, soluble) qui se transforme en formazan (bleu, insoluble) après réduction par les enzymes de la chaîne respiratoire de la mitochondrie lorsque les cellules sont vivantes. Les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS à 37°C puis incubées en présence de MTT (à 1g/L) pendant 30 minutes à 37°C. Le milieu est éliminé et les cristaux de formazan sont dissous par 1 mL de diméthyl sulfoxyde (DMSO). La lecture se fait par spectrophotométrie (570 nm), les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle.

6.2. Marquage des cellules au SYTO13 / Iodure de Propidium

Le SYTO 13 et l'iodure de propidium (IP) sont des colorants cellulaires permettant de caractériser la mort cellulaire en microscopie à fluorescence. Le SYTO 13 est un intercalant fluorescent perméant qui colore en vert le noyau des cellules ne présentant pas de modification de perméabilité membranaire, c'est-à-dire les cellules vivantes ou les cellules en apoptose précoce. L'IP est un intercalant fluorescent non perméant qui colore en rouge les noyaux des cellules présentant une perméabilité membranaire, c'est-à-dire les cellules en nécrose ou en nécrose post-apoptotique. Les cellules sont incubées avec un mélange des deux colorants, le SYTO13 est utilisé à la concentration finale de 0,6µM et l'IP à 15µM. Les cellules sont incubées 15 min puis observées au microscope à fluorescence. Les cellules vivantes présentent une coloration diffuse verte de la chromatine, les cellules apoptotiques présentent une chromatine condensée verte ou orange associées à une fragmentation nucléaire. A la différence des cellules apoptotiques, les cellules en nécrose post-apoptotique

II- Matériels et Méthodes

ont une chromatine condensée rouge. Les cellules nécrotiques ont une chromatine colorée en rouge et diffuse.

6.3. Coloration de May-Grunwald-Giemsa

La coloration de May-Grunwald-Giemsa est réalisée sur des échantillons fixés au méthanol. Cette coloration permet d'identifier les cellules apoptotiques suivant les critères morphologiques suivant : condensation du noyau et de la chromatine, bourgeonnement de la membrane plasmique, réduction du volume cellulaire et formation de corps apoptotiques.

7. PCR QANTITATIVE EN TEMPS REEL

Les cellules sont récupérées par action de la trypsine puis lavées dans du PBS avant d'être solubilisées dans le tampon de lyse SV RNA lysis Buffer (PROMEGA). Les ARN totaux sont purifiés à l'aide du kit SV Total Isolation System (PROMEGA) et 1µg d'ARN totaux sont utilisés pour la transcription réverse avec le kit High capacity cDNA reverse transcription de chez Applied Biosystems.

Une analyse en PCR quantitative en temps réel est utilisée pour évaluer la quantité d'ARNm de CHOP, XBP1s, PDI et GAPDH. Les séquences des primers utilisées sont données dans le tableau 4. Le kit Fast SYBR Green MasterMix (Applied Biosystems) est utilisé pour la détection de l'amplification. Avant l'amplification en PCR, les produits de la RT sont dilués au 1/10^e et 5µL d'ADNc dilué sont utilisés. Un mix est réalisé : 5 d'ADNc dilué au 1/10^e est ajouté à 10µL de SYBR Green et 2,5µL de chaque amorce sens et anti-sens à 10mM final. L'amplification est réalisée avec le Stepone Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Le programme d'amplification utilisé est le suivant : 95°C pendant 20s (Activation de l'enzyme), puis 40 cycles de 3s à 95°C (Dénaturation) et 30 sec à 60° (Hybridation/Elongation). Pour chaque échantillon, l'amplification est réalisée en duplicate, les résultats sont normalisés par le gène de référence GAPDH. Les données sont analysées avec le logiciel Stepone Software v2.0.

8. CYTOMETRIE EN FLUX

II- Matériels et Méthodes

8.1. Marquage AnnexineV/IP

Des expériences de cytométrie en flux ont été réalisées pour évaluer l'externalisation des phosphatidylsérines après marquage par l'annexineV-FITC. Après les traitements décrits, les HMEC-1 sont collectées par trypsinisation, resuspendues et marquées avec l'anticorps annexinV-FITC et l'iodure de propidium à l'aide du kit human annexinV-FITC kit (Abcys SA, France) selon les instructions du fournisseur. Les cellules sont analysées sur un cytomètre FACScan (BD Biosciences), la fluorescéine est détectée avec le laser FL1-H, l'iodure de propidium est détecté avec le laser (FL3-H). Les données sont analysées avec le logiciel Cell Quest Software (Becton Dickinson Co., USA). Les cellules apoptotiques sont représentées par les populations de cellules annexinV+/PI- (apoptose précoce), et annexinV+/PI+ (apoptose tardive ou nécrose post-apoptotique).

8.2. Etude de la phagocytose

Les cellules HMEC-1 sont transfectées avec les siRNA scramble ou Beclin-1 (100nM) pendant 48h puis colorées en rouge avec le colorant fluorescent PKH26-GL (SIGMA). Les U-937 sont colorés en vert avec le colorant fluorescent PKH67-GL suivant les instructions du fabricant puis activés par un traitement au PMA 1ng/mL pendant 48h. Les HMEC-1 marquées sont traitées avec les LDLox (200µg/mL) pendant 24 heures afin d'induire l'apoptose. Les HMEC-1-PKH26 sont alors récupérées avec précaution, lavées dans du PBS puis superposées sur les U-937-PKH67. Les cocultures sont maintenues pendant 8h puis les cellules sont détachées par traitement à la trypsine-EDTA, lavées dans du PBS et analysées en FACScan. Le marquage PKH26 est détecté avec le laser FL3-H, PKH67 avec le laser FL1-H. Le contrôle négatif est préparé par mélange de HMEC-1 PKH26 et U-937 PKH67 non traitées et mélangé juste avant la lecture. L'analyse des données est réalisée avec le logiciel Cell Quest Software. La double population PKH67-PKH26 est définie comme la population de U-937 ayant phagocyté les HMEC-1.

II- Matériels et Méthodes

9. MESURE DE L'ACTIVITE DE PDI

Le substrat de PDI, Di-E-GSSG, est préparé comme précédemment décrit (Raturi and Mutus, 2007). Les HMEC-1 sauvages ou exprimant la PDI mutée, stimulées ou non avec les LDLox ou le 4-HNE, sont resuspendues dans 250µL de PBS, pH 7.0 contenant 2 mmol/L d'EDTA (PDI buffer). L'activité réductrice de PDI est mesurée dans 500µl de PDI buffer contenant le substrat Di-E-GSSG (150 nmol/L), du DTT (5 µmol/L) et la suspension cellulaire (50-100µg protéine dose par la technique de Bradford). La cinétique de réduction du substrat Di-E-GSSG est suivie en fluorimétrie à t0, t15 and t30 min d'incubation à 37°C avec le substrat, (excitation 525 nm, émission 545 nm) (Raturi and Mutus, 2007). L'activité de PDI est calculée comme étant la différence entre la fluorescence à t30 et la fluorescence à t0, les données sont exprimées par le ratio fluorescence/ fluorescence du contrôle non stimulé.

10. ANALYSE STATISTIQUE

Les moyennes (+/- écart-type) des différents résultats obtenus ainsi que leur analyse statistique ont été réalisées avec un test de Student (Sigma Stat softawre). Les résultats pour lesquels $p < 0,05$ sont considérés comme statistiquement significatifs.

III- OBJECTIFS et RESULTATS

1. OBJECTIFS

L'apoptose des cellules vasculaires joue un rôle critique dans les phénomènes de rupture de plaque et de thrombose qui sont à l'origine des complications graves de l'athérosclérose.

La stabilité des plaques d'athérosclérose dépend d'un équilibre entre voies de survie et d'apoptose, qui est modulé par la présence de nombreux facteurs pro-athérogènes et par l'environnement pro-inflammatoires des lésions. Parmi les facteurs pro-athérogènes présents dans les plaques, les LDLox jouent un rôle dans la formation des lésions primaires de l'athérogénèse, mais également au cours de l'évolution des plaques vers des stades plus avancés. En effet, les LDLox sont apoptotiques pour les cellules vasculaires, via une dérégulation du Ca^{2+} cytosolique (Ingueneau et al, 2009), ce qui induit une activation d'enzymes Ca^{2+} -dépendantes telles que les calpaïnes, et la voie mitochondriale de l'apoptose avec la libération de cytochrome c et l'activation des caspases (Vindis et al., 2005).

Les HDL ont des propriétés anti-athérogènes qui incluent une inhibition de l'oxydation des LDL et la formation des cellules spumeuses. Les HDL bloquent la signalisation des LDLox, en particulier leur effet apoptotiques, via une inhibition de la dérégulation du Ca^{2+} cytosolique (Suc et al., 1997). Cependant, les voies apoptotiques des LDLox, de même que les mécanismes anti-apoptotiques des HDL restent encore partiellement indentifiés. Les travaux récents de l'équipe montrent que le stress du RE est impliqué dans l'apoptose induite par les LDLox et est présent dans les plaques avancées d'athérosclérose (Sanson et al., 2009 ; Sanson et al., 2008). L'effet anti-apoptotique des HDL pourrait donc en partie résulter de l'inhibition du stress du RE.

D'autre part, les protéines chaperones présentes dans le RE (Bip, ORP150, PDI) ont des effets anti-apoptotiques (Sanson et al., 2008 ; Uehara et al., 2006 ; Wang et al., 2010). Par exemple, la surexpression de la protéine chaperonne ORP150 inhibe le stress du RE et protège contre l'apoptose induite par les LDLox, alors que l'inhibition de son expression potentialise les effets toxiques des LDLox (Sanson et al., 2008). De même, d'autres travaux montrent que l'inhibition de l'activité enzymatique de la protéine disulfide isomérase (PDI), qui intervient dans le contrôle du repliement correct des protéines dans le RE, potentialiserait l'apoptose induite par certains agents de stress (Uehara et al., 2006).

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier 1/ l'effet des HDL sur le stress du RE et la signalisation apoptotique dépendante du stress du RE, induite par les LDLox dans les cellules endothéliales humaines (HMEC-1) et 2/ l'implication de PDI dans l'induction du stress du RE et l'apoptose induite par les LDLox.

Ce travail présente trois parties :

1/ Rôle des HDL dans l'inhibition du stress du RE et de l'autophagie induits par les LDLox- Article n°1

2/ Voie de signalisation impliquées dans l'autophagie induite par les LDLox : Etude de la voie AMPK-mTOR

3/ Rôle de la chaperonne Protéine Disulfide Isomérase (PDI) dans le stress du RE et l'apoptose induits par les LDLox- Article n°2

2. RESULTATS

2.1. Rôle des HDL dans l'inhibition du stress du RE et de l'autophagie induits par les LDLox

2.1.1. Introduction

L'une des étapes initiales de la formation de la plaque d'athérosclérose résulte de l'accumulation de LDL dans l'espace sous-endothélial des artères de gros et moyens calibres, où elle subissent des modifications oxydatives. Les LDLox présentent de nombreuses propriétés biologiques qui participent au développement et à l'évolution des lésions d'athérosclérose. Ainsi, les LDLox sont pro-inflammatoires et induisent une dysfonction endothéliale, l'expression de molécules d'adhésion, de facteurs chémoattractants et de facteurs de différenciation des macrophages. Les effets cellulaires des LDLox dépendent de leur concentration locale et de la présence de produits d'oxydation lipidique (aldéhydes, hydroperoxydes, oxystérols) (Salvayre et al., 2002). A dose faible les LDLox sont mitogènes et induisent la prolifération des CML (Auge et al., 2002) alors que les doses élevées sont apoptotiques pour les cellules vasculaires (Vindis et al., 2005). Les LDLox pourraient donc d'une part, participer au développement de la chape fibreuse qui résulte de la migration et de la prolifération des CML dans l'intima, et d'autre part, elles pourraient contribuer à la fragilité et à la rupture de la plaque de par leurs propriétés apoptotiques. La signalisation apoptotique des LDLox fait intervenir des voies dépendantes ou indépendantes des caspases (Vindis et al., 2005) et une dérégulation de l'homéostasie calcique intracellulaire (Ingueneau et al., 2009). Par ailleurs, la présence des LDLox dans l'environnement cellulaire induit l'activation de voies de survie qui interviennent dans l'équilibre prolifération/survie/apoptose, et donc dans la stabilité ou la fragilité de la lésion d'athérosclérose. Le stress du RE représente un système à l'interface survie/mort cellulaire puisque son activation induit l'UPR qui a pour but de restaurer la fonction du RE lors de stress cellulaire, mais peut générer une apoptose, lorsque le stress est intense ou prolongé (Boyce et al., 2008). Le stress du RE est présent dans les plaques athérosclérotiques mais sa fonction reste imprécise. Nous avons récemment montré que le stress du RE est activé par les LDLox et participe à l'apoptose des cellules endothéliales microvasculaires HMEC-1 (Sanson et al., 2009) et annexe 1). Par ailleurs,

certaines études montrent un lien entre l'UPR et l'autophagie, un processus de dégradation lysosomale qui, comme le stress du RE, serait impliqué dans la survie mais participerait à la mort cellulaire en cas de stress intense ou prolongé (Levine and Yuan, 2005).

A l'inverse des LDL, les HDL possèdent un ensemble de propriétés anti-athérogènes qui protègent contre le développement de l'athérosclérose (Negre-Salvayre et al., 2006). Les mécanismes par lesquels les HDL protègent contre l'apoptose ne sont que partiellement connus et impliquent entre autre, une inhibition de la dérégulation calcique induite par les LDLox (Suc et al., 1997).

Le premier objectif présenté dans ce travail a été d'étudier si l'effet anti-apoptotique des HDL implique une inhibition du stress du RE induit par les LDLox. Nous avons également étudié l'induction de la réponse autophagique par les LDLox, les liens potentiels entre l'autophagie et le stress du RE et les conséquences sur la mort cellulaire, ainsi que l'effet des HDL sur cette voie de survie.

2.1.2. Muller, C., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A., and Vindis, C. (2010). HDLs inhibit endoplasmic reticulum stress and autophagic response induced by oxidized LDLs. *Cell Death Differ.* 2011 May ; 18(5) :817-28.

HDLs inhibit endoplasmic reticulum stress and autophagic response induced by oxidized LDLs

C Muller^{1,2}, R Salvayre^{1,2}, A Nègre-Salvayre¹ and C Vindis^{*1}

The apoptotic effect of oxidized LDLs (oxLDLs) is mediated through a complex sequence of signaling events involving a deregulation of the cytosolic Ca^{2+} homeostasis. OxLDLs also trigger ER stress that may lead to cellular dysfunction and apoptosis, through the activation of the IRE1 α /c-Jun N-terminal kinase pathway. Moreover, ER stress and oxidized lipids have been shown to trigger autophagy. The antiatherogenic high-density lipoproteins (HDLs) display protective effects against oxLDLs toxicity. To more deeply investigate the mechanisms mediating the protective effects of HDLs, we examined whether ER stress and autophagy were implicated in oxLDLs-induced apoptosis and whether HDLs prevented these stress processes. We report that, in human endothelial cells, HDLs prevent the oxLDL-induced activation of the ER stress sensors IRE1 α , eIF2 α and ATF6 and subsequent activation of the proapoptotic mediators JNK and CHOP. OxLDLs also trigger the activation of autophagy, as assessed by LC3 processing and Beclin-1 expression. The autophagic process is independent of the proapoptotic arms of ER stress, but Beclin-1 contributes to PS exposure and subsequent phagocytosis of oxLDLs exposed cells. Induction of autophagy and PS exposure by oxLDLs is prevented by HDLs. Finally, the cytosolic Ca^{2+} deregulation triggered by oxLDLs is a common signaling pathway that mediates ER stress-induced cell death and autophagy, all these events being blocked by HDLs.

Cell Death and Differentiation (2011) 18, 817–828; doi:10.1038/cdd.2010.149; published online 26 November 2010

An initiating event in atherogenesis is the accumulation of low-density lipoproteins (LDLs) in the subendothelial space where they may undergo oxidative modifications.¹ Oxidized LDLs (oxLDLs) exhibit a variety of atherogenic properties including foam cell formation, inflammatory response, cell proliferation at low concentration and apoptosis at higher concentration.^{1,2} OxLDLs may alter the fragile balance between survival and death of vascular cells, thereby, leading to plaque instability and finally to atherothrombotic events.^{3,4} The proapoptotic effects of oxLDLs are mediated through a complex sequence of signaling events that lead to the activation of several caspase-dependent or caspase-independent apoptotic pathways.^{2,5,6} Previously, we reported that treatment of human vascular endothelial and smooth muscle cells with oxLDLs or 7-ketocholesterol (a major oxysterol in oxLDLs) causes an increase in cytosolic Ca^{2+} through TRPC1 channels that triggers a proteolytic cascade involving Ca^{2+} -dependent calpains, Bid cleavage and cytochrome *c* release, leading finally to caspase-3 activation and apoptosis.^{7–9}

Recently, we have reported that oxLDLs induced the unfolded protein response (UPR) and triggered endoplasmic reticulum (ER) stress.⁹ ER is a sensor for cellular stress, as it rapidly detects changes in cell homeostasis, and responds by

triggering UPR via the activation of ER transmembrane sensors, PERK and IRE1 α (two serine/threonine kinases), and ATF6 which acts as a transcription factor. The UPR results in a temporary downregulation of protein translation, an upregulation of ER chaperones and folding machinery, and the expression and activation of ER-associated degradation (ERAD). Prolonged ER stress switches toward apoptotic cell death via the activation of downstream signals like CHOP, JNK and members of the Bcl-2 family.^{10,11} ER stress markers (phosphorylation of IRE1 α and expression of KDEL motif-bearing proteins) in human advanced atherosclerotic lesions,⁹ raising the question of the possible role of ER stress in the stability/unstability of atherosclerotic plaques, as this new adaptive response may determine the fate of cells to survive or die.¹¹ Autophagy is involved in the turnover of cellular macromolecules,¹² which could mediate, in part, the removal of ER-accumulated protein, via the ER-associated chaperone GRP78/Bip,¹³ and the release of Ca^{2+} from the ER into the cytosol.¹⁴ Striking observations link ER stress with autophagy, which is rather considered as an antiatherogenic mechanism, as it could selectively induce macrophage cell death, which is thought to limit inflammation and has a protective role in vulnerable plaque stabilization.¹⁵ Although

¹INSERM U-858, Department of Vascular Biology, IFR-150, CHU Rangueil, Toulouse, France and ²Faculty of Medicine, University Paul Sabatier, Toulouse, France
*Corresponding author: C Vindis, INSERM U858/I2MR Department of Vascular Biology, IFR150, Hôpital Rangueil 1, avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse cedex 4, France. Tel: +335 6132 2705; Fax: +335 6132 2953; E-mail: cecile.vindis@inserm.fr

Keywords: oxidized LDLs; HDLs; ER stress; calcium; autophagy; apoptosis

Abbreviations: Apo, apolipoprotein; ATF, activating transcription factor; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; BiP, binding immunoglobulin protein; CHOP, C/EBP homologous protein; EGTA, ethylene glycol-bis(β -amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; eIF2 α , eucaryotic translation initiation factor -2, α subunit; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, endoplasmic reticulum associated degradation; GRP78, 78-kDa glucose-regulated protein; HDL, high-density lipoprotein; HMEC-1, human microvascular endothelial cell-1; IRE1 α , Inositol-requiring kinase 1 α ; JNK, c-Jun N-terminal kinase; KDEL, ER retention peptide KDEL (i. e., Lys Asp Glu Leu); LC3, microtubule-associated protein-1 light-chain 3; 3-MA, 3-methyladenine; MEF, mouse embryonic fibroblasts; mTOR, mammalian target of rapamycin; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide; NF- κ B, nuclear factor- κ B; oxLDLs, oxidized Low-density lipoproteins; PERK, PKR (protein kinase regulated by RNA) like endoplasmic reticulum Kinase; PI, propidium iodide; PS, phosphatidylserine; siRNA, small interfering RNA; TRAF2, TNF receptor-associated factor 2; TRPC1, transient receptor potential canonical channel 1; UPR, unfolded protein response; XBP1s, X-box-binding protein 1 spliced form

Received 12.2.10; revised 23.9.10; accepted 14.10.10; Edited by H-U Simon; published online 26.11.10

considered as a survival mechanism, autophagy may also mediate a non-apoptotic cell death in case of prolonged ER stress, or when apoptotic pathways are blocked.¹⁶

Contrary to LDLs, high-density lipoproteins (HDLs) exhibit antiatherogenic and cardioprotective properties.¹⁷ Besides their classical function in the reverse cholesterol transport, HDLs possess anti-inflammatory and antioxidant properties.¹⁸ HDLs inhibit LDLs oxidation, and counteract several adverse biological effects, such as cytotoxicity and inflammatory response triggered by cytokines, oxLDLs or oxidants.^{18,19} HDLs counterbalance the proinflammatory effect of oxLDLs by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise and subsequent NF- κ B activation in vascular cells,²⁰ and by preventing the formation of oxLDLs-induced carbonyl-protein adducts.⁸ Recently, the anti-inflammatory role of HDLs has been linked to a reduced induction of ER stress elicited by oxidized phospholipids, including the expression of ATF-3, ATF-4 and spliced XBP1 genes.²¹ In view of the literature, the multiple molecular mechanisms implicated in the antiatherogenic effect of HDLs are only partly understood.

In the current study, we report that HDLs are able to prevent both ER stress/UPR induction and autophagic response triggered by oxLDLs. This protective effect of HDLs is mediated, by their ability to prevent the cytosolic Ca²⁺ deregulation evoked by oxLDLs, behind the activation of ER stress and autophagy.

Results

ER stress induced by oxLDLs is prevented by HDLs in endothelial cells. We recently reported that oxLDLs induce the activation of the three ER stress sensors as assessed by the phosphorylation of IRE1 α , PERK and of the PERK substrate eIF2 α and by the nuclear translocation of ATF6.⁹ In the present study, we investigated the effect of HDLs on the activation of these ER stress sensors elicited by oxLDLs stimulation. Our data show that pre-treatment of HMEC-1 cells with HDLs, followed by coincubation with oxLDLs significantly reduced the time-dependent phosphorylation of IRE1 α and eIF2 α (Figure 1a and b). Likewise, the detection of the transcription factor ATF6 in cells treated with oxLDLs, indicative of the release of its cytosolic domain was prevented by HDLs (Figure 1c). Activation of IRE1 α and ATF6 promotes the transcription of UPR target genes such as spliced XBP1 mRNA. Consistent with the inhibitory effect observed on IRE1 α and ATF6, the induction of spliced XBP1 mRNA by oxLDLs was reduced by HDLs to 40% compared with oxLDLs-treated cells (Figure 1d). We also investigated the activation of the caspase-12, which is located at the ER and activated by excess ER stress through IRE1 α .²⁵ In mouse endothelial cells, oxLDLs treatment leads to the processing of caspase-12, which is partly prevented by HDLs (Figure 1e).

Collectively, these data indicate that HDLs inhibit the activation of ER stress sensors induced by oxLDLs. As oxLDLs trigger a prolonged ER stress activation, which may have a role in apoptotic cell death through the IRE1-TRAF2-JNK pathway and CHOP expression,⁹ we then

checked the effect of HDLs on the ER stress-dependent apoptotic signaling.

JNK activation and CHOP expression, two ER stress proapoptotic mediators activated by oxLDLs, are inhibited by HDLs. Toxic concentrations of oxLDLs trigger a time-dependent activation of the JNK pathway and expression of CHOP mRNA and protein (Figure 2a and b). The same conditions elicit apoptosis as evaluated by cell viability and morphological analysis of cells stained by SYTO-13/PI and May-Grünwald-Giemsa (Figure 2c and e). JNK and CHOP are implicated in oxLDLs-induced apoptosis, as suggested by the protective effect of the JNK inhibitor SP600125, CHOP-specific siRNA and the use of mouse embryonic fibroblasts CHOP^{-/-} (MEFs CHOP^{-/-}) (Figure 2c and d).

Interestingly, the protective role of HDLs against the apoptotic effect of oxLDLs, was correlated with the potent inhibitory effect of HDLs against JNK activation and CHOP expression triggered by oxLDLs (Figure 2a–c and e).

Taken together, these results suggest that the protective effect of HDLs may result, in part, from their ability to inhibit the oxLDLs-induced ER stress and subsequent ER stress-dependent activation of JNK and CHOP expression.

Autophagic markers expression induced by oxLDLs is prevented by HDLs. As oxidized lipids and oxidative stress may trigger autophagy in vascular cells^{26,27} as well as ER stress,⁹ and as autophagy may act as a protective mechanism or a death process, we investigated whether, autophagy was activated by oxLDLs and whether HDLs interfere with autophagic process.

During autophagosome formation, the unconjugated soluble form LC3-I is processed and converted to the phosphatidylethanolamine (PE)-conjugated form (LC3-II), which is then incorporated into autophagosomal membrane.²⁸ Our results show that oxLDLs trigger a time-dependent increase in LC3-II and the occurrence of LC3-positive dots as a sign of autophagy in HMEC-1 (Figure 3a and b). In contrast, pre-treatment of cells with HDLs, inhibited the rise of LC3-II, and the formation of LC3-positive dots in cells treated by oxLDLs (Figure 3a and b). To confirm the activation of autophagy by oxLDLs, we examined the expression status of Beclin-1, a protein which participates in a complex essential for autophagy and whose expression is increased during autophagy.²⁹ Time course experiments showed an increased expression of Beclin-1, (Figure 3c and d), thus, supporting the hypothesis that oxLDLs trigger the expression of autophagic markers. Similar to the inhibition of LC3 processing by HDLs, Beclin-1 expression was downregulated by HDLs pre-treatment.

In order to examine whether autophagy process induced by oxLDLs is relevant to atherogenesis, we investigated whether oxLDLs induced autophagic markers in human macrophages. OxLDLs triggered a time-dependent increase in LC3-II in U-937 cells (Figure 4a). This is in agreement with previous studies showing the stimulation of autophagy by oxidized lipids in plaque cells.¹⁵ Interestingly, our results show for the first time in macrophages that the oxLDL-induced autophagic

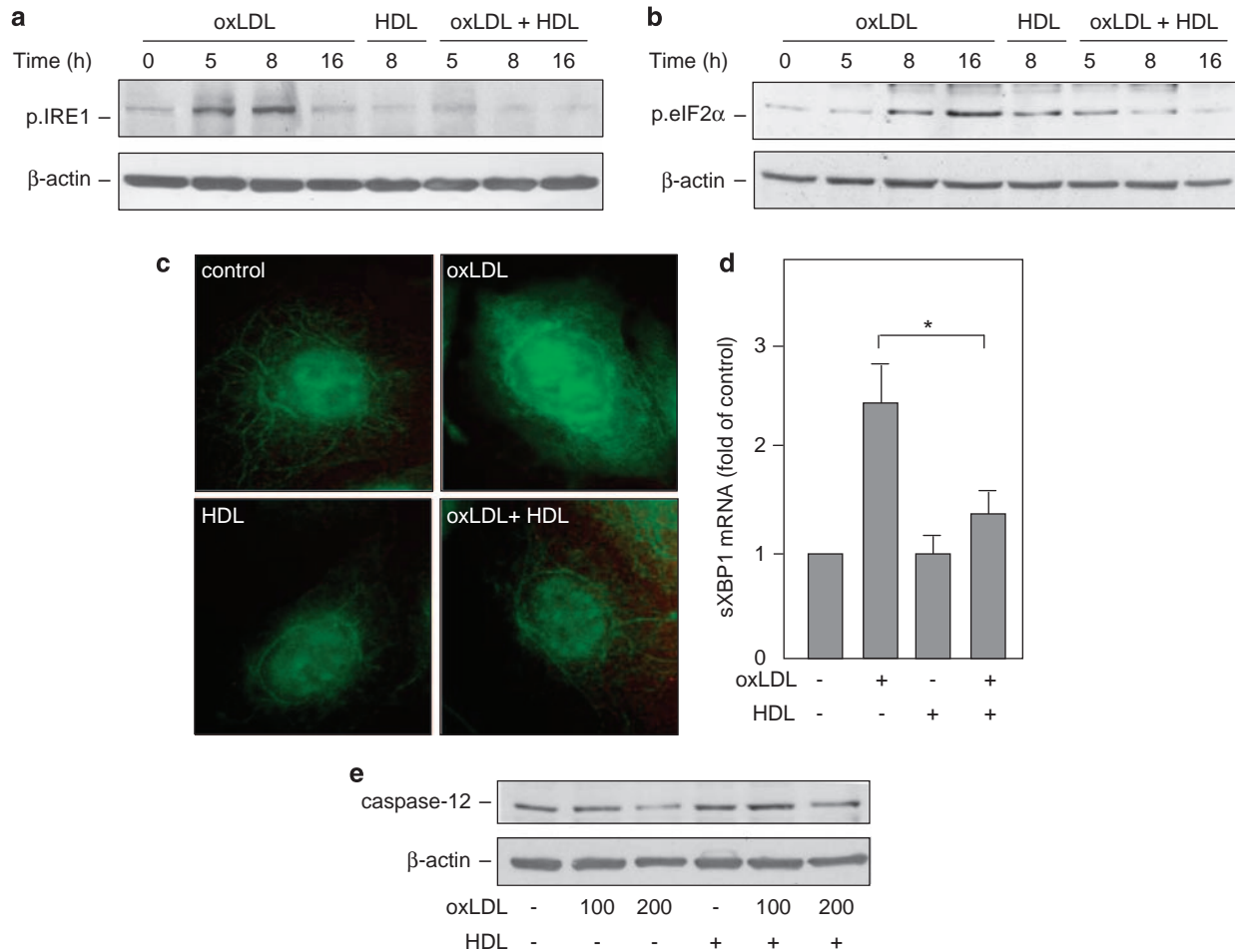


Figure 1 HDLs prevent oxLDLs-triggered UPR/ER stress activation in HMEC-1 cells and caspase-12 processing in mouse endothelial cells. Time course of phosphorylation of IRE1 α and eIF2 α in HMEC-1 cells treated with oxLDLs (200 μ g ApoB/ml) or pre-incubated with HDLs (200 μ g ApoA/ml) for 1 h. Cell lysates were assessed for phospho-IRE1 α (a) and phospho-eIF2 α (b) protein expression by western blot analysis, β -actin expression was used as protein loading control. (c) Immunocytochemistry experiments show the cytoplasmic and nuclear translocation of ATF6 in HMEC-1 cells treated with oxLDLs (200 μ g ApoB/ml) for 16 h or pre-incubated with HDLs (200 μ g ApoA/ml) for 1 h. These data are representative of three separate experiments. (d) Real-time PCR experiments showing mRNA expression of human spliced form XBP1 (sXBP1) in HMEC-1 cells treated with oxLDLs (200 μ g ApoB/ml) for 16 h or pre-treated with HDLs (200 μ g ApoA/ml) for 1 h, relative mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA. The data are expressed as mean \pm S.E.M. of four separate experiments, * P < 0.05 indicates significance (comparison between OxLDL and OxLDL + HDL groups). (e) Processing of procaspase-12 in mouse endothelial cells treated with oxLDLs (100 or 200 μ g ApoB/ml) or pre-incubated with HDLs (200 μ g ApoA/ml) for 1 h. Cell lysates were assessed for caspase-12 protein expression by western blot analysis, β -actin expression was used as protein loading control. Blots are representative of three independent experiments

process is downregulated by HDLs (Figure 4a), as well as apoptosis (Figure 4b and c).

We next investigated whether the autophagic response has a role in oxLDLs-induced cell death. Indeed, excessive or prolonged autophagy may ultimately lead to cell death either in collaboration with apoptosis or as a backup mechanism when the former is defective.¹⁶ To assess whether autophagy has a role in oxLDLs-induced apoptosis, Beclin-1 was silenced by siRNA treatment. Beclin-1 siRNA were used here because they exhibit no toxic effect *per se*, whereas the prolonged treatment with the classical autophagic inhibitor 3-methyl-adenine (3-MA) was toxic for the HMEC-1, under the used conditions.

The inhibitory effect of siRNA on Beclin-1 expression became obvious 48 h after transfection (Figure 5a). Beclin-1 silencing did not alter the rate of cell death induced by oxLDLs

treatment in HMEC-1, as evaluated by the MTT assay and morphological analysis of cells (Figure 5b). It should be noted that similar results were obtained in macrophages, as inhibition of autophagy by 3-MA (which did not exhibit toxic effect in U-937 cells) did not affect oxLDL-induced cell death (Figure 4c).

To substantiate that autophagy is not involved in oxLDLs-induced apoptosis, but instead could be a stress response concomitant with ER stress, we performed quantitation of annexin V binding to apoptotic cells. Surprisingly, Beclin-1 silencing by siRNA led to a decreased proportion of annexin V-positive cells, as compared with scramble siRNA (Figure 5c). This discrepancy between annexin V, SYTO-13/PI labeling and MTT assay may be explained by the fact that oxLDLs-triggered autophagy may be implicated in the phosphatidylserine (PS) exposure process, but has only a

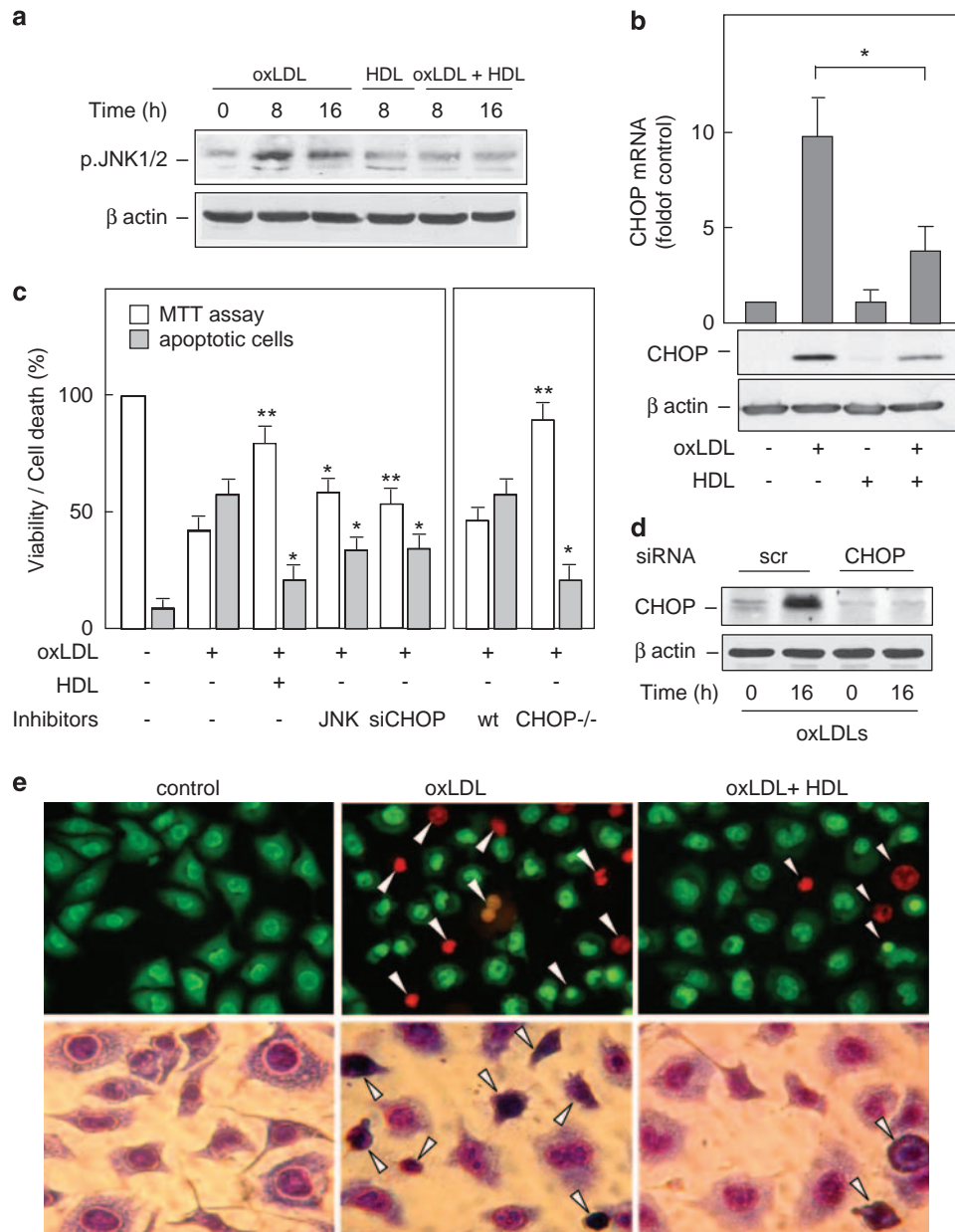


Figure 2 CHOP surexpression, JNK activation and apoptosis induced by oxLDLs are inhibited by HDLs in HMEC-1 cells. **(a)** Time course of JNK phosphorylation in HMEC-1 cells treated with oxLDLs (200 µg ApoB/ml) or pre-treated with HDLs (200 µg ApoA/ml) for 1 h. Western blot experiments were performed on total protein extracts using anti-phospho-JNK antibody and β-actin expression was used as loading control. **(b)** Real-time PCR (upper panel) and western blot experiments (lower panel) were performed to analyze CHOP mRNA and protein expression levels. HMEC-1 cells were treated with oxLDLs (200 µg ApoB/ml) for 16 h or pre-treated with HDLs (200 µg ApoA/ml) for 1 h. Relative mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA (upper panel). The data are expressed as mean ± S.E.M. of four separate experiments, **P* < 0.05 indicates significance (comparison between OxLDL and OxLDL + HDL groups). Cell lysates were assessed for CHOP protein expression by western blot analysis, β-actin expression was used as protein loading control. Blots are representative of three independent experiments. **(c left panel)** Cell toxicity was evaluated by the MTT assay and apoptotic cells were counted after staining with SYTO13/PI. HMEC-1 cells were pre-treated with HDLs (200 µg ApoA/ml), JNK inhibitor SP600125 (10 µmol/l) or siRNA CHOP (siCHOP) 100 nM then treated with oxLDLs (200 µg ApoB/ml). **(c right panel)** MEFs CHOP^{-/-} and wild type were treated with oxLDLs (200 µg ApoB/ml) and cell toxicity was analyzed as described. Results are expressed as percentage of untreated control and represent the mean ± S.E.M. of three separate experiments (***P* < 0.01 and **P* < 0.05 indicate significance for the MTT test and apoptotic cells counting. For HMEC cells comparisons were made between OxLDL and OxLDL + HDL, OxLDL and OxLDL + JNK inhibitor or OxLDL and OxLDL + siCHOP groups), and for MEFs comparisons were made between wild-type and CHOP^{-/-} cells treated with oxLDL. **(d)** CHOP expression induced by oxLDLs is prevented by CHOP siRNA. Time course of CHOP expression in HMEC-1 cells treated with oxLDLs (200 µg ApoB/ml) following transfection with 100 nM scramble (scr) siRNA or 100 nM CHOP siRNA. Blots are representative of three independent experiments. **(e)** Morphological characterization of cell death in HMEC-1 cells treated with oxLDLs (200 µg ApoB/ml) or pre-incubated with HDLs (200 µg ApoA/ml) for 1 h. Upper panel, cells were stained with SYTO13/PI as described in the Materials and methods section and observed under inverted fluorescence microscope. Lower panel, cells were stained with May-Grunwald-Giemsa as described in the Materials and methods section. The results are representative of three separate experiments

minor role on the whole apoptotic program (metabolic status and morphological characteristics of apoptosis explored by the MTT assay and SYTO13/PI labeling, respectively). Beclin-1 is involved in the phagocytic removal of dying cells during embryonic development through a mechanism that required PS exposure.³⁰ Thus, we hypothesized that in our cellular model, Beclin-1 could contribute to PS exposure and phagocytosis of oxLDLs exposed cells. We checked whether Beclin-1 deficiency could modify the clearance of oxLDLs exposed HMEC-1 cells by macrophages. To analyze engulfment by macrophages, we used a well-characterized assay for phagocytosis.³¹ PKH26 (red dye)-labelled HMEC-1 transfected with Beclin-1 or scramble siRNA and treated with oxLDLs, were cocultured with PKH67 (green dye)-labelled U-937 macrophages and the uptake of red-labelled HMEC-1

by green-labelled U-937 was measured by FACS analysis. The presence of double-positive cells (green and red cells, quadrant 2) indicated that the uptake of oxLDLs exposed HMEC-1 cells by macrophages is significantly reduced when HMEC-1 cells were silenced for Beclin-1 (Figure 6a and b). The data reported in Figure 5c and Figure 6 are consistent, and suggest that Beclin-1 silencing reduced both PS exposure in oxLDLs-treated HMEC-1 cells and the subsequent phagocytosis by macrophages.

Altogether, these results indicate that Beclin-1 may be involved in the generation of PS exposure and may be implicated in the phagocytic removal of PS-exposing cells. Thus, autophagy induction by oxLDLs could facilitate phagocytosis of oxLDLs exposed cells.

To investigate whether the ER stress-dependent (i.e., JNK- and CHOP-mediated) proapoptotic pathways were implicated in the trigger of autophagic response, we analyzed LC3 processing after oxLDLs treatment in MEFs CHOP^{-/-} or wild type. The processing of LC3-I to LC3-II was not inhibited in MEFs CHOP^{-/-} compared with wild type (Figure 7a) and by the JNK inhibitor SP600125 (Figure 7b), thus, suggesting that this step of autophagy triggered by oxLDLs does not require the ER stress-dependent apoptotic pathway.

Taken together, these results suggest that ER stress is involved in oxLDLs-induced apoptosis and is blocked by HDLs. Like ER stress, autophagy is activated by oxLDLs, and is inhibited by HDLs. This led us to investigate whether both ER stress and autophagy are activated by a common signaling pathway evoked by oxLDLs, and possibly inhibited by HDLs.

Calcium mediates oxLDLs-induced ER stress and autophagy: inhibition by HDLs. We previously reported that oxLDLs-induced apoptosis results from a deregulation of the cytosolic Ca²⁺ homeostasis, characterized by a delayed and intense Ca²⁺ rise occurring several hours after the

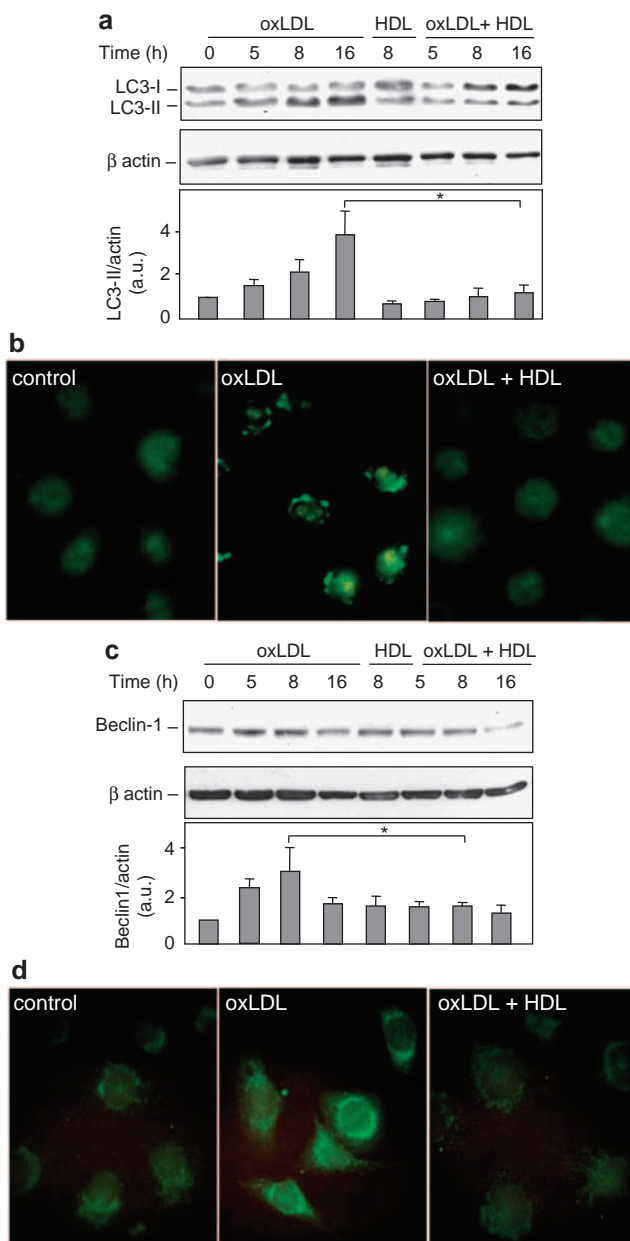


Figure 3 HDLs inhibit oxLDLs-triggered LC3 processing and Beclin-1 expression in HMEC-1 cells. (a) Time course conversion of LC3-I to the phosphatidylethanolamine (PE)-conjugated form LC3-II in HMEC-1 cells treated by oxLDLs (200 µg ApoB/ml) or pre-incubated with HDLs (200 µg ApoA/ml) for 1 h. Western blot experiments were performed on total protein extracts using anti-LC3 antibody and β-actin expression was used as loading control. The graph represents values of LC3-II band intensity after normalization for β-actin by densitometry, *P < 0.05 indicates significance, comparison between OxLDL 14 h and OxLDL 14 h + HDL. Blots are representative of three independent experiments (b) Fixed cells were immunostained for LC3 and revealed LC3-positive signals with appearance of punctate structures under oxLDLs treatment (200 µg ApoB/ml) and no LC3-positive signals when cells were pre-incubated with HDLs (200 µg ApoA/ml). The results are representative of three separate experiments. (c) Time course induction of Beclin-1 expression in HMEC-1 cells treated by oxLDLs (200 µg ApoB/ml) or pre-incubated with HDLs (200 µg ApoA/ml) for 1 h. Western blot experiments were performed on total protein extracts using anti-Beclin-1 antibody and β-actin expression was used as loading control. The graph represents values of Beclin-1 band intensity after normalization for β-actin by densitometry, *P < 0.05 indicates significance, comparison between OxLDL 8 h and OxLDL 8 h + HDL. Blots are representative of three independent experiments. (d) Fixed cells were immunostained for Beclin-1 and revealed some nuclear and perinuclear staining under oxLDLs treatment (200 µg ApoB/ml) but inhibited by pre-incubation with HDLs (200 µg ApoA/ml). The results are representative of three separate experiments

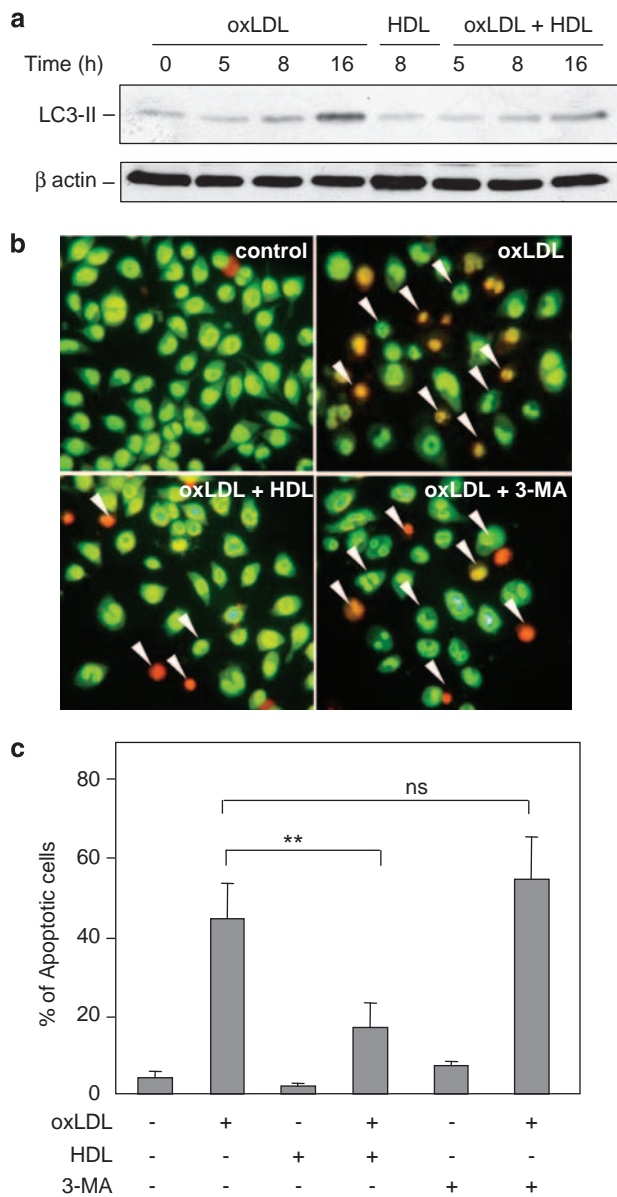


Figure 4 HDLs inhibit LC3 processing and cell death induced by oxLDLs in human macrophages. (a) Time course conversion of LC3-I to the phosphatidylethanolamine (PE)-conjugated form LC3-II in U937 cells treated by oxLDLs (200 μ g ApoB/ml) or pre-incubated with HDLs (200 μ g ApoA/ml) for 1 h. Western blot experiments were performed on total protein extracts using anti-LC3 antibody and β -actin expression was used as loading control. (b) Morphological characterization of cell death in U937 cells treated with oxLDLs (200 μ g ApoB/ml) or pre-incubated with HDLs (200 μ g ApoA/ml) or 3-MA (5 mM) for 1 h. Cells were stained with SYTO13/PI as described in the Materials and methods section and observed under inverted fluorescence microscope. The results are representative of three separate experiments. (c) Apoptotic cells were counted after staining with SYTO13/PI. U937 cells were pre-treated with HDLs (200 μ g ApoA/ml) or 3-MA (5 mM) then treated with oxLDLs (200 μ g ApoB/ml). Results are expressed as percentage of untreated control and represent the mean \pm S.E.M. of three separate experiments. ** $P < 0.01$ indicates significance, comparison between OxLDL and OxLDL + HDL, ns means not significant for the comparison between OxLDL and OxLDL + 3-MA

beginning of the pulse with oxLDLs.^{5,8} Interestingly, Hoyer-Hansen *et al.*¹⁴ demonstrate that a rise in free cytosolic Ca^{2+} is a potent inducer of autophagy which suggests that

apoptosis and autophagy share many of the same regulators. The rise in cytosolic Ca^{2+} triggered by oxLDLs was completely blocked in cells pre-treated by HDLs (Figure 8a). To investigate whether the increase in cytosolic Ca^{2+} induced by oxLDLs may participate in the induction of ER stress and autophagy, HMEC-1 cells were pre-incubated with the Ca^{2+} chelator EGTA (which inhibits both calcium deregulation and apoptotic signaling induced by oxLDLs^{6,7}). HMEC-1 cells pre-treatment with EGTA inhibited the overexpression of CHOP, the nuclear translocation of ATF6 and the phosphorylation of eIF2 α and JNK, all events triggered by oxLDLs (Figure 8b–d). Likewise, the chelation of Ca^{2+} completely abolished the processing of LC3-I to LC3-II and the increase in Beclin-1 expression observed with oxLDLs treatment (Figure 8d).

Altogether, these results indicate that the cytosolic Ca^{2+} deregulation mediated by oxLDLs participates in the induction of ER-stress and autophagic responses. In addition, our data strongly suggest that HDLs, by inhibiting the Ca^{2+} rise induced by oxLDLs, prevent the activation of ER stress and autophagy.

Discussion

In this study, we report that ER stress induced by oxLDLs in human vascular cells, and involved in apoptosis, is inhibited by HDLs. We provide evidence that oxLDLs-induced autophagy is involved in PS exposure and contributes to the phagocytosis of oxLDL exposed cells. This autophagic response is inhibited by HDLs pre-treatment. Both ER stress and autophagy activation by oxLDLs depend on the deregulation of cytosolic Ca^{2+} homeostasis, also involved in apoptosis.

The first important result of this study is that ER stress induction by oxLDLs, and its subsequent ER stress-dependent apoptosis is inhibited by HDLs. We report that HDLs inhibit the phosphorylation of the proximal sensor of ER stress, IRE1 α and of the PERK substrate eIF2 α , as well as the activation of ATF6 triggered by oxLDLs. Moreover, and in agreement with the results of Gharavi *et al.*,²¹ we found that HDLs prevent the induction of spliced XBP1 mRNA. As previously reported, oxLDLs triggered a long-lasting ER stress, that switched toward apoptosis, as supported by the increased expression of the proapoptotic transcription factor CHOP, which is induced through the three sensors ATF6, PERK and IRE1 α pathways. As expected from their inhibitory effect on the sensors, HDLs inhibit the induction of CHOP by oxLDLs. CHOP triggers the transcription of proapoptotic genes³² and inhibits the antiapoptotic effect of Bcl-2.³³ Its implication in atherosclerosis has been recently reported in mice double knock down for CHOP and ApoE, which exhibit a lower extent of atherosclerotic lesions, and less necrotic regions within the plaque.³⁴ These data suggest that ER stress and particularly CHOP, may promote cell death within the vascular wall and atherosclerosis. Interestingly, HMEC-1 cells silenced for CHOP by siRNA, or fibroblasts issued from CHOP $^{-/-}$ mice,³² were partly resistant to the cytotoxic effect of oxLDLs, which supports a role for ER stress and CHOP in oxLDLs-mediated apoptosis, in agreement with Tabas *et al.*³⁴ Moreover, we show that HDLs inhibit the phosphorylation of

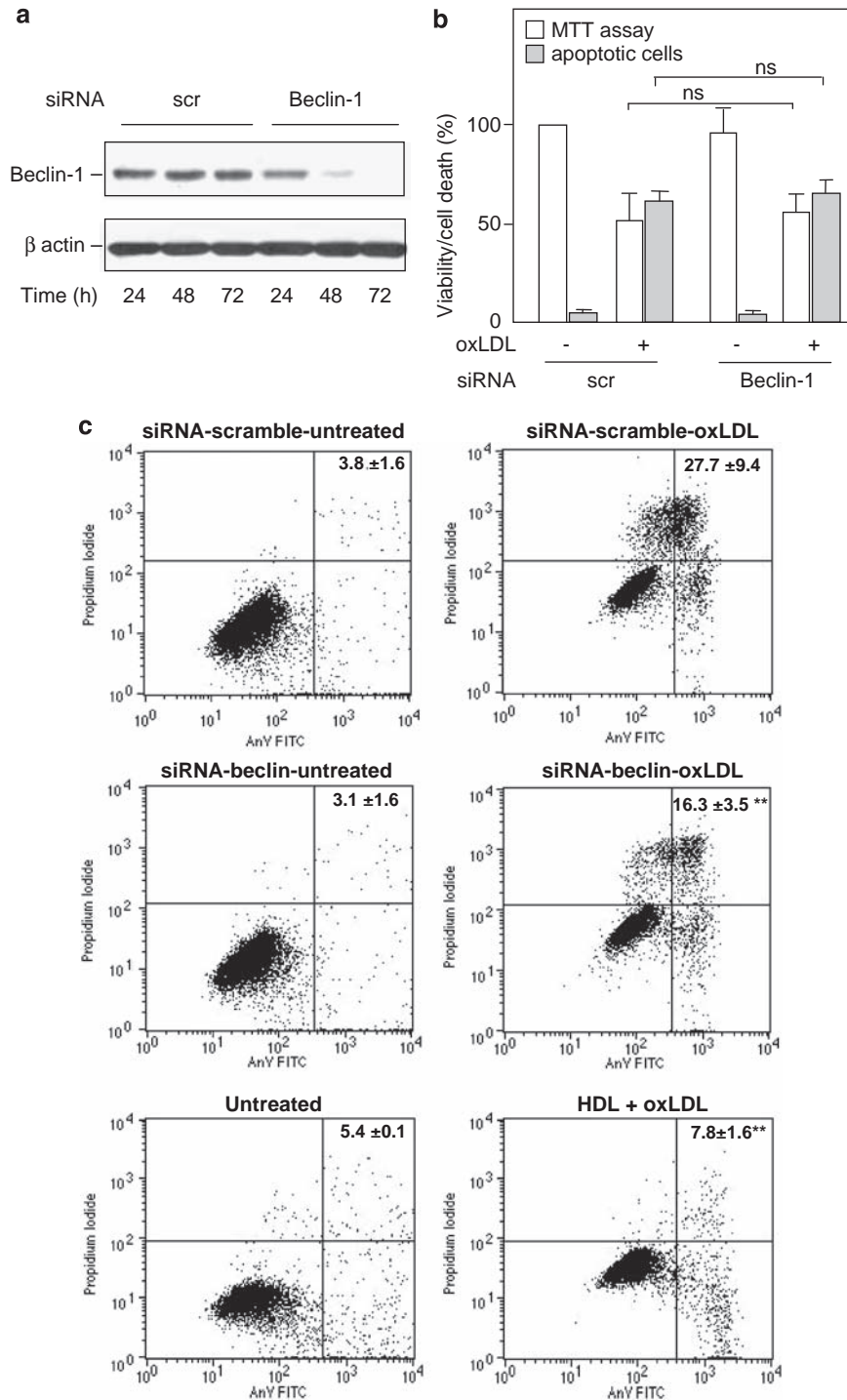


Figure 5 Beclin-1 is not involved in oxLDLs-induced cell death. **(a)** Time course of Beclin-1 expression in HMEC-1 cells transfected with 100 nM scramble (scr) siRNA or 100 nM beclin-1 siRNA. Western blot experiments were performed on total protein extracts using anti-beclin-1 antibody and β -actin expression was used as loading control. **(b)** OxLDLs-induced cell toxicity was evaluated by the MTT assay and apoptotic cells were counted after staining with SYTO13/PI. HMEC-1 cells were transfected with 100 nM scramble siRNA or 100 nM beclin-1 siRNA for 48 h then incubated with oxLDLs (200 μ g ApoB/ml). Results are expressed as percentage of untreated control and represent the mean \pm S.E.M. of three separate experiments, ns means not significant for the comparison between siRNA-scramble + OxLDL and siRNA-beclin + OxLDL. **(c)** Determination of cell death by flow cytometry of annexin V-FITC/PI staining in HMEC-1 cells transfected with 100 nM siRNA scramble (scr) or 100 nM siRNA beclin-1 for 48 h and then incubated with oxLDLs (200 μ g ApoB/ml). Antiapoptotic effect of HDLs were also assessed, HMEC-1 cells were pre-incubated with HDLs (200 μ g ApoA/ml) for 1 h then treated with oxLDLs (200 μ g ApoB/ml). Cells were labeled with annexin V-FITC and PI and analyzed by flow cytometry. Percentages (mean \pm S.E.M. of five independent experiments) of annexin V-positive cells (annexin V⁺/PI⁻ or annexin V⁺/PI⁺) cells are indicated. ** $P < 0.01$ indicates significance, comparisons were between siRNA-scramble + OxLDL and siRNA-beclin + OxLDL or between siRNA-scramble + OxLDL and HDL + OxLDL.

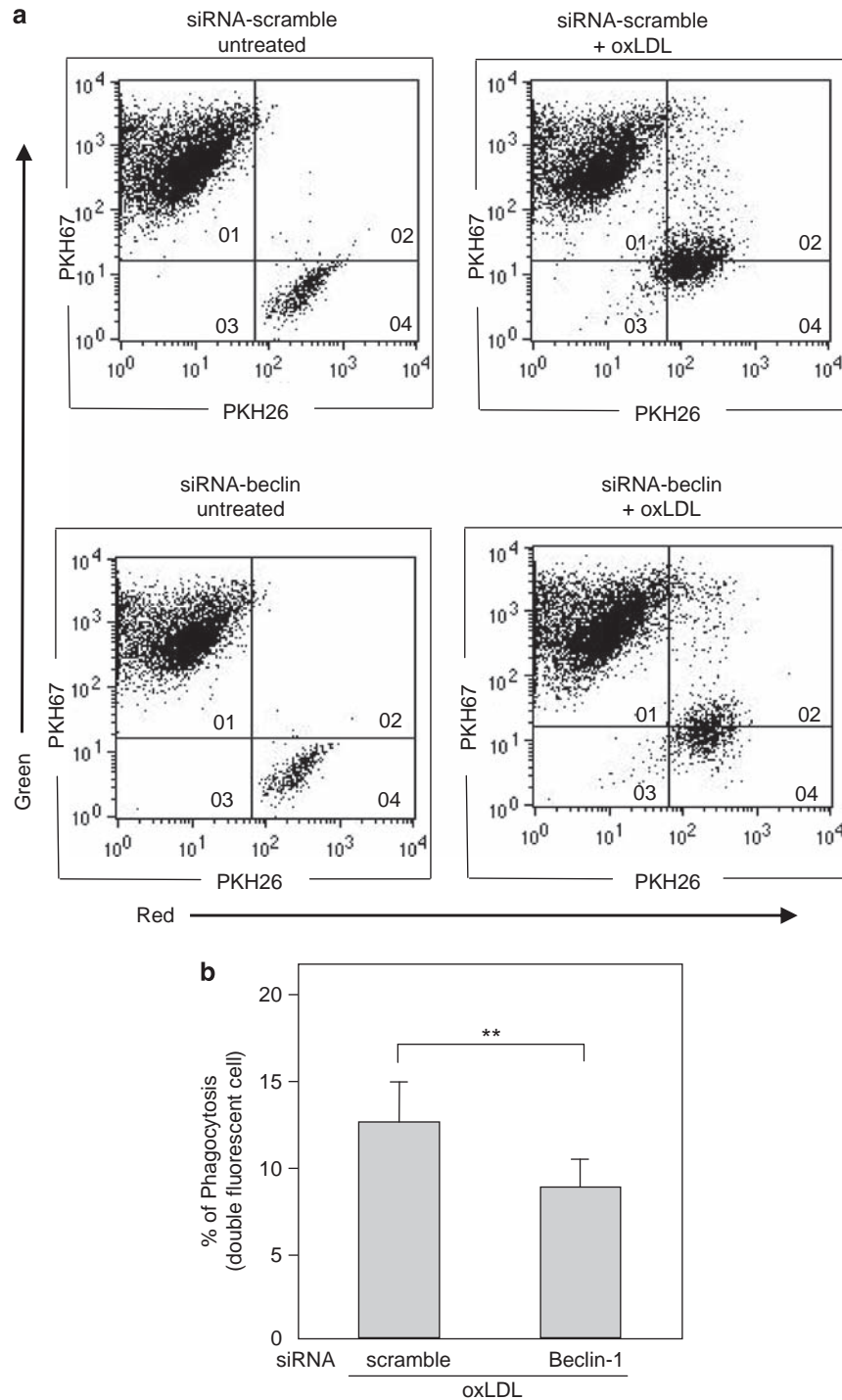


Figure 6 Beclin-1 is involved in phagocytosis of HMEC-1 cells exposed to oxLDLs. (a) Representative flow cytometry analysis of phagocytosis of apoptotic HMEC-1 cells by U-937 cells. PKH26-labelled HMEC-1 cells (red) transfected with 100 nM siRNA scramble (scr) or 100 nM siRNA beclin-1 and treated with oxLDLs (200 μ g ApoB/ml) or untreated, were overlaid on PKH67-labelled U-937 cells (green). After 8 h of coculture, cells were harvested and analyzed using flow cytometry, quadrant 1 (upper left): green fluorescent macrophages only; quadrant 2 (upper right): double fluorescent macrophages phagocytosed apoptotic HMEC-1 cells, quadrant 4 (lower left): red fluorescent HMEC-1 cells only. (b) Bar chart shows the average of double fluorescent human macrophages that phagocytosed apoptotic HMEC-1 cells transfected with 100 nM siRNA scramble (scr) or 100 nM siRNA beclin-1 and treated with oxLDLs. Data are presented as mean \pm S.E.M. of four independent experiments. ** $P < 0.01$ indicates significance, comparison was between siRNA-scramble + OxLDL and siRNA-beclin1 + OxLDL.

JNK induced by oxLDLs, which in our system is activated by IRE1 α , and is involved in ER stress-dependent apoptosis 9, via the JNK proapoptotic pathway, as reported.⁴⁰ The effect of

oxLDLs and HDLs on ER stress-induced apoptosis is also favoured by caspase-12 processing that occurs upon oxLDLs stimulation and which is inhibited by HDLs in murine

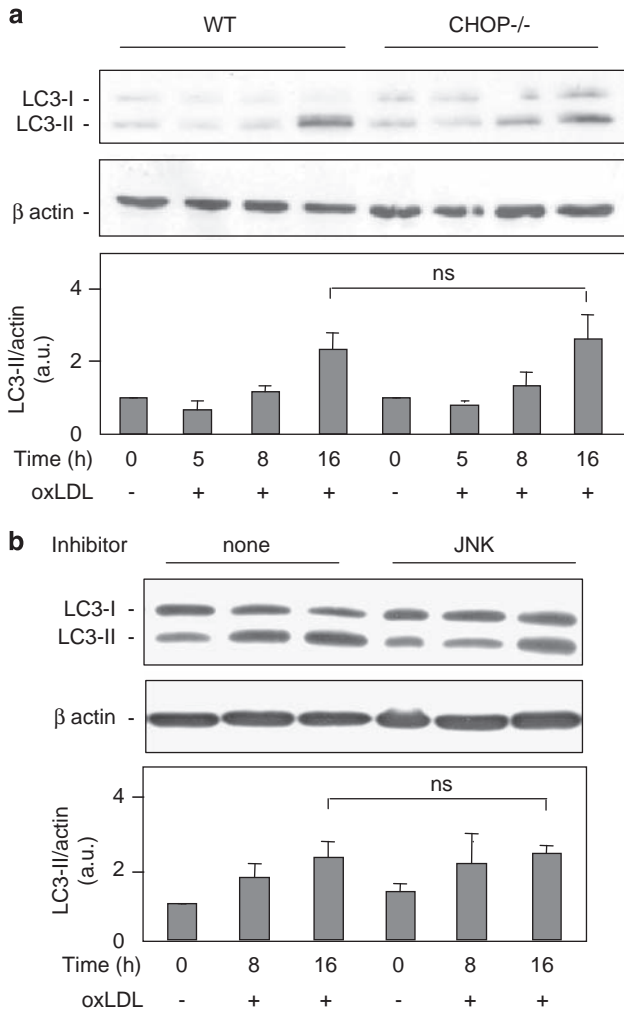


Figure 7 OxLDLs-induced autophagic response is independent of the ER stress-mediated apoptosis pathway. **(a)** Time course conversion of LC3-I to the phosphatidylethanolamine (PE)-conjugated form LC3-II in MEFs CHOP^{-/-} and wild-type cells treated with oxLDLs (200 μg ApoB/ml). The graph represents values of LC3-II band intensity after normalization for β-actin by densitometry, ns means not significant for the comparison between OxLDL and OxLDL + HDL at the indicated times. **(b)** Time course conversion of LC3-I to the phosphatidylethanolamine (PE)-conjugated form LC3-II in HMEC-1 pre-incubated without (none) or with the JNK inhibitor SP600125 (10 μmol/l), then treated with oxLDLs (200 μg ApoB/ml). The graph represents values of LC3-II band intensity after normalization for β-actin by densitometry, ns means not significant for the comparison between OxLDL and OxLDL + HDL at the indicated times. Western blot experiments were performed on total protein extracts using anti-LC3 antibody and β-actin expression was used as loading control. Blots are representative of three separate experiments

endothelial cells. Our results are consistent with previous studies showing that caspase-12 could be the initiator caspase in ER-stress mediated apoptosis.²⁵ However, the precise role of caspase-12 in human is still undefined and need further investigation as human caspase-12 gene encodes an aberrant caspase. Altogether, these data emphasize the inhibitory effect of HDLs on ER stress as a major feature in HDLs antiapoptotic mechanism.

To precise the mechanisms mediating the protective effects of HDLs, we examined the potential relationship of oxLDLs-

induced ER stress with autophagy. Indeed, autophagy is thought to be a part of the ER stress response probably as an alternate to ER-associated protein degradation (ERAD) if the latter is overloaded.³⁵ Autophagy is thought to alleviate ER stress and inhibit apoptosis, by mediating, in part, the removal of ER-accumulated protein, via the ER-associated chaperone GRP78/BiP, and the release of Ca²⁺ from the ER into the cytosol. However, in case of prolonged ER stress, the protective effect of autophagy may switch to cell death.¹⁵ The formation of LC3-II, as an essential step in the formation of the pre-autophagosome, and the increase in Beclin-1 expression are classical index of autophagy induction.¹² In our experimental conditions, we observed a processing of LC3 and an increased expression in Beclin-1, concomitant with the activation of ER sensors by oxLDLs, indicating that autophagy is activated in HMEC-1 cells stimulated by oxLDLs. These data are consistent with recent reports showing that 7-ketocholesterol, a major oxysterol present in oxLDLs²⁶ and lipid peroxidation-derived aldehyde (4-hydroxynonenal, 4-HNE) are potent autophagy and ER stress inducers.¹⁵ Indeed, increasing reports indicate that ER stress inducers (i.e., thapsigargin, tunicamycin) upregulate autophagy-related genes,³⁶ thus, connecting ER stress to autophagy by UPR activation. It may be noted that the use of SP600125 JNK inhibitor or MEFs CHOP^{-/-} (which protects, in part, against oxLDLs apoptosis), did not suppress LC3 processing, indicating that oxLDLs-induced autophagy is independent of the ER stress apoptotic pathway. Although autophagy could also represent a protective and survival mechanism,¹² we showed that Beclin-1 silencing by siRNA and 3-MA did not alter the whole apoptotic program (metabolic status and morphological characteristics of apoptosis) induced by oxLDLs. Nevertheless, we observed that Beclin-1 silencing led to a decreased proportion of annexin V-positive cells, thus, suggesting that oxLDLs-triggered autophagy may be implicated in morphological changes such as PS exposure. Indeed, Qu *et al.*³⁰ showed that Beclin-1 is dispensable for programmed cell death, but is essential for the generation of engulfment signals such as PS exposure which are required for dead-cell clearance during development. Using a phagocytosis assay, we found that HMEC-1 cells silenced for Beclin-1 and exposed to oxLDLs displayed less recognition and uptake by macrophages. These results suggest that oxLDLs exposed cells undergo autophagy activation and PS exposure (a 'eat-me' signal³⁰) through a common mechanism involving Beclin-1. It is tempting to speculate that this process might be rather antiatherogenic by favouring the degradation of cellular components modified by oxidized lipids which are known to alter cell functions and to induce inflammatory and thrombotic events.³⁷ In contrast to this protective role, the loss of endothelial cells (subsequent to PS exposure-induced phagocytosis) may lead to increased vascular permeability and platelet aggregation which may enhance the atherogenic process and the risk of thrombosis, respectively.

HDLs, used under antiapoptotic conditions, prevent also ER stress and autophagic response triggered by oxLDLs. To our knowledge, this is the first report showing that HDLs are able to prevent autophagy, but this result was unexpected, because HDLs are antiapoptotic, and because autophagy is generally considered as a protective mechanism. This

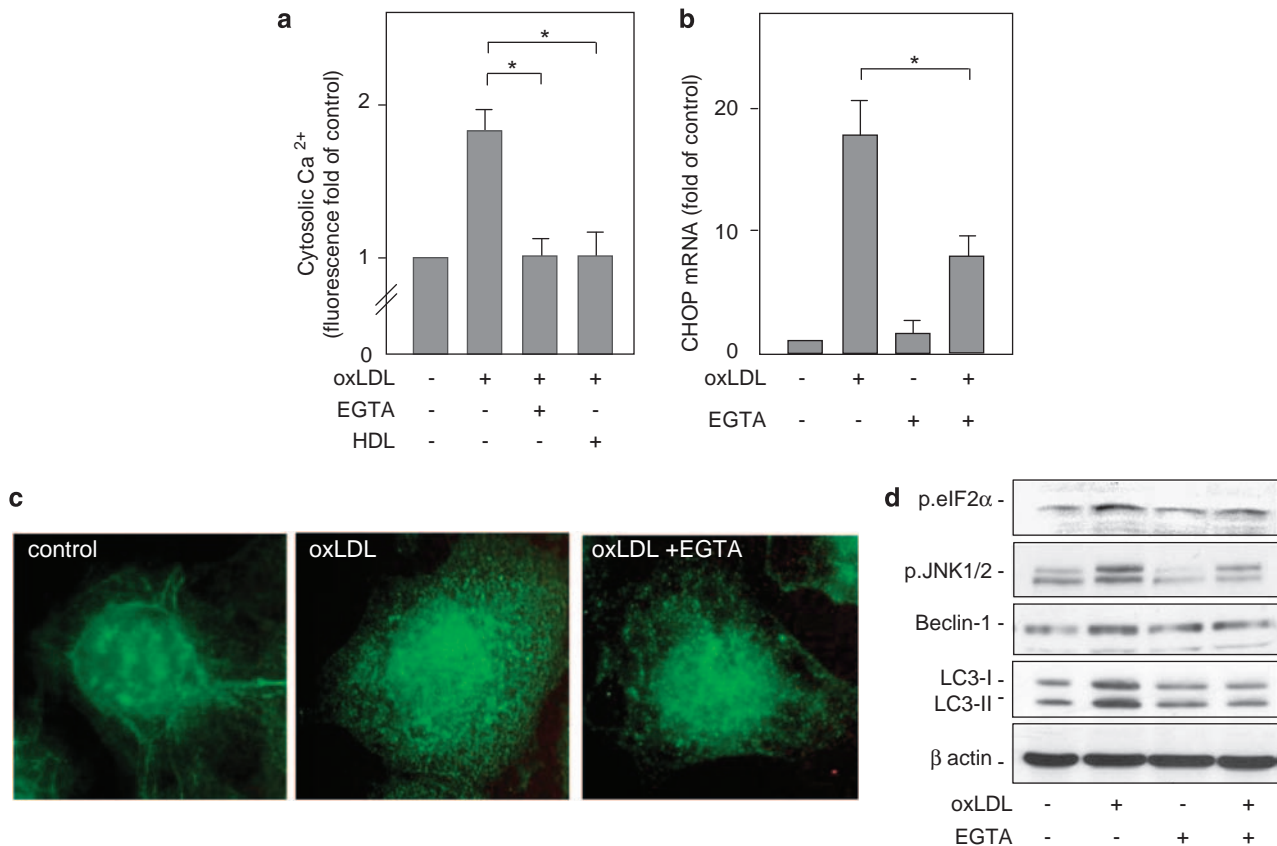


Figure 8 OxDLs-induced cytosolic Ca²⁺ deregulation is inhibited by HDLs. ER stress and autophagy response triggered by oxLDLs are prevented by the Ca²⁺ chelator EGTA. (a) HMEC-1 cells were pre-incubated with EGTA (0.4 mmol/l) or HDLs (200 μ g ApoA/ml) for 1 h, then treated with oxLDLs (200 μ g ApoB/ml) for 12 h. The variation of intracellular (Ca²⁺) was detected by fluorescence intensity using Fluo3/AM (495 and 525 nm excitation and emission wavelength, respectively) as described under Materials and methods section. Results were normalized on protein levels and expressed in ratio to untreated control. The data are expressed as mean \pm S.E.M. of three separate experiments (* P < 0.05 indicates significance, comparisons were made between OxLDL and OxLDL + EGTA or OxLDL and OxLDL + HDL). (b) Real-time PCR was performed to analyze CHOP mRNA expression levels. HMEC-1 cells were pre-incubated with or without EGTA (0.4 mmol/l) then treated with oxLDLs (200 μ g ApoB/ml) for 16 h. Relative mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA. The data are expressed as mean \pm S.E.M. of three separate experiments (* P < 0.05 indicates significance, comparison between OxLDL and OxLDL + EGTA). (c) Immunocytochemistry experiments show the cytoplasmic and nuclear translocation of ATF6 in HMEC-1 cells pre-incubated with or without EGTA (0.4 mmol/l) then treated with oxLDLs (200 μ g ApoB/ml) for 16 h. These data are representative of three separate experiments. (d) The phosphorylation of eIF2 α , JNK, the processing of LC3 and Beclin-1 expression was analyzed in HMEC-1 cells pre-incubated with or without EGTA (0.4 mmol/l) then treated with oxLDLs (200 μ g ApoB/ml) for 16 h. Western blot experiments were performed on total protein extracts using anti-LC3, anti-phospho-eIF2 α or anti-phospho JNK antibodies and β -actin expression was used as loading control. Blots are representative of three separate experiments

suggests that HDLs may act upstream by inhibiting a signaling pathway common to apoptosis and autophagy. We, therefore, hypothesized that Ca²⁺ signaling may constitute this critical trigger, as Ca²⁺ deregulation is involved in apoptosis⁶ and ER stress⁹ induced by oxLDLs, and is also implicated in autophagy.^{14,38} The reported data show, for the first time, that HDLs completely blocked ER stress and autophagy induced by oxLDLs by preventing the cytosolic Ca²⁺ rise. The crucial role of this common Ca²⁺ signaling pathway is supported by the effect of Ca²⁺ chelator EGTA that also prevents the Ca²⁺ rise, ER stress and autophagy. Our results are in agreement with the role of Ca²⁺ deregulation as ER stress inducer, with consequences in apoptosis.³⁹ Moreover, recent studies highlight the role of Ca²⁺ as a potent inducer of autophagy, which is triggered by Ca²⁺ mobilizing stimuli such as ATP, thapsigargin and ionomycin that activate the Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase-kinase and consequently inhibit mTOR.^{14,31}

The upstream mechanisms and potential targets of HDLs involved in Ca²⁺ deregulation are still unknown. However, the antioxidant properties of HDLs that inhibit intracellular oxidative stress mediated by oxLDLs,²⁰ could explain their protective effect, as oxidative stress is a well-known inducer of ER stress and calcium deregulation.^{9,39}

In conclusion, our data show a potent implication of ER stress and CHOP in apoptosis mediated by oxLDLs in vascular cells, resulting from the deregulation of cytosolic Ca²⁺. These results also point out that the oxLDLs-induced ER stress is associated to autophagy activation, which is not involved in oxLDLs-mediated cell death machinery, but may contribute to PS exposure and subsequent phagocytosis of oxLDLs exposed cells. Our *in vitro* data suggest that HDLs by blocking the Ca²⁺ deregulation, and consequently both ER stress and autophagy, may reduce the level of ER stress and autophagy markers that are detected in early and advanced atherosclerotic lesions.^{9,15,34,40}

Materials and Methods

Reagents. Anti-phospho-eIF2 α , anti-LC3, anti-beclin 1 and phospho-JNK were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA), anti-phospho-IRE1 α were from Affinity BioReagents (Golden, CO, USA), anti-caspase 12 is from Acris Antibodies GmbH (Hiddenhausen, DE, USA) and anti- β -actin from Sigma-Aldrich (Lyon, France). Secondary antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-Bio, Le-Perray-en-Yvelines, France). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was from Euromedex (Souffelweyersheim, France). 3-methyladenine (3-MA) was from Sigma-Aldrich. SYTO-13, propidium iodide (PI) and fluo-3 AM were from Molecular Probes (Invitrogen, San Diego, CA, USA).

Cell culture. Human microvascular endothelial cells (HMECs-1), obtained from CDC (Atlanta, GA, USA), were grown in MCDB-131 culture medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. The U-937 human macrophage cell line obtained from ATCC (LGC Standards S.a.r.l., Molsheim, France), was grown in RPMI-1640 culture medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. CRL-2181 (mouse endothelial cell line), obtained from ATCC, was grown in DMEM culture medium supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from CHOP^{-/-} animals and wild-type MEFs were a generous gift from David Ron (New York University Medical Center, NY, USA). MEFs CHOP^{-/-} and wild type were grown in DMEM culture medium supplemented with 10% fetal calf serum, as described.²² Cells were starved in serum-free medium for 24 h before LDL treatment.

Lipoproteins (LDLs and HDLs) isolation and LDLs oxidation. LDLs and HDLs from human pooled sera were prepared by ultracentrifugation, dialyzed against PBS containing 100 μ M EDTA. LDLs were mildly oxidized by UV-C + copper/EDTA (5 μ M) (oxLDLs) as previously reported.²³ OxLDLs contained 4.2–7.4 nmoles of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)/ μ g ApoB. Relative electrophoretic mobility (REM) and 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) reactive amino groups were 1.2–1.3 times and 85–92% of native LDLs, respectively.

siRNA knockdown of CHOP. CHOP siRNA were from Dharmacon (Surrey, UK) (ON-TARGET plus SMART POOL L-004819-00) (Dharmacon). siRNAs were transfected using the Hiperfect reagent (Quiagen, Courtabouef, France) according to the manufacturer's recommendations.

Evaluation of cytotoxicity, necrosis and apoptosis. For cytotoxicity experiments, cells were serum starved for 24 h and stimulated for the indicated times at 37°C. Cytotoxicity was evaluated using the MTT test, as previously used.⁸ This method is based on MTT reduction by the respiratory chain and other electron transport systems leading to form non-water-soluble violet formazan crystals that can be determined spectrophotometrically (OD measured at 570 nm) and serves as an estimate for the metabolic activity of living cells. Apoptotic and necrotic cells were counted after fluorescent staining by two fluorescent dyes, the permeant DNA intercalating green fluorescent probe SYTO-13 (0.6 μ M) and the non-permeant DNA intercalating red fluorescent probe PI (15 μ M) using an inverted fluorescence microscope (Fluovert FU, Leitz, Leica, Wetzlar, Germany).⁶ Normal nuclei exhibit a loose green-colored chromatin. Nuclei of primary necrotic cells exhibit loose red-colored chromatin. Apoptotic nuclei exhibited condensed yellow/green-colored chromatin associated with nucleus fragmentation, whereas post-apoptotic necrotic cells exhibited the same morphological features, but were red colored.

Annexin V/PI double staining and FACS analysis. Flow cytometry experiments after annexin V-FITC labeling were performed to evaluate PS externalization, an early event of apoptosis. After specific treatment, HMEC-1 was collected, re-suspended and stained with annexin V-FITC/PI (human annexin V-FITC kit, AbCys SA, Paris, France) according to the manufacturer's instructions. Cells were analyzed on a FACScan (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) flowcytometer using 488-nm excitation and a 515-nm band-pass filter for fluorescein detection and a filter > 600 nm for PI detection. Data analysis was performed with Cell Quest software (Becton Dickinson Co., Mountain View, CA, USA). After appropriate markings for negative and positive populations, the percentage of annexin V⁺/PI⁻ and annexin V⁺/PI⁺ cells was determined and compared with untreated controls.

Phagocytosis analysis. HMEC-1 cells transfected with siRNA scramble or with siRNA beclin-1 were dyed red using PKH26, and U-937 cells were dyed green

using PKH67, according to the manufacturer's instructions of the PKH26-GL/PKH67-GL kit (Sigma-Aldrich). Labeled HMEC-1 cells were treated with oxidized LDL for 24 h to undergo apoptotic cell. PKH26-labelled HMEC-1 cells were carefully removed and washed with PBS, and overlaid on PKH67-labelled U-937 cells. Cocultured cells were harvested at 8 h by treatment with 0.02% trypsin EDTA. Detached cells were collected, washed with PBS and labeled cells were analyzed on a FACScan (BD Biosciences) flow cytometer using 488-nm blue laser for PKH67 and 532-nm green laser for PKH26. The negative control sample was prepared using red HMEC-1 and green U-937 cells that had been cultured separately and mixed before FACS analysis. The PKH67 and PKH26 double population was defined as U-937 cells containing phagocytosed HMEC-1 cells.

Western blot analysis. After stimulation of HMEC-1 under the conditions indicated in the text, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 mM orthovanadate and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Cells were lysed in solubilizing buffer (10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium pyrophosphate, 5 mM sodium fluoride, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/ml leupeptin and 1 μ g/ml aprotinin) for 30 min on ice. In total, 40 μ g of protein cell extracts was resolved by SDS-PAGE and transferred onto PVDF membranes (Millipore, Molsheim, France). Then membranes were probed with the indicated primary antibodies and revealed with the secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase using the ECL chemoluminescence kit. Membranes were then stripped and re-probed with anti- β -actin antibody to control equal loading of proteins.

Real-time PCR. Cells were trypsinized and washed in PBS, then diluted in SV RNA lysis buffer (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Total extract was purified with SV Total isolation system (Promega) and 1 μ g of total RNA was used for reverse transcription (high capacity cDNA reverse transcription kit Applied Biosystems, Courtabouef, France).

Real-time quantitative PCR analysis, used to evaluate mRNA levels of CHOP, spliced XBP1 and GAPDH, utilized the above cited primers, CHOP forward 5'-CAGATGAAAATGGGGTACCT-3', reverse 5'-AGAAGCAGGGTCAAGAGTG GT-3', spliced XBP1 forward 5'-GCAGGTGCAGGCCAGT-3', reverse 5'-GAATG CCCAACAGGATATCAGACT-3', GAPDH forward 5'-CCTCCCGTTCGCTCTC T-3', reverse 5'-GCTGGCGACGCAAAGA-3'. The Fast SYBR Green MasterMix (Applied Biosystems) and the StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) were used to detect the real-time quantitative PCR products of reverse-transcribed cDNA samples according to the manufacturer's instructions. The following incubation conditions were followed: 95°C for 20 s, followed by 40 cycles of 3 s at 95°C, annealing/extension for 30 s, at 60°C. For each sample, PCR was done in duplicate for both the target genes and GAPDH control. The data were analyzed using StepOne Software v2.0.

Measurement of intracellular Ca²⁺. Cytosolic Ca²⁺ was determined using fluo3/AM according to Jagnadan *et al*.²⁴ Briefly, cells were incubated with a loading solution consisting of HEPES-buffered saline (HBS; 135 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 11.6 mM HEPES and 11.5 mM glucose, pH 7.3) supplemented with 5 μ M fluo-3/AM, 0.02% pluronic F-127 and 1 mg/ml bovine serum albumin for 30 min and then incubated in the loading solution without fluo-3 for 30 min to allow de-esterification of the probe. Loading solution was then replaced with HBS, and cells were placed in a fluorometer and fluorescence was recorded (495 and 525 nm excitation and emission wavelengths respectively). Results were normalized on protein levels and expressed in ratio of control.

Immunofluorescence. Cells grown on cover glass slides were washed with PBS and fixed in PBS/4% paraformaldehyde for 10 min. After blocking with PBS containing 3% BSA for 30 min, cells were incubated with the indicated antibodies for 1 h and revealed with Alexa Fluor-conjugated secondary antibody for 1 h. The slides were visualized using a Zeiss LSM 510 fluorescence confocal microscope (Zeiss, Le Pecq, France).

May-Grunwald-Giemsa staining. May-Grunwald-Giemsa staining (Merck, Fontenay Sous Bois, France) of methanol-fixed preparations was examined to identify the apoptotic cells on the basis of the following morphological criteria: nuclear shrinkage and chromatin condensation, cytoplasmic membrane blebbing, reduction of cell volume and formation of apoptotic bodies.

Statistical analysis. Data are given as mean \pm S.E.M. Statistical comparison of the data was performed using the *t*-test for comparison between two groups and is explained in the figure legends (Sigma stat software). Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Toulouse-3, la 'Fondation Cœur et Artères' no FCA06T6, et la Fondation pour la Recherche Médicale, no DCV2007040927. CM is a recipient of a 'Fondation pour la Recherche Médicale' fellowship. We acknowledge JC Thiers and G Bernis for their excellent technical assistance. We are grateful to Prof. D Ron for providing MEFs CHOP^{-/-} and wild-type cells and Dr. V Gallet (SNCF Laboratory, Toulouse) for providing human serum.

- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; **407**: 233–241.
- Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 2003; **1010**: 698–709.
- Salvyre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvyre A. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1585**: 213–221.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; **320**: 915–924.
- Escargueil-Blanc I, Salvyre R, Negre-Salvyre A. Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *Faseb J* 1994; **8**: 1075–1080.
- Vindis C, Elbaz M, Escargueil-Blanc I, Auge N, Heniquez A, Thiers JC *et al*. Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 639–645.
- Ingueneau C, Huynh-Do U, Marcheix B, Athias A, Gambert P, Negre-Salvyre A *et al*. TRPC1 is regulated by caveolin-1 and is involved in oxidized LDL-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *J Cell Mol Med* 2008; **14**: 14.
- Robbesyn F, Auge N, Vindis C, Cantero AV, Barbaras R, Negre-Salvyre A *et al*. High-density lipoproteins prevent the oxidized low-density lipoprotein-induced epidermal [corrected] growth factor receptor activation and subsequent matrix metalloproteinase-2 upregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 1206–1212.
- Sanson M, Auge N, Vindis C, Muller C, Bando Y, Thiers JC *et al*. Oxidized Low-Density Lipoproteins Trigger Endoplasmic Reticulum Stress in Vascular Cells Prevention by Oxygen-Regulated Protein 150 Expression. *Circ Res* 2009; **104**: 328–336.
- Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 381–389.
- Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. *Cell Death Differ* 2006; **13**: 363–373.
- Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 2005; **12** (Suppl 2): 1542–1552.
- Li J, Ni M, Lee B, Barron E, Hinton DR, Lee AS. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ* 2008; **15**: 1460–1471.
- Hoyer-Hansen M, Bashholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T *et al*. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell* 2007; **25**: 193–205.
- Martinet W, De Meyer GR. Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential. *Circ Res* 2009; **104**: 304–317.
- Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**: 741–752.
- Assmann G, Nofer JR. Atheroprotective effects of high-density lipoproteins. *Annu Rev Med* 2003; **54**: 321–341.
- Negre-Salvyre A, Dousset N, Ferretti G, Bacchetti T, Curatola G, Salvyre R. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic Biol Med* 2006; **41**: 1031–1040.
- Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006; **98**: 1352–1364.
- Robbesyn F, Garcia V, Auge N, Vieira O, Frisach MF, Salvyre R *et al*. HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells. *FASEB J* 2003; **17**: 743–745.
- Gharavi NM, Gargalovic PS, Chang I, Araujo JA, Clark MJ, Szeto WL *et al*. High-density lipoprotein modulates oxidized phospholipid signaling in human endothelial cells from proinflammatory to anti-inflammatory. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; **27**: 1346–1353.
- Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H *et al*. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 1998; **12**: 982–995.
- Vindis C, Escargueil-Blanc I, Elbaz M, Marcheix B, Grazide MH, Uchida K *et al*. Desensitization of platelet-derived growth factor receptor-beta by oxidized lipids in vascular cells and atherosclerotic lesions: prevention by aldehyde scavengers. *Circ Res* 2006; **98**: 785–792.
- Jagnandan D, Church JE, Banfi B, Stuehr DJ, Marrero MB, Fulton DJ. Novel mechanism of activation of NADPH oxidase 5. calcium sensitization via phosphorylation. *J Biol Chem* 2007; **282**: 6494–6507.
- Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 2002; **7**: 335–345.
- Martinet W, De Bie M, Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM. 7-ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; **24**: 2296–2301.
- Nowicki M, Zabirnyk O, Duerschmidt N, Borlak J, Spanel-Borowski K. No upregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in serum-deprived EA.hy926 endothelial cells under oxLDL exposure, but increase in autophagy. *Eur J Cell Biol* 2007; **86**: 605–616.
- Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007; **9**: 1102–1109.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H *et al*. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; **402**: 672–676.
- Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN *et al*. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 2007; **128**: 931–946.
- Uhl M, Kepp O, Jusforgues-Saklani H, Vicencio JM, Kroemer G, Albert ML. Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8+ T cells. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 991–1005.
- Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R *et al*. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 2004; **18**: 3066–3077.
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 1249–1259.
- Thorp E, Li G, Seimon TA, Kuriakose G, Ron D, Tabas I. Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} mice lacking CHOP. *Cell Metab* 2009; **9**: 474–481.
- Kruse KB, Brodsky JL, McCracken AA. Autophagy: an ER protein quality control process. *Autophagy* 2006; **2**: 135–137.
- Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* 2006; **281**: 30299–30304.
- Negre-Salvyre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R *et al*. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 2010; **44**: 1125–1171.
- Vicencio JM, Ortiz C, Criollo A, Jones AW, Kepp O, Galluzzi L *et al*. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1. *Cell Death Differ* 2009; **16**: 1006–1017.
- Orrenius S, Zhivotovskiy B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 552–565.
- Zhou J, Lhotak S, Hilditch BA, Austin RC. Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2005; **111**: 1814–1821.

2.1.3. Discussion

Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence de nouvelles propriétés anti-athérogènes des HDLs. Ces travaux montrent pour la première fois que les HDL inhibent la réponse UPR induite par les LDLox. En effet, l'activation des trois senseurs du RE : IRE1, eIF2 α (substrat de PERK) et ATF6 par les LDLox est prévenue quand les cellules HMEC-1 sont prétraitées par les HDL. L'activation de ces senseurs lors d'un stress du RE, a pour but dans un premier temps de favoriser la survie cellulaire en rétablissant le fonctionnement normal du RE et l'homéostasie cellulaire. En revanche, lorsque le stress du RE est intense ou prolongé et que la réponse UPR ne peut pas rétablir l'homéostasie cellulaire, des voies apoptotiques sont alors activées. Dans nos conditions expérimentales les LDLox induisent un stress du RE soutenu (Sanson et al., 2009), qui conduit à l'activation de voies proapoptotiques : la voie IRE1 α /JNK, l'induction du facteur de transcription CHOP et l'activation de la caspase 12.

L'inhibition des senseurs du RE par les HDL bloque l'activation des voies apoptotiques stress du RE-dépendantes. Les HDL bloquent la phosphorylation de IRE1 α , d'où une inhibition de la phosphorylation de JNK et du clivage de la caspase-12. De même, les HDL bloquent l'induction de CHOP, dont l'expression dépend des trois senseurs. CHOP est impliqué dans l'apoptose dépendante du stress du RE. En effet les HMEC-1 traitées par siRNA spécifiques de CHOP, de même que les fibroblastes issus de souris CHOP^{-/-}, sont résistants à l'apoptose induite par les LDLox. Des travaux récents montrent que CHOP favoriserait l'apoptose des cellules vasculaires et le développement du cœur nécrotique des plaques, et jouerait un rôle essentiel dans la formation des lésions d'athérosclérose (Thorp et al., 2009). Dans ces conditions, l'inhibition du stress du RE et de ses conséquences proapoptotiques, pourrait constituer un effet anti-athérogène majeur des HDL.

Pour préciser les mécanismes à l'origine des effets protecteurs des HDL, nous avons étudié l'implication de l'autophagie dans le stress du RE induit par les LDLox. Des études montrent un lien entre le stress du RE et l'induction de l'autophagie (Ogata et al., 2006). L'autophagie peut favoriser la survie au cours du stress du RE en éliminant des protéines anormales que le système ERAD ne peut pas prendre en charge (Komatsu et al., 2006). Cependant, une

autophagie excessive peut également conduire à la mort cellulaire (Eisenberg-Lerner et al., 2009).

Nous montrons que les LDLox induisent une réponse autophagique dans les HMEC-1 en accord avec d'autres études qui montrent que les lipides oxydés sont inducteurs d'autophagie (Hill et al., 2008 ; Nowicki et al., 2007). L'induction de l'autophagie par les LDLox est démontrée par l'augmentation de la forme lipidée de LC3-I : LC3-II et l'augmentation de l'expression de Beclin-1, deux marqueurs d'autophagie classiquement utilisés (Kabeya et al., 2000). Afin de déterminer si l'autophagie induite par les LDLox intervient dans la survie ou la mort cellulaire, nous avons inhibé l'expression de la Beclin-1 par des siRNA spécifiques. En effet, l'inactivation de la Beclin-1 empêche la formation de l'autophagosome et inhibe ainsi l'autophagie (Liang et al., 2008). Dans les HMEC-1, l'inhibition de l'expression de la Beclin-1 ne modifie pas l'apoptose induite par les LDLox, ce qui suggère que dans nos conditions l'autophagie n'est pas impliquée dans la mort cellulaire. Le rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire est souvent décrit dans des modèles cellulaires dans lesquels l'apoptose est bloquée (MEF Bax/Bak^{-/-} ou Z-VAD-fmk) ce qui n'est pas le cas dans notre étude. En revanche, nous montrons que l'inhibition de l'expression de la Beclin-1 entraîne une diminution de l'expression des phosphatidylsérines (PS) à la surface des HMEC-1 traitées par les LDLox. L'autophagie pourrait ainsi participer à l'exposition des PS au cours de l'apoptose. En effet, il a été montré que l'autophagie permet de maintenir un niveau d'ATP intracellulaire nécessaire à l'exposition des PS, qui est un mécanisme ATP-dépendant (Qu et al., 2007).

L'exposition des PS joue un rôle majeur dans la phagocytose des cellules apoptotiques. L'inhibition de l'autophagie aurait donc pour conséquence de diminuer la phagocytose des corps apoptotiques, via une diminution de l'exposition des PS. La mesure de la phagocytose (par une technique de cytométrie de flux) des cellules HMEC-1 invalidées pour la Beclin-1 et traitées par les LDLox, montre une diminution significative de la phagocytose comparée aux cellules contrôles. Ces résultats indiquent que l'autophagie induite par les LDLox contribue à augmenter l'exposition des PS au cours du processus apoptotique facilitant ainsi la phagocytose. Il a été montré que l'inhibition de la phagocytose des cellules apoptotiques entraîne une nécrose post-apoptotique, des réactions inflammatoires et l'accroissement du cœur nécrotique de la plaque (Tabas, 2005). La phagocytose des cellules apoptotiques aurait

donc un effet anti-athérogène. Cependant, l'exposition des PS induite par le processus autophagique pourrait avoir également des effets néfastes. En effet, l'évènement critique dans l'érosion ou la rupture de plaque est la formation du thrombus qui est responsable des manifestations graves de l'athérosclérose. Un des acteurs majeurs de l'établissement de la cascade de coagulation responsable de la formation du thrombus est le facteur tissulaire dont l'activité est largement dépendante de la présence de PS à la surface des cellules apoptotiques (Tedgui and Mallat, 2001). Ainsi en facilitant l'exposition des PS dans les cellules traitées aux LDLox, l'autophagie pourrait participer à l'activation du facteur tissulaire et à la formation du thrombus dans les plaques.

Bien que l'autophagie soit considérée comme une voie de survie, nos travaux démontrent que les HDL inhibent l'autophagie induite par les LDLox. Ces résultats suggèrent que le stress du RE et l'autophagie pourrait être activés par un mécanisme commun. Nos travaux montrent que l'influx de Ca^{2+} induit par les LDLox à l'origine de la signalisation apoptotique, participe aussi à l'induction du stress du RE et à l'autophagie. Le rôle du Ca^{2+} dans l'autophagie est actuellement peu décrit mais il apparaît comme un inducteur puissant (Hoyer-Hansen et al., 2007) et un médiateur commun possible du stress du RE. Les voies de signalisation actuellement décrites font intervenir une activation de la voie $CamKK\beta/AMPK$ suivie d'une inhibition de mTOR.

Dans nos conditions, les HDL préviennent l'influx de Ca^{2+} par les LDLox et par conséquent l'autophagie et le stress du RE. Bien que nous n'ayons pas encore mis en évidence par quels mécanismes les HDL agissent, on peut supposer que leur effet soit très en amont. Il est possible que la dérégulation calcique résulte d'un stress oxydant généré par les LDLox et donc de part leurs propriétés anti-oxydantes les HDL inhiberaient indirectement l'influx calcique.

En perspective à ce travail, nous avons commencé à étudier plus en détails les voies de signalisation dépendantes du Ca^{2+} impliquées dans l'autophagie induite par les LDLox.

2.2. Voies de signalisations impliquées dans l'autophagie induite par les LDLox : Etude de la voie AMPK-mTOR

2.2.1. Introduction

Dans la suite de ces travaux nous avons étudié plus précisément les voies de signalisation impliquées dans l'activation de la réponse autophagique par les LDLox. Nous avons montré que ce processus est dépendant de l'augmentation de Ca^{2+} cytosolique induite par les LDLox puisque la chélation du Ca^{2+} extracellulaire par l'EGTA prévient l'augmentation de LC3-II et de Beclin-1.

L'activité et/ou l'expression des protéines Atg de l'autophagie peut être inhibée par le complexe protéique mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) constitué de la sérine thréonine kinase mTOR (mammalian target of rapamycin), de la protéine régulatrice de mTOR (raptor) et de mLST8 (lethal with sec thirteen). Il a été décrit que l'inhibition de mTORC1 est suffisante pour l'induction de l'autophagie, ce qui indique que mTORC1 joue un rôle majeur dans le contrôle de l'activation de l'autophagie en l'absence de stress cellulaire (Ravikumar et al., 2010). Dans des conditions de privation en nutriments l'activité de mTORC1 est supprimée par une voie impliquant la protéine AMPK (AMP-activated protein kinase), ce qui a pour conséquence d'activer l'autophagie afin de produire l'énergie suffisante à la cellule pour survivre. Récemment il a été montré qu'une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique par différents agents tels que la thapsigargine, la forme active de la vitamine D, l'ATP ou bien la ionomycine induisent une réponse autophagique dépendante du Ca^{2+} . Les travaux de Hoyer-Hansen (Hoyer-Hansen et al., 2007) ont mis en évidence l'activation d'une voie de signalisation dépendante du Ca^{2+} qui fait intervenir en amont la protéine CaMKK- β (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase- β) qui va activer la protéine AMPK qui à son tour va inhiber mTOR et ainsi conduire à l'autophagie. L'activation de cette voie de signalisation CaMKK- β /AMPK/mTOR par les LDLox n'a à ce jour jamais été étudiée, toutefois des travaux du laboratoire (Brito et al., 2009), ont montré que les LDLox en conditions mitogènes pouvaient stimuler la prolifération des CML vasculaires par la voie PI3K/Akt/mTOR.

Nous avons donc analysé dans un premier temps l'effet des LDLox sur la phosphorylation de l'AMPK, de mTOR et de sa cible la kinase p70S6K1. Nous avons ensuite regardé l'effet de l'inhibition de la CaMKK- β sur l'augmentation de LC3-II.

2.2.2. Résultats

Les cellules HMEC-1 sont stimulées par les LDLox à différents temps et les cinétiques de phosphorylation des protéines AMPK α , mTOR et p70S6K1 sont analysées par western-blot à l'aide d'anticorps spécifiques de chaque protéine. Comme on peut le voir sur la figure 1, les LDLox induisent dans un premier temps, à 5 heures, une phosphorylation de la protéine AMPK sur le résidu thréonine 172 qui ensuite disparaît à 8 et 16 heures de stimulation. Aux mêmes temps, nous observons une diminution de la phosphorylation sur le résidu ser2448 de mTOR et une diminution de la phosphorylation sur résidu thréonine 389 de son substrat la protéine p70S6K1. Ces premiers résultats suggèrent fortement que dans nos conditions expérimentales les LDLox à des concentrations toxiques activent la protéine AMPK qui va ensuite inhiber mTOR et donc induire l'autophagie.

Nous avons voulu par la suite vérifier l'implication de la protéine CaMKK- β dans cette voie de signalisation puisque nous avons montré que l'augmentation de Ca²⁺ cytosolique participait à l'activation du processus autophagique. Les cellules HMEC-1 ont été prétraitées avec un inhibiteur pharmacologique classique des protéines CaMKK : le STO-609, puis stimulées avec les LDLox. L'augmentation de la forme LC3-II induite par les LDLox est inhibée par le prétraitement au STO-609 (Figure 2A), ce qui confirme l'implication d'une protéine CaMKK dans le processus autophagique. Par ailleurs on peut noter que l'augmentation de LC3-II induite par la thapsigargine un inducteur d'autophagie et du stress du RE dépendant du Ca²⁺ est aussi réversée par le STO-609, ce qui confirme bien l'existence d'une voie de signalisation dépendante du Ca²⁺ qui conduit à l'autophagie.

L'implication de l'isoforme β de la CaMKK a été confirmée par l'utilisation de siRNA spécifiques pour éteindre son expression. Les cellules HMEC-1 ont été transfectées avec les siRNA CaMKK- β ou avec des siRNA contrôles (scramble) pendant 24 et 48 heures. Comme

nous pouvons le voir sur la figure 2B, on observe une extinction de l'ARN messager de la CaMKK- β dès 24 heures de traitement par les siRNA CaMKK- β mesurée par RT-PCR, qui se prolonge à 48 heures. Nous avons aussi confirmé que les siRNA contrôles n'ont pas d'effet sur l'expression de la CaMKK- β . Après avoir validé l'utilisation des siRNA CaMKK- β dans notre modèle cellulaire, nous avons transfecté les cellules HMEC-1 avec les siRNA CaMKK- β ou les siRNA contrôles puis nous avons stimulé les cellules avec les LDLox. L'analyse de l'augmentation de la forme LC3-II montre que les siRNA CaMKK- β préviennent de l'induction de LC3-II par les LDLox en comparaison des siRNA contrôles (Figure 2C). Ces résultats préliminaires nous permettent de confirmer l'implication de la voie de signalisation Ca²⁺/CaMKK- β /AMPK/mTOR dans l'induction du processus autophagique par les LDLox.

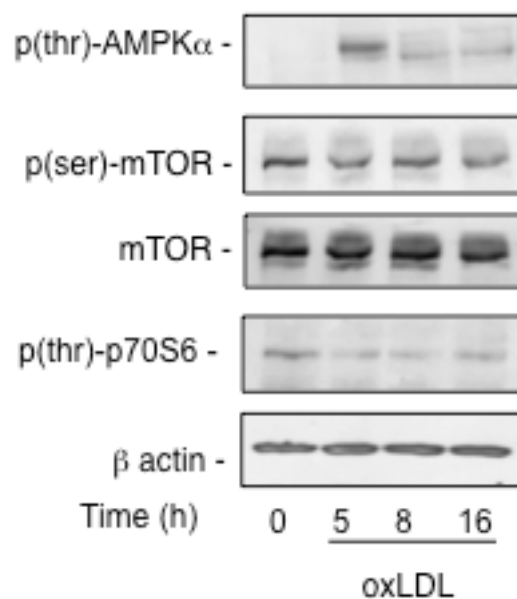


Figure 1. Effets des LDLox sur la phosphorylation de AMPK, mTOR et p70S6kinase.

Les HMEC-1 sont traitées par les LDLox (200 μ g apoB/mL) pendant les temps indiqués. La phosphorylation de AMPK (thr172), la phosphorylation de mTOR (ser2448) et la phosphorylation de p70S6kinase (thr389) sont étudiées par Western-Blot. La β -actine sert de contrôle de dépôt de la quantité de protéines.

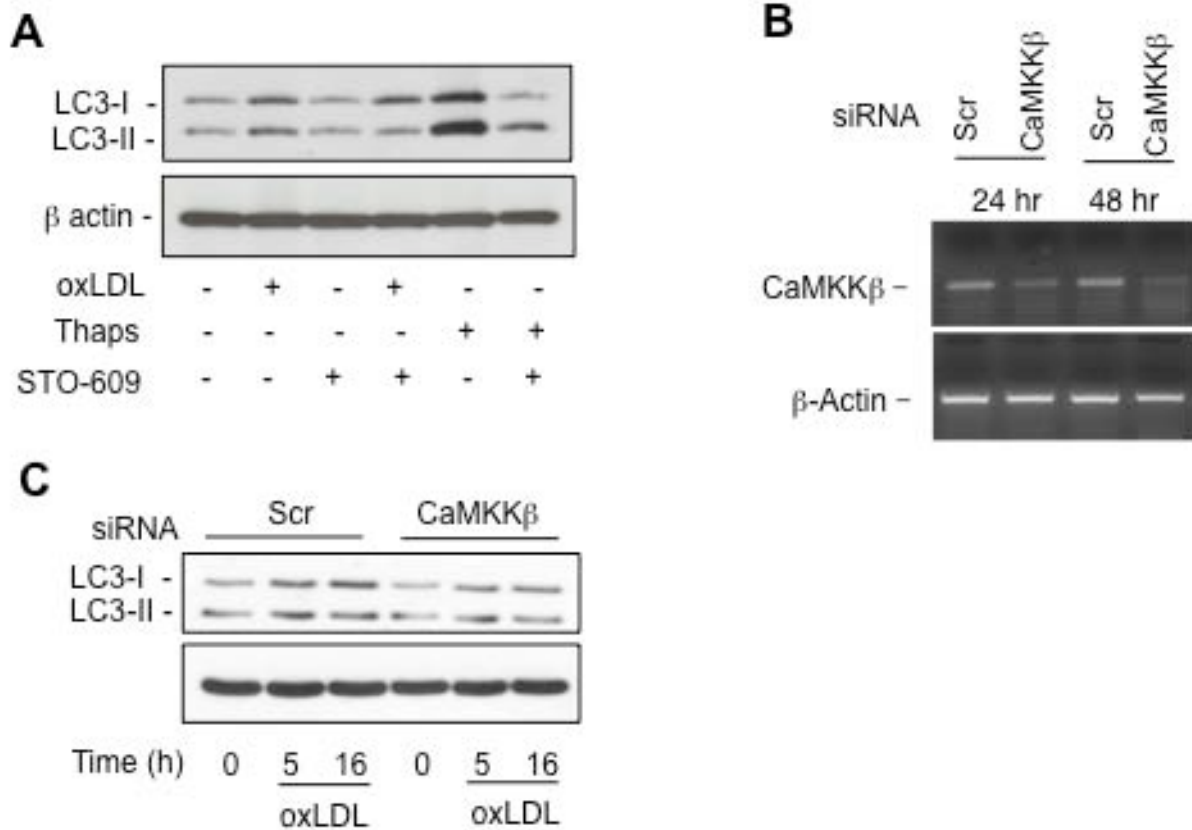


Figure 2. L'induction de l'autophagie dépendante du Ca^{2+} par les LDLox dépend de CaMKK- β .

A/ Les HMEC-1 sont traitées avec les LDLox (200 μg apoB /mL) ou la thapsigargine (1 μM) pendant 16h ou prétraitées 1h avec l'inhibiteur de CaMKK- β , STO-609, à 30 μM . L'induction de LC3-II est vérifiée par Western-Blot. La β -actine sert de contrôle de dépôt de la quantité de protéines.

B/Les HMEC-1 sont traitées avec des siRNA-scramble ou des siRNA-CaMKK- β (100mM) pendant 24h et 48 h. L'expression de l'ARNm de CaMKK- β est contrôlée par RT-PCR.

C/ Les HMEC-1 traitées par les siRNA-scramble ou siRNA-CaMKK- β (100mM) pendant 48h sont traitées par les LDLox (200 μg apoB /mL). L'induction de LC3-II est vérifiée par Western-Blot. La β -actine sert de contrôle de dépôt de la quantité de protéines.

2.2.3. Discussion

La modification de l'homéostasie calcique par les LDLox est à l'origine de l'activation de l'apoptose mais aussi de deux processus de réponse au stress cellulaire : l'autophagie et le stress du RE. Toutefois, une question essentielle se pose quant aux mécanismes et aux molécules qui sont impliqués dans la dérégulation de l'homéostasie calcique. Nos résultats montrent que l'EGTA prévient l'activation du stress du RE et l'autophagie (Muller et al., 2011) ainsi que de l'apoptose (Vindis et al., 2005), ce qui laisse supposer que l'influx de Ca^{2+} extracellulaire, précédemment décrit dans le laboratoire est aussi un activateur de ces processus. Toutefois, des travaux du laboratoire sur les cellules HMEC-1 ont montré que les LDLox induisent des oscillations calciques du RE (Sanson et al., 2008) qui pourraient participer à l'influx de Ca^{2+} extracellulaire impliqué dans la signalisation apoptotique mitochondriale. Par ailleurs, la surexpression de la chaperonne du RE ORP150, qui a des propriétés « chélatrices » du Ca^{2+} , inhibe l'activation des senseurs du stress du RE (Sanson et al., 2009). Il serait donc intéressant dans la suite de ce travail de déterminer dans nos conditions expérimentales, si ces oscillations calciques du RE sont suffisantes pour activer l'autophagie et le stress du RE.

Nos travaux mettent aussi en évidence pour la première fois l'activation de la voie CaMKK- β /AMPK/mTOR par les LDLox dans les cellules HMEC. Actuellement plusieurs voies de signalisation dépendante du Ca^{2+} sont décrites dans l'autophagie, dont certaines protéines sont à l'interface avec des voies de signalisation de l'apoptose. Nos résultats sont en accord avec la littérature qui montre que des inducteurs de Ca^{2+} activent l'autophagie via la CaMKK- β et l'AMPK suivie d'une inhibition de mTOR (Hoyer-Hansen et al., 2007). Toutefois des travaux récents montrent qu'il existe une voie d'induction de l'autophagie par le Ca^{2+} indépendante de l'AMPK (Groteimer et al, 2010). L'utilisation de fibroblastes embryonnaires invalidés pour les protéines AMPK- $\alpha 1$ et - $\alpha 2$ (AMPK- $\alpha 1$ -/- $\alpha 2$ -/-) met en évidence une induction de l'autophagie par la thapsigargine en l'absence d'AMPK. Nous envisageons de regarder dans ces fibroblastes, que nous avons pu obtenir en collaboration avec B. Viollet (Inserm U567, Paris), de regarder l'induction de l'autophagie par les LDLox afin d'évaluer l'importance de l'AMPK.

D'autres voies ont été décrites, ainsi une augmentation cytosolique du Ca^{2+} peut aussi activer des enzymes dépendantes du Ca^{2+} : des protéases les calpaïnes et les DAPK (death associated protein kinases), qui ont été récemment associées à la régulation de l'autophagie (Bialik and Kimchi, 2010). Sachant que la signalisation apoptotique mitochondriale induite par les LDLox fait intervenir les calpaïnes, il serait intéressant de vérifier si leur inhibition joue un rôle dans l'autophagie.

2.3. Rôle de la chaperonne Protéine Disulfide Isomérase dans le stress du RE et l'apoptose induits par les LDLox.

2.3.1. Introduction

La troisième partie de mon travail de thèse a été axée sur l'étude du rôle de la protéine disulfide isomérase (PDI) contre l'apoptose induite par les LDLox.

Les propriétés anti-apoptotiques des protéines chaperones du RE sont connues et plus particulièrement Bip (GRP78), ORP150, et PDI. Bip et ORP150 joueraient un rôle protecteur au niveau du Ca^{2+} du RE, et bloqueraient les mouvements calciques et la signalisation Ca^{2+} -dépendante qui pourrait jouer un rôle dans l'apoptose. De plus, ces chaperones modulent l'activation du stress du RE et la réponse UPR (Sanson et al., 2008). Nous avons récemment rapporté que ORP150, est induite par les LDLox et contribue à protéger contre l'apoptose (Sanson et al, 2009, annexe I). Les cellules rendues "KO" pour ORP150 par traitement avec des siRNA, sont beaucoup plus sensibles aux LDLox, alors que la surexpression de ORP150 par transfection, rend les cellules résistantes à l'apoptose (Sanson et al, 2009, annexe I). Comme Bip, ORP150 maintiendrait inactifs les senseurs du RE, et donc inhiberait l'induction du stress du RE.

PDI est également exprimée dans le RE, mais présente des propriétés différentes des autres chaperones. PDI appartient à la famille des thioredoxines et présente une structure caractéristique avec deux sites actifs aux extrémités N- et C-terminales, avec deux domaines de type thioredoxine riches en cystéine qui conditionnent son potentiel redox (Hatahet and Ruddock, 2009 ; Riemer et al., 2009 ; Uehara et al., 2006). PDI catalyse et régénère la formation des ponts disulfure sur les protéines néosynthétisées par la cellule. Différentes isoformes de PDI sont décrites, dont une isoforme qui serait exprimée à la membrane plasmique, et inhiberait l'apoptose en modulant l'expression des phosphatidylsérines sur la membrane externe, alors que la forme exprimée dans le RE serait impliquée dans la régénération des ponts disulfure. Cependant le rôle exact des isoformes de PDI n'est pas clarifié (Na et al., 2007).

Le rôle de PDI dans l'athérosclérose n'est pas connu. Cependant plusieurs études suggèrent un rôle pour PDI dans le développement des plaques. En effet PDI modulerait le stress oxydant en régulant l'expression de la NAD(P)H oxydase dans les cellules vasculaires

(Lassegue and Griending, 2010). Par ailleurs les propriétés antiapoptotiques de PDI pourraient contribuer à stabiliser les lésions. Cependant plusieurs études montrent que PDI peut être inactivée lors du stress oxydant, par oxydation et surtout modification par S-nitrosylation des cystéines présentes dans les deux sites actif. Cette inactivation de PDI participerait à l'apoptose des neurones (Nakamura and Lipton, 2008 ; Uehara et al., 2006).

L'hypothèse de notre étude est que PDI, de par ses propriétés antiapoptotiques, pourrait (comme ORP150), protéger les cellules vasculaires et les macrophages contre l'apoptose induite par les LDLox. Nous avons étudié le rôle de PDI dans la mort cellulaire induite par les LDLox, et les conséquences de son inhibition sur le stress du RE et l'apoptose, ainsi que son expression dans les plaques d'athérosclérose.

2.3.2. Muller, C., Bandemer, J., Vindis, C., Dagnon, L., Mutus, B., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A.

4-hydroxynonenal-adduct formation on protein disulfide isomerase impairs its enzymatic activity and contributes to oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis.

4-hydroxynonenal-adduct formation on protein disulfide isomerase impairs its enzymatic activity and contributes to oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis

First author's surname

Muller Carole

Running title

Protein disulfide isomerase and oxidized LDL

Muller C (MSc)^{1,2}, Bandemer J (PhD)¹, Vindis C (PhD)^{1,2}, Dagnon L^{1,2} (MSc), Mutus B (PhD)³, Salvayre R (MD, PhD)^{1,2}, Negre-Salvayre A (PhD)^{1,2}

¹ Inserm U-858, Team "Atherosclerosis", Toulouse, France., ² Université Toulouse-3 Paul Sabatier, Toulouse, France, ³ Dpt of Chemistry & Biochemistry, University of Windsor, Ontario, Canada

Corresponding author: Dr. Anne Negre-Salvayre

Mailing Address : INSERM U858 and Biochemistry Laboratory - CHU Rangueil

1, avenue Jean Poulhès – BP84225 - 31432 Toulouse Cedex 4 - France.

Tel. (33) 561-32-20-59 - **Fax** (33) 561-32-29-53

e-mail: Anne.Negre-Salvayre@inserm.fr

Key-words

Protein disulfide isomerase, oxidized LDL, 4-hydroxynonenal, adducts, ER stress, apoptosis

Abstract

Rationale: The protein disulfide isomerase (PDI), is an endoplasmic reticulum (ER)-associated chaperon protein, that participates to the maturation of neosynthesized proteins by correcting disulfide bonds. PDI could modulate oxidative stress and apoptosis, but its involvement in atherosclerosis is not known. *Objective:* The aim of this work was to investigate the role of PDI in ER stress and apoptosis elicited by oxidized LDLs (oxLDLs).

Methods and results: Toxic proapoptotic concentrations of oxLDLs exerted an inhibitory effect on PDI activity in human microvascular endothelial cells (HMEC-1) and in macrophagic U937 cells, together with an increased expression of proapoptotic ER stress markers (CHOP and spliced XBP1mRNAs). PDI inhibition by bacitracine or by transfection of a vector coding for a mutant inactive form, increased the expression of ER stress markers and promoted apoptosis at non-toxic oxLDL concentrations, in both cell types, suggesting a protective function for this chaperon against oxLDL-induced toxicity. The inhibitory effect of oxLDLs partly resulted from an accumulation of 4-hydroxynonenal (4-HNE)-adducts on PDI. The antioxidant N-acetyl cysteine (NAC) neutralized 4-HNE adduct formation, restored PDI enzyme activity, and inhibited oxLDL-induced apoptosis. 4-HNE adducts on PDI were detected in macrophages in human advanced atherosclerotic lesions.

Conclusion: 4-HNE present in oxLDLs forms adducts on PDI, which alters its enzymatic activity, and contributes to oxLDL-induced ER stress and apoptosis. The *in vivo* modification of PDI in atherosclerotic lesions suggests a loss of function for this major chaperon protein in the vascular wall, possibly contributing to plaque instability.

Non-standard Abbreviations and Acronyms

PDI, Protein disulfide isomerase; 4-HNE, 4-hydroxynonenal; oxLDLs, oxidized LDL; ER stress, endoplasmic reticulum stress ; NAC, N-acetyl cysteine

Introduction

The protein disulfide isomerase (PDI) is an endoplasmic reticulum (ER)-associated chaperone, member of the thioredoxin family, and present in the ER lumen, in the cytosol and at the cell surface (Riemer et al, 2009). PDI is a multifunctional protein which catalyzes the formation of disulfide bonds on newly formed proteins (Riemer et al, 2009; Hatahet and Ruddock, 2009). It is characterized by the presence of two cysteine-rich thioredoxin-like catalytic domains present at the N- and C-terminal moiety (Uehara et al, 2006), which determines its redox potential (Na et al, 2007). PDI has an antiapoptotic role that may differ as function of its intracellular localization, though the precise function of the ER, cytosolic or cell-surface associated isoforms is still unclear.(Na et al, 2007). PDI attenuates neuronal cell death resulting from ER stress induction, but it is a target of s-nitrosylation which abrogates its protective properties, thereby implicating PDI in the neurodegenerescence process (Uehara et al, 2007; Nakamura and Lipton, 2008). PDI regulates the expression and function of NADPH oxidases, and could modulate oxidative stress (Lassègue and Griendling, 2010), but its involvement in atherosclerosis is not known.

Oxidized LDL (oxLDLs) play a key-role in the generation of early atherosclerotic lesions, from their implication in the formation of foam cells and the accumulation of fatty streaks (Berliner and Heinecke, 1996; Steinberg 1997; Jessup et al, 2004; Rader and Puré 2005). Besides, oxLDLs display a huge variety of cellular responses, including oxidative stress, inflammation, cell migration, proliferation and apoptosis, which participate to the evolution of early lesions towards more advanced stades, stable-to-vulnerable plaque transition steps, and finally plaque rupture and atherothrombosis (Napoli 2003; Libby et al, 2002; Holvoet and Collen 1994). OxLDLs modulate the expression and activation of survival/antiapoptotic pathways, such as ER stress, the ubiquitin/proteasome system or the Pi3K/Akt pathway, which tend to limit or abrogate the cytotoxic events mediated by oxLDLs, but are

progressively inhibited after prolonged contact with toxic oxLDL concentrations, this resulting in apoptosis (Vieira et al, 2000, Auge et al, 2002, Sanson et al, 2008). We recently reported that apoptosis mediated by oxLDLs involves a prolonged induction of the endoplasmic reticulum stress (ER stress) and of the subsequent unfolded protein response (UPR), characterized by a persistent phosphorylation of the ER stress sensor IRE1 α involved in the c-Jun N-terminal kinase pathway, and an increased expression of the ER stress markers XBP1 (spliced form) and the proapoptotic factor CHOP (Sanson et al, 2009). CHOP is involved in ER stress-induced apoptosis (Zinszner et al 1998; Song et al, 2008). Its deletion in mice results in a decrease in necrotic area and in a reduction of the atherosclerotic lesion extent, thereby suggesting that prolonged ER stress induction within the vascular wall is proatherogenic and proapoptotic (Thorp et al, Cell Met. 2009; Tabas 2010). ER stress is present in advanced and ruptured atherosclerotic lesions in humans, where it colocalizes with lipid oxidation products such as 4-hydroxynonenal (4-HNE) and 7-ketocholesterol (Myoishi et al, 2007; Sanson et al, 2009). Lipid oxidation products accumulation (Sanson et al, 2009), PDI modification (Uehara et al, 2006; Townsend et al 2009) and proteasome inhibition (Fu et al, 2008), are strong triggers of prolonged ER stress activation and ER stress-induced apoptosis (Wu and Kaufman 2006; Ron D, Walter P 2007).

The aim of this study was to investigate whether PDI plays a role in oxLDL-induced ER stress and apoptosis in vascular cells.

Methods

Chemicals and Reagents

Anti-PDI, anti-PH4B and anti C-Myc antibodies were from IBL (Gunma, Japan). Anti- β -actin was from Sigma-Aldrich, anti-4-HNE monoclonal antibody was from Oxys Int (Foster City,

CA). Acrylamide-4X/bisacrylamide-2X solution, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) were from Euromedex (Souffelweyersheim, FR). 4-hydroxynonenal was from Calbiochem (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ. N-acetyl L-cysteine (NAC), and other reagents were from Sigma-Aldrich.

LDL isolation and oxidation

LDL from human pooled sera were prepared and oxidized as previously reported (Sanson et al, 2008). Mildly oxidized LDL (oxLDL) used here contained 71-104 nmol lipid hydroperoxide/mg apoB and 6.4-9.7 nmol TBARS/mg apoB, under standard conditions.

Cell culture and transfection

Human Microvascular Endothelial Cell-1 (HMEC-1) (Dr. Candal, CDC, Atlanta), were grown in MCDB-131 culture medium supplemented with 10% fetal calf serum and 40 μ mol/L of glutamine. Human monocytic/macrophage U937 cells were from ATCC (Manassas, US), and were grown in RPMI culture medium supplemented with 10% fetal calf serum. Subconfluent HMEC-1 were transfected with 10 μ g of the Myc-tagged N-terminal C-terminal PDI mutant construct, using 20 μ L of lipofectamine (Invitrogen) in the previously reported conditions (Tanaka et al, 2000). Transfected cells were cultured in the presence of G418 (1.5 mg/L) (PAA laboratories). Cells were starved in serum-free medium for 12 h before the experiments.

Measurement of PDI activity

The PDI specific substrate Di-E-GSSG was prepared as previously described (Raturi and Mutus, 2007). Wild type or mutant HMEC-1 either unstimulated or incubated at the indicated time with oxLDLs (or 4-HNE), were suspended in 250 μ l phosphate buffered saline, pH 7.0 containing 2 mmol/L EDTA (PDI buffer). PDI disulfide reduction activity was measured in

500 µl PDI assay buffer containing Di-E-GSSG (150 nmol/L), DTT (5 µmol/L) and cell suspension (50-100µg cell protein determined by the Bradford technique). Kinetics of Di-E-GSSG reduction were monitored fluorometrically at t0, t15 and t30 min of incubation at 37°C with the substrate, (excitation 525 nm emission 545 nm) (Raturi and Mutus 2007). PDI activity was calculated as $\frac{\text{Dfluorescence t30-t0}}{\text{fluorescence of the unstimulated control}}$, and the data are expressed as ratio of fluorescence/ fluorescence of the unstimulated control.

Evaluation of cell viability, apoptosis and necrosis.

Cytotoxicity was estimated using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. Apoptosis and necrosis were evaluated using 2 vital fluorescent dyes, the permeant DNA intercalating green-colored DNA probe SYTO-13 (0.6 µmol/L), and the non permeant intercalating red DNA probe propidium iodide (15 µmol/L), as described (Sanson et al, 2008). This test allowed to characterize living cells (green nucleus with normal morphology), cells with necrotic (red) nucleus and apoptotic cells (green nucleus with apoptotic features) (Fluorescence microscope Fluovert FU, Leitz).

Immunocytochemistry

Cells grown on glass cover slides, were washed with PBS and fixed for 10 min. in 30 % paraformaldehyde containing 4% triton X100, then incubated with the anti-PDI antibody, revealed with Alexa Fluor-conjugated secondary antibody, and visualized using a Zeiss LSM 510 fluorescence confocal microscope.

Immunohistochemistry

Human advanced carotid plaques (patients 70-75 years old) were obtained after endarterectomy (Cardiovascular Surgery Department, CHU Toulouse), fixed in formalin and

paraffin embedded. Serial 3 µm thin sections of each sample were incubated with the anti-4-HNE-adducts, and anti-PDI antibodies, then with appropriate biotin-labelled antibodies, and revealed by using avidin-biotin horseradish peroxidase visualization system (Vectastain, ABC kit Elite, Vector Laboratories).

Western blot analysis

HMEC-1 and human tissue samples were homogenized in extraction buffer, and used for SDS-PAGE/immunoblotting either as total protein extracts or after immunoprecipitation experiments (Sanson et al, 2009).

Quantitative and semi-quantitative RT-PCR analysis

Cells were trypsinized and washed in PBS, then diluted in SV RNA lysis buffer (Promega) and placed at -80°C until use. Total extract was purified (Promega) and equal amounts of total RNA were used for Real-Time Quantitative PCR Analysis experiments. Expression levels of PDI-P4HB, CHOP and spliced XBP1 were determined by using the specific primers as follows: forward huPDI (5'-CACTCAAGTTCTTTCCTGCC-3') and reverse huPDI (5'-ATCGTCTTCCTCCATGTCTG-3'), forward CHOP (5'-CAGATGAAAATGGGGGTA CCT-3') and reverse CHOP (5'-AGAAGCAGGGTCAAGAGTGGT-3'), forward spliced XBP1 (5'-GCAGGTGCAGGCCAGT-3') and reverse spliced XBP1 (5'-GAATGCCCA ACAGGATATCAGACT-3'), forward GAPDH (5'-CCTCCCGCTTCGCTCTCT-3') and reverse GAPDH (5'-CCTCCCGCTTCGCTCTCT-3'). The Fast SYBR Green MasterMix (Applied Biosystems) and the StepOne Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) were used to detect the real-time quantitative PCR products of reverse-transcribed cDNA samples according to the manufacturer's instructions. The incubation conditions were as follows : 95°C for 20 s, followed by 40 cycles of 3 s at 95°C, annealing/extension for 30 s, at 60°C. For each sample, PCR were done in duplicate for both the target genes and GAPDH control. The data were analyzed using StepOne Software v2.0.

Statistical analysis

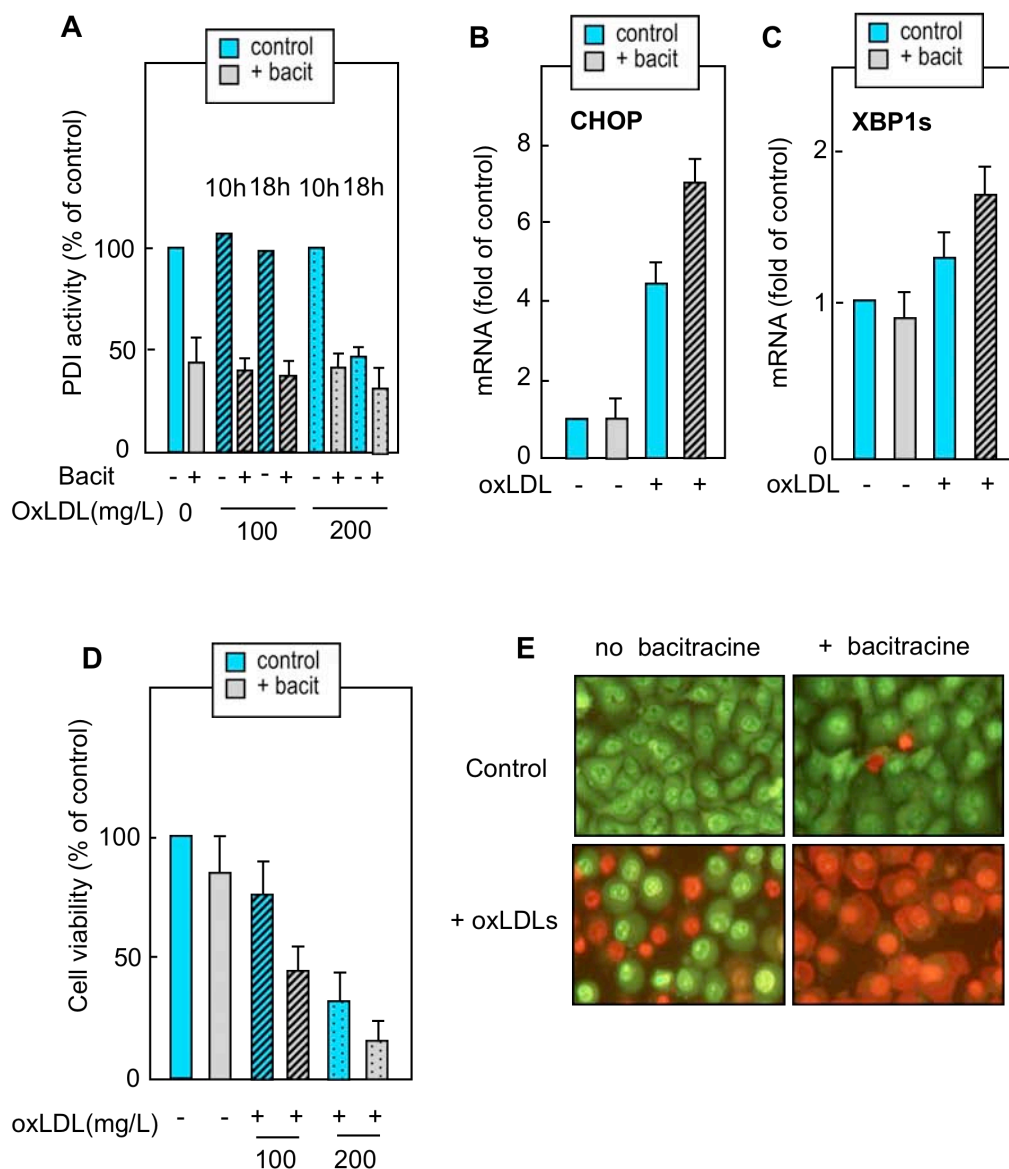
Data are given as mean \pm SEM. Estimates of statistical significance were performed by ANOVA (Tukey test - SigmaStat software). Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results :

PDI inhibition increases ER stress and apoptosis induced by oxLDLs

Previous reports have shown that PDI inhibition alters its protective effect and potentiates apoptosis (Na et al, 2007). We first checked if oxLDLs affect PDI enzyme activity in HMEC-1, using the fluorescent substrate dieosin glutathione disulfide (Di-E-GSSG) (Raturi and Mutus, 2007). As shown in Fig.1, toxic (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), but not lower (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oxLDL concentrations inhibited PDI activity, reaching more than 50 % after 18 h of incubation (Fig1A). To test whether PDI inhibition may contribute to oxLDL-induced apoptosis, we studied the effect of bacitracine, a macrocyclic dodecapeptide antibiotic and PDI inhibitor (Mandel et al, PNAS, 1993), on oxLDL-induced toxicity. As shown in Fig.1A, bacitracine inhibited the basal enzymatic activity of PDI in basal conditions and in the presence of oxLDLs. The mRNA expressions of ER stress markers, spliced XBP1 and the proapoptotic factor CHOP were markedly increased in response to oxLDLs (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), as reported (Sanson et al, 2008), and were potentiated by bacitracine (Fig.1B,C). When tested alone (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$), bacitracine did not (or slightly) induce apoptosis nor affected cell viability in basal conditions, while it significantly increased apoptosis induced by weakly toxic (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and strongly toxic (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) oxLDL concentrations (Fig.1 D,E).

Figure 1



PDI inhibition by oxLDLs and effect of bacitracine in HMEC-1

A. Effect of oxLDLs (100 and 200 mg/L) on PDI enzyme activity in the presence or absence of bacitracine (10 μ mol/L). PDI enzyme activity was determined at the indicated times using the fluorescent PDI specific substrate Di-E-GSSG. Enzyme activity was calculated as $D_{\text{fluorescence } t30\text{min}-t0}$, and the data are expressed as ratio of fluorescence/ fluorescence of the unstimulated control.

B,C. Q-PCR experiments showing the mRNA expression of CHOP (B) and of XBP1 spliced form (XBP1s) (C), in HMEC-1 treated for 14h with oxLDLs (200 mg/L). Relative mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA. Q-PCR data are expressed as ratio of the initial level.

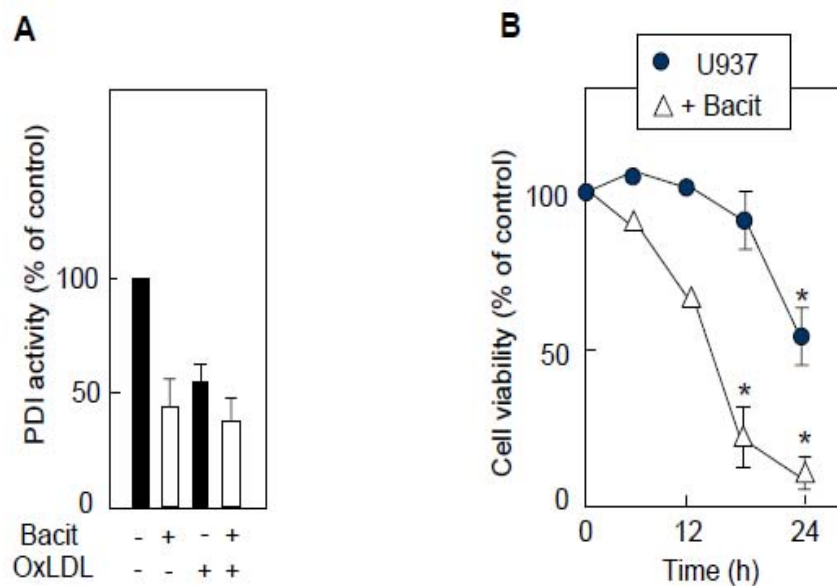
D. Cell viability experiments were done using the MTT test, on HMEC-1 incubated for 24h with 100 and 200 mg/L oxLDLs, as indicated.

E. Fluorescence microscopy of apoptotic vs necrotic cells (visualized by syto13/PI labeling) incubated for 16 h w/wo oxLDLs (200 mg/L) and w/wo bacitracine (10 μ mol/L)

Since macrophages accumulate oxLDLs in the vascular wall, and are exposed to the toxicity of oxidized lipids, we tested whether oxLDLs inhibit PDI enzyme activity, and the effect of

Since macrophages accumulate oxLDLs in the vascular wall, and are exposed to the toxicity of oxidized lipids, we tested whether oxLDLs inhibit PDI enzyme activity, and the effect of bacitracine in human U937 macrophagic cells. As shown in Fig.2, oxLDLs (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inhibited PDI activity in U937. Likewise, time-course experiments showed a strong and rapid potentiation of oxLDL toxicity by bacitracine in these cells (Fig. 2B).

Figure 2

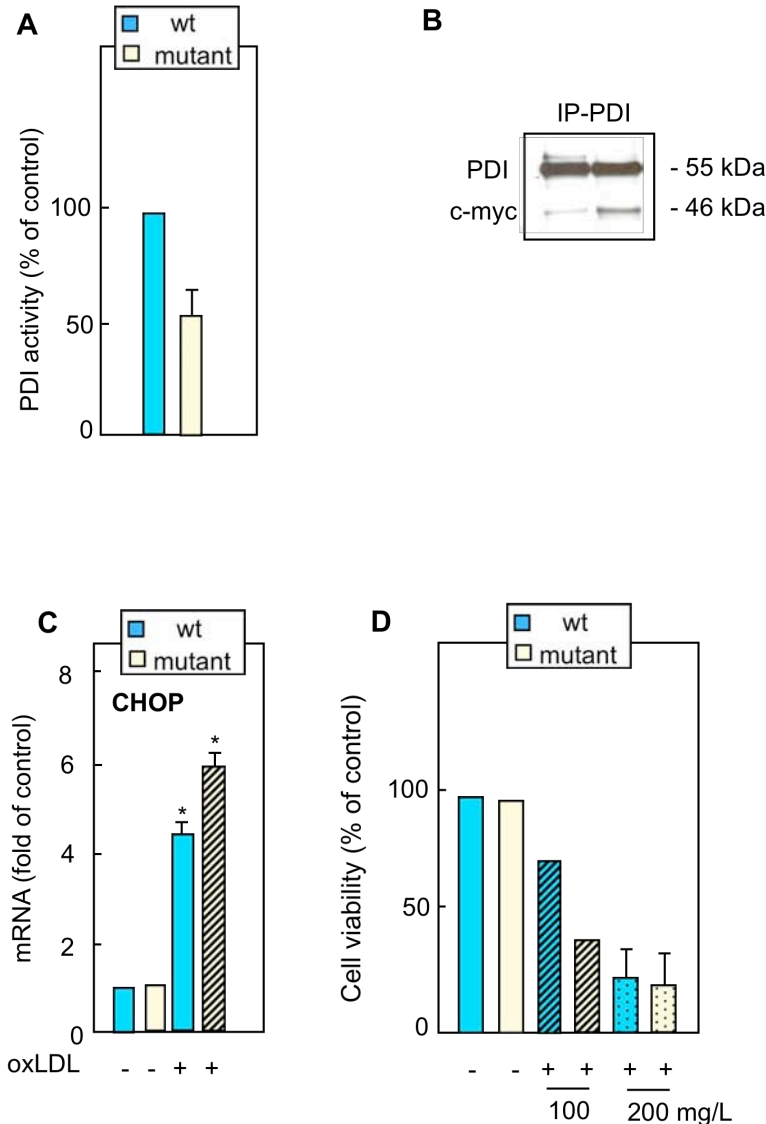


Inhibition of PDI by oxLDLs and toxicity in U937.

A. Inhibition of PDI in U937, after 18h incubation with oxLDLs (200 mg/L) and effect of bacitracine (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$). PDI was determined as above indicated.

*B. Time-course of oxLDL toxicity (200 mg/L) \pm bacitracine (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) in U937, determined by the MTT test. The data (expressed as % of the control) are mean \pm SEM of 4 separate experiments. * $p < 0.05$.*

Figure 3



Mutant PDI vector-transfected HMEC-1 exhibit increased ER stress and cytotoxicity levels in the presence of oxLDLs.

HMEC-1 were transfected with the N-terminal C-terminal mutant PDI vector, as described in the Method Section.

A. Evaluation of basal PDI enzyme activity in wild type (wt) and mutant PDI-transfected HMEC-1.

B. Evaluation of transfection efficiency by western-blot experiments done on PDI immunoprecipitates from wt and mutant PDI-transfected HMEC-1, and showing the expression of PDI and of the c-myc tag

C. Q-PCR experiments showing the mRNA expression of CHOP after 14h treatment with oxLDLs (200 mg/L). Relative mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA. Q-PCR data are expressed as ratio of the initial level. The data (expressed as % of the control) are mean \pm SEM of 4 separate experiments. * $p < 0.05$.

D. Cell viability experiments (MTT test), performed on wt and mutant PDI-transfected HMEC-1 incubated for 24h with 100 and 200 mg/L oxLDLs, as indicated.

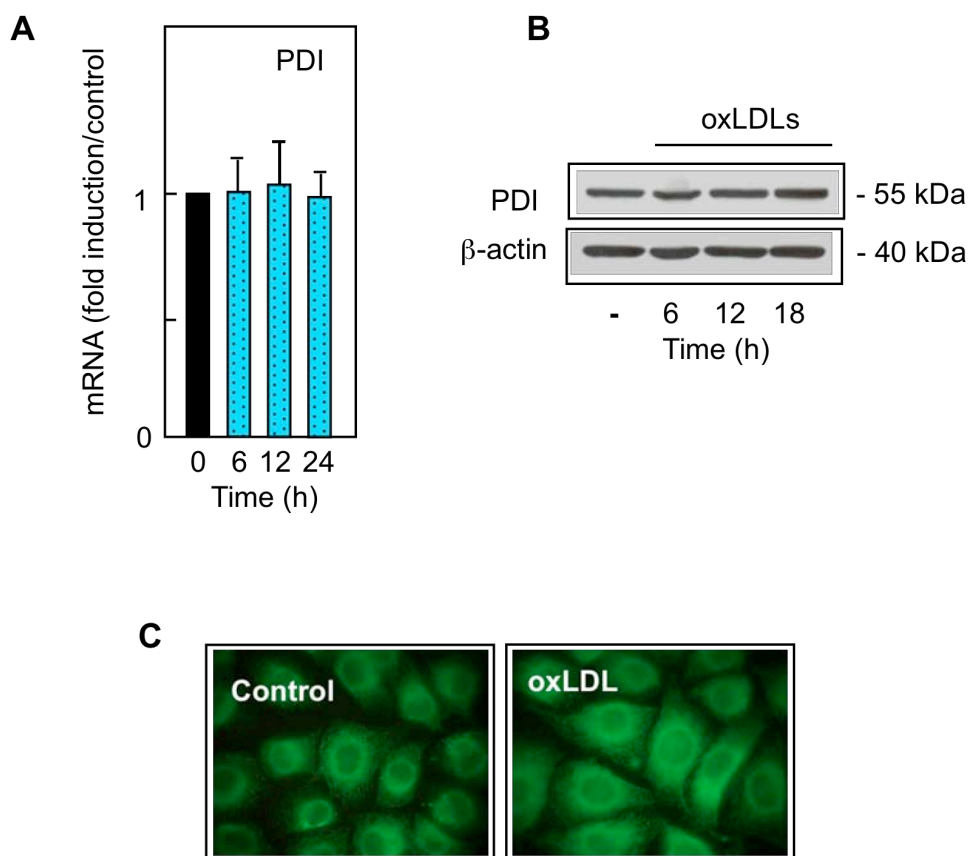
To confirm that PDI inhibition aggravates apoptosis, we checked the toxic effect of oxLDLs in HMEC-1 transfected with a myc-tagged PDI N-terminal C-terminal mutant vector (Tanaka et al, 2000, Uehara et al, 2006). The transfection efficiency was verified by measuring the basal PDI activity, which was severely decreased in mutant cells (Fig.3A), and by western-blot experiments using an anti PDI and an anti c-myc antibody (Fig.2B). As shown in Fig.3C,D, incubation of mutant cells with slightly toxic oxLDL concentrations (100 µg/mL) triggered a net increase in the expression of ER stress marker spliced XBP1 and CHOP , and a decreased cell viability, thereby confirming the results observed in the presence of bacitracine.

Altogether, these data indicate that PDI inhibition by bacitracine or by transfection of a mutant inactive PDI vector, aggravates oxLDL-induced ER stress and apoptosis mediated by oxLDLs. From these data, it can be hypothesized that PDI inhibition by oxLDLs contributes to ER stress and ER stress-induced apoptosis. We then aimed to decipher the mechanism by which oxLDLs inhibit PDI activity.

PDI inhibition results from the formation of 4-HNE adducts. Reversion by N-acetyl cysteine

We first checked whether toxic oxLDL concentrations induce a decrease in PDI expression, which could result in a loss in enzyme activity. As shown in Fig. 4, kinetic of incubation with oxLDLs (200 µg/mL) did not result in any decrease in PDI expression at the mRNA and protein level. These data were confirmed by immunocytochemistry experiments showing no difference in PDI expression in basal conditions and after 14h incubation with oxLDLs (200 µg/mL) (Fig.4C). We then checked whether oxLDL may inhibit PDI via a modification by lipid oxidation products.

Figure 4



Toxic oxLDL concentrations do not decrease PDI expression

A. Q-PCR experiments showing the expression of PDI mRNAs in HMEC-1, as function of the incubation time with oxLDLs (200 mg/L). Relative mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA. Q-PCR data are expressed as ratio of the initial level.

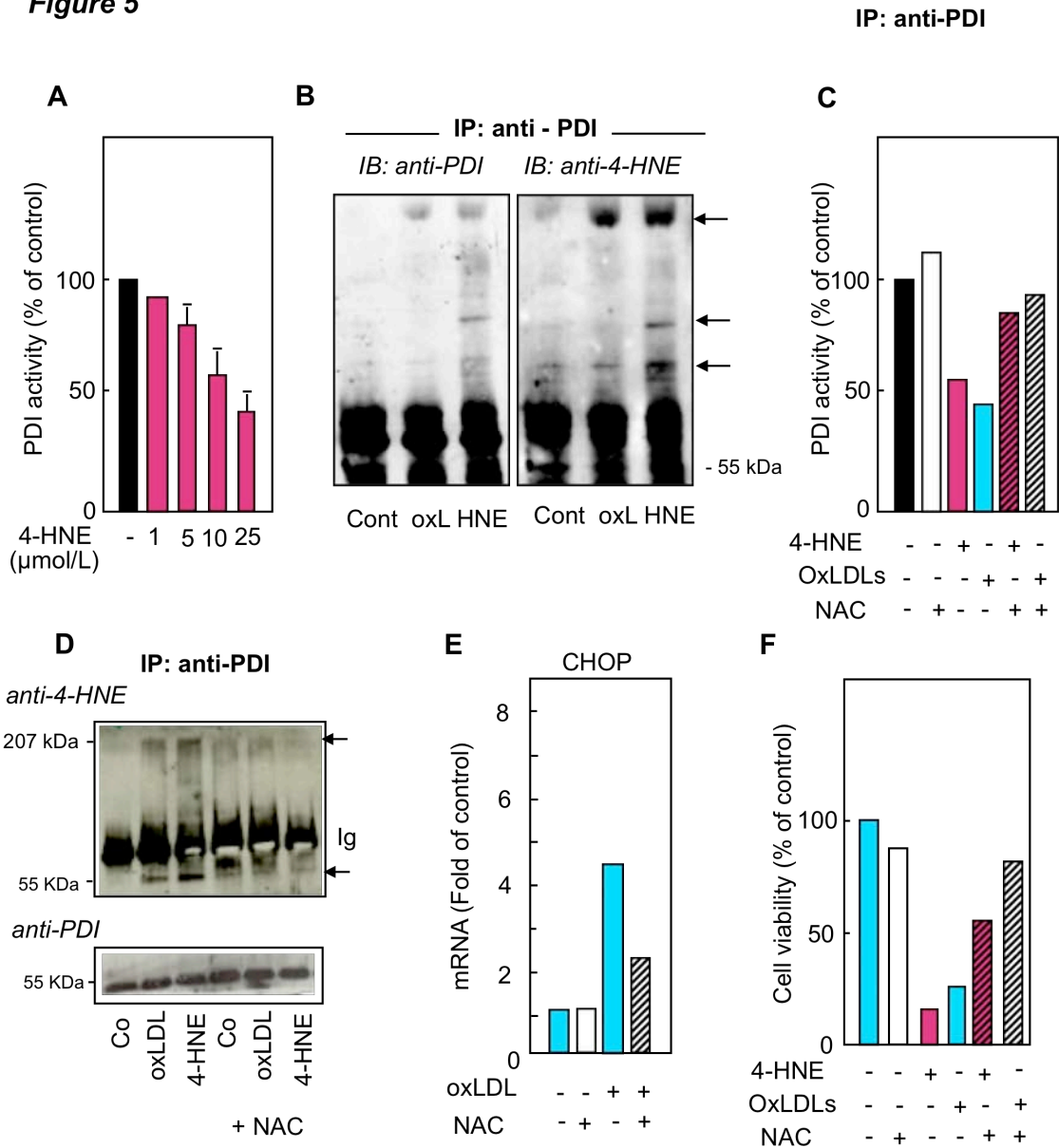
B. Time-course expression of PDI evaluated by western-blot on total protein extracts from HMEC-1 treated as in A. β -actin expression was done as control house-keeping protein.

C. Immunocytochemistry experiments showing the expression of PDI in control (left) and after 18h of treatment with oxLDLs (right). These data are representative of 4 separate experiments.

PDI is a cysteine-rich protein with 6 cysteine residues included in the two thioredoxin-like domains of the protein, at the N- and C-terminal moiety near the active site (Riemer et al, 2009; Atahet et al, 2009; Uehara et al, 2006). Since cysteine residues are a known target of 4-HNE, we checked whether PDI is modified by 4-HNE upon incubation of HMEC-1 with oxLDLs, and whether this modification alters its enzymatic activity. As shown in Fig.5A, incubation of HMEC-1 with 1 to 25 μ M 4-HNE concentrations freely added to the culture medium, resulted in a dose-dependent inhibition of PDI enzymatic activity. Incubation of cells during 18h with free 4-HNE (10 μ mol/L) or with oxLDLs (containing 4-HNE), induced a modification of PDI protein, characterized by the formation of high molecular weight cross-links associated to PDI immunoprecipitates (and detected using an anti 4-HNE adduct antibody) (Fig.5B). These data point out the fact that 4-HNE either free or associated with oxLDLs, forms adducts on PDI in HMEC-1, and this is associated with a progressive loss of PDI function. N-acetyl cysteine (NAC), a known antioxidant with carbonyl scavenger activity, reversed the formation of 4-HNE adducts on PDI as shown on immunoprecipitates from HMEC-1 incubated with oxLDLs and NAC (Fig. 5C). Moreover, NAC reversed the inhibitory effect of 4-HNE and oxLDLs on PDI enzyme activity, as well as cell death induced by toxic concentrations of oxLDLs (200 μ g/mL) and 4-HNE (Fig.5D,E). Altogether these data indicate that PDI inhibition by oxLDLs could result (at least in part), from its modification by 4-HNE, this contributing to oxLDL-induced ER stress and apoptosis.

PDI colocalized with 4-HNE adducts in the macrophage-rich lipid core of human advanced endarterectomy lesions, (Fig.6). The modification *in vivo* of PDI by 4-HNE was confirmed by immunoprecipitation experiments from protein extracts of advanced atherosclerotic lesions. No 4-HNE adducts were observed in control mammary arteries. These data indicate that PDI modification occurs *in vivo* in the vascular wall, thereby suggesting a possible loss of function *in situ* (due to 4-HNE adduct accumulation).

Figure 5



PDI inhibition by oxLDLs involves the formation of 4-HNE-adducts. Protection by NAC

A. Dose-effect of 4-HNE on PDI enzyme activity after 18h incubation with HMEC-1.

B. Formation of 4-HNE adducts on PDI determined by western-blot of PDI immunoprecipitates isolated from HMEC-1 cell extracts, after 14h treatment by oxLDLs (200 mg/L), or 4-HNE (10 $\mu\text{mol/L}$), using an anti 4-HNE antibody (Oxys) (right panel), and anti-PDI (left panel). The arrows show the presence of 4-HNE adduct-positive adducts forming high molecular weight cross-links on PDI.

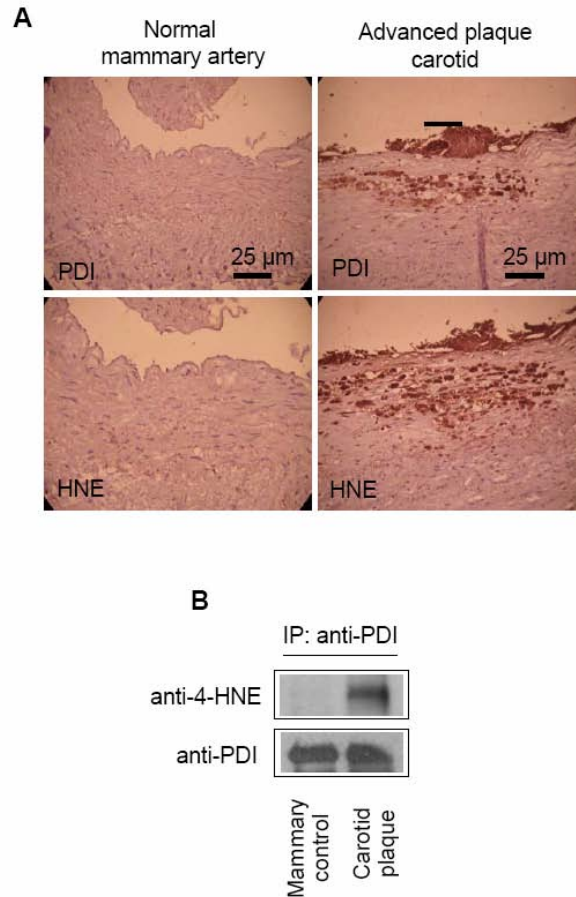
C. NAC restores the basal enzyme activity of PDI, determined on HMEC-1 after 18h incubation with oxLDLs (200 mg/L) or 4-HNE (10 $\mu\text{mol/L}$), in the absence or the presence of NAC (10 mmol/L).

D. NAC (10 mmol/L) neutralizes the formation of 4-HNE adducts on PDI (arrows), determined by western-blot on PDI immunoprecipitates of HMEC-1 cell extracts, after 14h treatment by oxLDLs (200 mg/L) or 4-HNE (10 $\mu\text{mol/L}$).

E. Q-PCR experiments expressed as ratio of the initial level and showing the protective effect of NAC (10 mmol/L) on CHOP mRNA expression induced by oxLDLs (200 mg/L).

F. Protective effect of NAC against the cytotoxicity of oxLDLs (200 mg/L) and 4-HNE (10 $\mu\text{mol/L}$), evaluated by the MTT test. The data are expressed as % of the control.

Figure 6



Detection of 4-HNE-adducts in vivo in human advanced atherosclerotic lesions.

A. PDI was immunoprecipitated from protein extracts of tissue homogenates from human normal mammary artery, used as control and from advanced carotid plaque (endarterectomy). The immunoprecipitates were blotted with the anti 4-HNE-adduct and anti PDI antibodies.

B. Paraffin sections of normal mammary arteries (control) (left panels) obtained from coronary bypass grafting and carotid plaques from endarterectomy (right panels), were analyzed for PDI (upper panel) and 4-HNE-adduct (HNE). The pictures showed here are representative of analysis for 3 separate normal control arteries and 3 advanced carotid plaques.

Discussion

In this study, we found that toxic concentrations of oxLDLs induce an inhibition of the ER-resident chaperone PDI, which precedes and is concomitant with apoptosis. It is hypothesized that PDI inhibition results from its carbonylation by 4-HNE, evidenced by the presence of 4-HNE-adducts on PDI isolated from oxLDL-treated cells. PDI inactivation by oxLDLs (and 4-HNE) potentiated ER stress and oxLDL-induced apoptosis, while it was reversed by the antioxidant/carbonyl scavenger NAC. The modification of PDI by 4-HNE occurs *in vivo* in advanced atherosclerotic lesions.

PDI is known to promote the repair of incorrectly formed disulfide bonds of misfolded proteins in the ER (Riemer et al, 2009). PDI is activated by a huge number of agents or pathological conditions leading to ER stress, including hypoxia, ischemia, chemotherapy drugs or NO exposure (Tian et al, 2009; Truettner et al, 2009; Lovat et al, 2008). Like most ER chaperones, it may protect against ER stress-mediated apoptosis (Lovat et al 2008; Uehara et al 2006). PDI inhibition by bacitracine, or the transfection of a PDI mutant vector coding for an enzymatically inactive enzyme, resulted in a net increase in UPR markers (CHOP and spliced XBP1), and in oxLDL-induced apoptosis, in agreement with the data reported for NO in neurons (Uehara et al 2006), or for chemotherapy drugs (Lovat et al 2008). These data indicate that PDI may act as a survival mechanism aiming at limiting ER stress and apoptosis, as previously reported for the other ER chaperones such as GRP78 in neurons (Wang et al 2010; Kishi et al 2010) and ORP150 for oxLDLs (Sanson et al, 2008; Sanson et al 2009) or antitumoral drugs (Namba et al 2007). The antiapoptotic effect of ORP150 and of GRP78 is due to their calcium buffering properties, and to the fact that they can maintain ER sensors in an inactive state (thereby limiting ER stress induction and subsequent apoptosis) (Dudek et al 2009; Sanson et al 2009). The protective mechanism of PDI is different as it implicates a

correction of the misformed disulfide bonds (Song and Wang 1995; Weissman, and Kim 1993; Creighton et al 1980), *via* a “scanning and escape” mechanism, as described by Walker and Gilbert (1997). In this mechanism, the N-terminal thioredoxin active site forms a disulfide bond with a (to-be-corrected) protein (“scanning”), which is then released by the C-terminal thioredoxin active site (“escape”), allowing in turn a regeneration of PDI (Walker and Gilbert 1997). Previous reports have shown that oxLDLs trigger a rapid and intense oxidative stress and an activation of the proteasome system (Vieira et al 2000, Robbesyn et al 2003), associated with ER stress induction (Sanson et al, 2008). It is likely that PDI, like the proteasome system and ER stress, is activated in response to oxidative stress, as a protective and survival mechanism allowing to restore normal cellular and ER functions (Tu and Weissman 2004;Riemer et al 2009). The fact that PDI inhibition in PDI mutant cells, and in cells pre-treated with the specific PDI inhibitor bacitracine, increases ER stress and apoptosis, strongly suggests that PDI tends to limit ER stress-induced proapoptotic signaling mediated by oxLDLs, and that its inhibition contributes to apoptosis. Interestingly, it was proposed that cytosolic PDI is more efficient than ER-associated PDI in preventing apoptosis mediated by etoposide, and is a substrate for caspase 3 and 7, which results in the generation of 33 and 40 kDa fragment during the apoptosis process (Na et al 2007). In our system, an implication of caspase 3 explaining the inhibitory mechanism of oxLDLs is unlikely, because we did not detect any 33 nor 40 kDa PDI fragment after incubation with oxLDLs, even in apoptotic cells, nor any decrease in the 55 kDa protein level. Further, while caspase 3 is activated by oxLDLs, its inhibition by the caspase inhibitors *z-VAD-fmk* and *DVED-fmk* has no effect on oxLDL-induced apoptosis (Vindis et al, 2006). Lastly, in our system, caspase 3 activation is observed concomitantly with apoptosis, while PDI inhibition occurs several hours before the beginning of cell death. We then hypothesized that PDI inhibition results from its modification by 4-HNE from oxLDLs, which progressively impairs its protective function (Carbone et al 2005).

We show here that long term incubation of HMEC-1 with oxLDLs results in the formation of 4-HNE adducts on PDI, which can be mimicked by incubation of cells with 4-HNE freely added to the culture medium. The modification of PDI by 4-HNE has been previously reported in the liver of aged mice (Rabek et al, 2003), and in rat models for alcoholic liver disease (which results in major oxidative stress) (Carbone et al, 2005). The modification of PDI occurs on cysteine residues present in the two thioredoxin domains of PDI, and thus playing a major role in the PDI functionality (Walker and Gilbert). A close mechanism (cysteine modification of PDI by S-nitrosylation) occurs in neuronal cells in the presence of NO, and is strongly associated to neurodegeneration, thereby linking the S-nitrosylation of PDI to the extension of neurodegenerative diseases (Uehara et al 2006; Nakamura and Lipton 2008). As discussed by Carbone et al (2005), it can be hypothesized that 4-HNE, by forming adducts on cysteines of the N-terminal or C-terminal active site, blocks the “scanning and escape” mechanism, and thus inhibits PDI activity, leading in turn to the accumulation of misfolded proteins, ER stress increase and apoptosis. We previously reported that NAC blocks the ROS increase and ER stress generated by oxLDLs (Sanson et al, 2008). As thiol-protectant and carbonyl scavenger, NAC is able to neutralize the formation of 4-HNE adducts on PDI, and to restore its basal enzyme activity. The fact that NAC reversed the formation of 4-HNE adducts on PDI, is consistent with a protective effect of NAC on the thiol-residues of cysteine, as reported for GSH, which restores PDI activity after its modification (*in vitro*) by 4-HNE (Carbone et al 2005).

Though the role of carbonyl stress in atherosclerosis has been largely documented, and particularly its role in the metabolic deviation of oxLDLs towards macrophages and the formation of foam cells (Leonarduzzi et al 2005), the precise targets of aldehydes are not yet clearly identified (Gueraud et al 2010; Negre-Salvayre et al 2010). Our data point out a new molecular mechanism by which 4-HNE accumulation mediated by oxLDL on a major ER

chaperone, leads to its inactivation with consequences on apoptosis. We show here that PDI modification by 4-HNE occurs *in vivo* in advanced atherosclerotic lesions, (and not in normal arteries), evidenced by the presence of 4-HNE adducts on PDI immunoprecipitated from human carotid endarterectomy plaques, and their colocalization in the lesions. We recently reported that ER stress markers colocalize with 4-HNE adducts in atherosclerotic lesions and that free 4-HNE is a strong ER stress inducer in vascular cells (Sanson et al, 2009). One hypothesis is that the modification of PDI by 4-HNE occurring in the vascular wall, could locally generate a loss of function of this major chaperone, contributing to ER stress extent and apoptosis occurring in advanced atherosclerotic lesions, and leading to plaque fragilization, rupture and subsequent cardiovascular events.

Acknowledgments

Pr. Lipton and Dr. Nakamura are gratefully acknowledged for providing the N-terminal C-terminal PDI mutant vector. The authors thank Dr. Jean-Claude Thiers, Mrs. Marie-Hélène Graziade and Corinne Bernis for their excellent technical assistance.

Sources of Funding

The authors acknowledge the financial supports by INSERM, Université Paul Sabatier Toulouse III, Fondation pour la Recherche Médicale (DCV2007040927), Fondation Coeur et Artères (FCA-06T6) and European COST-B35.

References

- 1 - Riemer J, Bulleid N, Herrmann JM. Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. *Science*. 2009;324:1284-7
- 2 - Hatahet F, Ruddock LW. Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:2807-50.
- 3 - Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, Lipton SA. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature*. 2006;441:513-7.
- 4- Na KS, Park BC, Jang M, Cho S, Leedo H, Kang S, Lee CK, Bae KH, Park SG. Protein disulfide isomerase is cleaved by caspase-3 and -7 during apoptosis. *Mol Cells*. 2007;24:261-7.
- 5 -Nakamura T, Lipton SA. Emerging roles of S-nitrosylation in protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Antioxid Redox Signal*. 2008 ;10:87-101.
- 6 - Lassègue B, Griendling KK NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:653-61
- 7 - Berliner JA and Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free. Radic. Biol. Med* 1996;20:707-27.
- 8 - Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol. Chem*. 1997;272:20963-20966.
- 9 - Jessup W, Kritharides L, Stocker R.. Lipid oxidation in atherogenesis: an overview. *Biochem Soc Trans*. 2004;32:134-8.
- 10 - Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2003;1010:698-709.
- 11 - Rader, DJ and Puré E. Lipoproteins, macrophage function, and atherosclerosis: beyond the foam cell? *Cell. Metab*. 2005;1:223-30.
- 12 - Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-1143.

- 13 -Holvoet P, Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *Faseb J.* 1994;8:1279-1284.
- 14 - Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jürgens G, Borner C, Almeida L, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *FASEB J.* 2000;14:532-42.
- 15 - Auge N, Garcia V, Maupas-Schwalm F, Levade T, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1990-5.
- 16 – Sanson M, Ingueneau C, Vindis C, Thiers JC, Glock Y, Rousseau H, Sawa Y, Bando Y, Mallat Z, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Oxygen-regulated protein-150 prevents calcium homeostasis deregulation and apoptosis induced by oxidized LDL in vascular cells. *Cell Death Differ.* 2008;15:1255-65.
- 17 - Sanson M, Augé N, Vindis C, Muller C, Bando Y, Thiers JC, Marachet MA, Zarkovic K, Sawa Y, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: prevention by oxygen-regulated protein 150 expression. *Circ Res.* 2009;104:328-36.
- 18 - Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 1998;12:982-95.
- 19 - Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, Kaufman RJ. Chop deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest.* 2008 Oct;118(10):3378-89.
- 20 - Thorp E, Li G, Seimon TA, Kuriakose G, Ron D, Tabas I. Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} mice lacking CHOP. *Cell Metab.* 2009;9:474-81.
- 21 - Tabas I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circ Res.* 2010;107:839-50.

- 22 - Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K, Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Mochizuki N, Kitakaze M. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation*. 2007;116:1226-33.
- 23 - Townsend DM, Manevich Y, He L, Xiong Y, Bowers RR Jr, Hutchens S, Tew KD. Nitrosative stress-induced s-glutathionylation of protein disulfide isomerase leads to activation of the unfolded protein response. *Cancer Res*. 2009;69:7626-34.
- 24 - Fu HY, Minamino T, Tsukamoto O, Sawada T, Asai M, Kato H, Asano Y, Fujita M, Takashima S, Hori M, Kitakaze M. Overexpression of endoplasmic reticulum-resident chaperone attenuates cardiomyocyte death induced by proteasome inhibition. *Cardiovasc Res*. 2008;79:600-10.
- 25 - Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ*. 2006;13:374-84.
- 26 - Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:519-29.
- 27 - Tanaka S, Uehara T, Nomura Y. Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. *J Biol Chem*. 2000;275:10388-93.
- 28 - Raturi A, Mutus B. Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. *Free Radic Biol Med*. 2007;43:62-70.
- 29 - Noiva R. Protein disulphide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10: 481–93.
- 30 - van Nispen Tot Pannerden HE, van Dijk SM, Du V, Heijnen HF. Platelet protein disulfide isomerase is localized in the dense tubular system and does not become surface expressed after activation. *Blood* 2009;114:4738-40.

- 31 - Mandel R, Ryser HJ, Ghani F, Wu M, Peak D. Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:4112-6.
- 32 - Tian F, Zhou X, Wikström J, Karlsson H, Sjöland H, Gan LM, Borén J, Akyürek LM. Protein disulfide isomerase increases in myocardial endothelial cells in mice exposed to chronic hypoxia: a stimulatory role in angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297:H1078-86.
- 33 - Truettner JS, Hu K, Liu CL, Dietrich WD, Hu B. Subcellular stress response and induction of molecular chaperones and folding proteins after transient global ischemia in rats. *Brain Res*. 2009;1249:9-18.
- 34- Lovat PE, Corazzari M, Armstrong JL, Martin S, Pagliarini V, Hill D, Brown AM, Piacentini M, Birch-Machin MA Redfern CP. Increasing melanoma cell death using inhibitors of protein disulfide isomerases to abrogate survival responses to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res*. 2008;68:5363-9
- 35 - Nomura Y. Neuronal apoptosis and protection: effects of nitric oxide and endoplasmic reticulum-related proteins. *Biol Pharm Bull*. 2004;27:961-3.
- 36 - Wang M, Ye R, Barron E, Baumeister P, Mao C, Luo S, Fu Y, Luo B, Dubeau L, Hinton DR, Lee AS. Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis. *Cell Death Differ*. 2010;17:488-98.
- 37 - Kishi S, Shimoke K, Nakatani Y, Shimada T, Okumura N, Nagai K, Shin-Ya K, Ikeuchi T. Nerve growth factor attenuates 2-deoxy-d-glucose-triggered endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via enhanced expression of GRP78. *Neurosci Res*. 2010;66:14-21.
- 38 - Namba T, Hoshino T, Tanaka K, Tsutsumi S, Ishihara T, Mima S, Suzuki K, Ogawa S, Mizushima T. Up-regulation of 150-kDa oxygen-regulated protein by celecoxib in human gastric carcinoma cells. *Mol Pharmacol*. 2007;71:860-70.
- 39 - Dudek J, Benedix J, Cappel S, Greiner M, Jalal C, Müller L, Zimmermann R. Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66:1556-69.
- 40 - Song JL, and Wang CC. Chaperone-like activity of protein disulfide-isomerase in the refolding of rhodanese. *Eur. J. Biochem*. 1995; 231:312–316.

- 41 – Weissman JS and Kim PS. Efficient catalysis of disulphide bond rearrangements by protein disulfide isomerase. *Nature* 1993;365:185–188.
- 42 – Creighton TE, Hillson DA and Freedman RB. Catalysis by protein-disulphide isomerase of the unfolding and refolding of proteins with disulphide bonds. *J. Mol. Biol.* 1980;142: 43–62.
- 43 - Walker KW and Gilbert HF. Scanning and escape during protein-disulfide isomerase-assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* 1997;272:8845–8848
- 44 - Robbesyn F, Garcia V, Auge N, Vieira O, Frisach MF, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells. *FASEB J.* 2003;17:743-5.
- 45 - Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol.* 2004;164:341-6.
- 46 - Vindis C, Elbaz M, Escargueil-Blanc I, Augé N, Heniquez A, Thiers JC, Nègre-Salvayre A, Salvayre R. Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:639-45.
- 47 - Carbone DL, Doorn JA, Kiebler Z, Petersen DR. Cysteine modification by lipid peroxidation products inhibits protein disulfide isomerase. *Chem Res Toxicol.* 2005;18:1324-31.

2.3.3. Discussion

Les résultats de cet article démontrent que les LDLox induisent une inhibition de l'activité de la chaperone PDI exprimée dans le RE. Cette inhibition de PDI est à l'origine d'une accentuation du stress du RE et de l'UPR et joue un rôle aggravant dans l'apoptose induite par les LDLox. L'effet inhibiteur des LDLox sur l'activité de PDI résulte de sa modification via la formation et l'accumulation d'adduits de 4-HNE.

Les propriétés antiapoptotiques de PDI sont démontrées par le fait que l'inhibition de PDI par la bacitracine, un antibiotique qui bloque spécifiquement PDI, rend les cellules plus sensibles aux LDLox, à des concentrations non toxiques pour les cellules contrôles. L'effet de la bacitracine s'accompagne d'une augmentation du stress du RE, avec une potentialisation de l'expression des marqueurs du stress tels que CHOP ou de la forme active de XBP1 (XBP1s). L'effet de la bacitracine suggère que PDI inhibe l'apoptose induites par les LDLox. Ces résultats sont également confirmés par l'effet des LDLox sur des cellules transfectées avec un vecteur codant pour une forme mutante enzymatiquement inactive de PDI. Les cellules mutantes pour PDI, se comportent comme les cellules traitées par la bacitracine, et sont sensibles aux LDLox à des doses non toxiques pour les cellules contrôles (100 µg apoB/ml). De même ces cellules montrent une augmentation d'expression des marqueurs de stress du RE, CHOP et XBP1s. PDI jouerait donc un rôle cytoprotecteur, et son inhibition fragiliserait les cellules contre l'apoptose induite par les LDLox.

L'effet inhibiteur des LDLox n'est pas dû à une diminution de l'expression de PDI, mais pourrait résulter de la modification de la protéine par formation de 4-HNE-adduits. En effet le 4-HNE formé au cours de l'oxydation des LDL, et présent dans les LDLox, participe à leur signalisation toxique en formant des adduits sur certains acides aminés en se fixant sur les groupements NH₂ libres ou les résidus SH. La modification de PDI par le 4-HNE ou par S-nitrosylation est connue et se produit au niveau des cystéines des extrémités N et C terminales, près du site actif (Carbone et al., 2005). Cette modification s'accompagne d'une inhibition de l'activité enzymatique de la protéine (Nakamura and Lipton, 2008; Uehara et al., 2006). De plus la modification par S-nitrosylation de PDI induit une apoptose des neurones (Nakamura and Lipton, 2008; Uehara et al., 2006).

La modification de PDI au cours de l'athérosclérose n'avait pas été décrite jusqu'à présent. Or nos travaux montrent que le 4-HNE inhibe PDI de façon dose-dépendante, et forme des

adduits visibles en western-blot grâce à l'utilisation d'un anticorps qui permet également de révéler la formation de cross-links de poids moléculaire plus élevé, caractéristique de la modification de la protéine.

Nos résultats suggèrent que l'inhibition de PDI par accumulation d'adduits de 4-HNE, pourrait participer à l'apoptose des cellules vasculaires, et donc fragiliser les plaques d'athérosclérose. Cette hypothèse est appuyée par les résultats montrant une forte expression de PDI colocalisée avec les 4-HNE adduits, dans les plaques avancées (endarterectomie). D'autre-part, nous montrons que NAC bloque la mort cellulaire induite par les LDLox et le 4-HNE. Cet effet protecteur est dû aux propriétés antioxydantes de NAC qui inhibe le stress oxydant et la signalisation cytotoxique des LDLox (Sanson et al., 2009). L'effet de NAC résulte également des propriétés carbonyl scavenger de cet agent qui neutralise la modification des protéines cellulaires par le 4-HNE. La neutralisation par NAC de la formation de 4-HNE-adduits sur la protéine, permet de régénérer l'activité enzymatique de PDI, et participe à l'effet protecteur antiapoptotique de NAC en présence de LDLox.

IV- CONCLUSION et PERSPECTIVES

IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La détermination des mécanismes impliqués dans la balance mort/survie des cellules vasculaires au cours du développement de la lésion athéromateuse est importante pour comprendre et prévenir les phénomènes favorisant l'érosion ou la rupture des plaques.

Les résultats obtenus lors de ce travail de thèse ont permis d'améliorer les connaissances sur les propriétés anti-athérogènes des HDL mais aussi de mettre en évidence le rôle majeur de deux chaperones du RE : ORP150 et PDI dans la régulation de la signalisation apoptotique induite par les LDLox.

L'effet protecteur des HDL a été initialement attribué au transport inverse du cholestérol de la paroi vasculaire vers le foie, le deuxième mécanisme invoqué est l'effet inhibiteur des HDL sur l'oxydation des LDL ainsi que les effets cellulaires associés. Actuellement, les voies de signalisation impliquées dans l'effet protecteur des HDL sont incomplètement définies.

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré pour la première fois dans des cellules endothéliales microvasculaires humaines, que les HDL inhibent l'activation des senseurs du RE impliqués dans la réponse UPR induite par les LDLox. Un stress du RE prolongé et non résolu peut induire l'apoptose des cellules. Nous avons mis en évidence que l'activation de l'UPR par les LDLox participent à la signalisation apoptotique induite par les LDLox. Plus précisément, la voie IRE1 α /JNK, le facteur de transcription CHOP dans les cellules HMEC-1 et la caspase 12 dans les CE murines sont activés suite au stress du RE. Cependant, l'inhibition spécifique de ces voies ne bloque pas complètement l'apoptose, il est décrit que ces voies de signalisation convergent vers la mitochondrie pour activer la mort cellulaire. Ces données sont en accord avec nos travaux précédents puisque nous avons montré dans le laboratoire que les LDLox activent deux voies de signalisation apoptotiques intrinsèque dépendantes ou non des caspases (Vindis et al., 2005). Dans ces voies de signalisation apoptotiques, la mitochondrie apparaît comme un carrefour majeur pour conduire à la mort cellulaire. Il serait intéressant dans la suite de ce travail, d'étudier si les LDLox via le stress du RE et l'UPR pourraient moduler l'expression des protéines de la famille Bcl-2 telles que Bcl-2, Bcl-XL, Bax ou Bak. En effet, l'induction de JNK pourrait phosphoryler la protéine anti-apoptotique Bcl-2, de même que CHOP pourrait inhiber sa transcription. Ceci déclencherait la voie intrinsèque avec une translocation de Bak/Bcl-2 à la

IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

mitochondrie, une perméabilisation de la membrane mitochondriale, et l'activation de l'apoptose de façon dépendante ou indépendante des caspases.

Nos résultats indiquent que, bien que le stress du RE soit d'abord un processus de survie, un stress prolongé induit par des concentrations toxiques de LDLox fait basculer vers une signalisation apoptotique. Un des enjeux majeurs futurs dans la recherche sur le stress du RE, aussi bien dans l'athérosclérose que dans d'autres pathologies humaines très répandues comme le diabète ou les maladies neurodégénératives, est la compréhension des signaux qui font basculer le stress du RE transitoire physiologique au stress du RE chronique conduisant à la mort cellulaire. L'inhibition du stress du RE et des voies apoptotiques de l'UPR par les HDL est une propriété protectrice nouvelle des HDL qui participerait aux fonctions anti-athérogènes de ces particules.

Nous avons montré que les LDLox induisent en plus du stress du RE, une réponse autophagique. Nous apportons de nouvelles données sur le rôle de l'autophagie dans l'athérosclérose. Nous montrons que l'autophagie n'est pas directement impliquée dans la mort cellulaire induite par les LDLox, mais intervient dans l'exposition des phosphatidylsérines à la surface des cellules apoptotiques facilitant ainsi leur phagocytose.

Le rôle de l'autophagie dans le développement des plaques athérosclérotiques reste encore peu connu. A l'heure actuelle, on ne sait pas à quel moment l'autophagie est induite dans les plaques athérosclérotiques, plutôt dans les stades précoces ou dans les stades avancés des lésions. L'étude de marqueurs de l'autophagie dans des plaques athérosclérotiques humaines instables prélevées par endartériectomie et dans des lésions initiales ou des plaques à différents stades chez la souris apoE^{-/-} pourrait nous renseigner sur la cinétique d'activation de ce processus dans le temps et sur les types cellulaires touchés.

De plus, il n'est pas encore connu si l'autophagie est bénéfique ou au contraire préjudiciable à la stabilité des lésions. En effet, de la même façon que le stress du RE qui est d'abord un processus de survie mais qui participe à la mort des cellules vasculaires et à l'instabilité des plaques, l'autophagie pourrait être impliquée dans une mort autophagique qui contribuerait à l'instabilité des plaques. En effet, même si nous ne montrons pas dans notre système que l'autophagie est associée à la mort des CE et des macrophages, la mort autophagique des CML vasculaires induite en particulier par le 7-cétocholestérol a déjà été rapportée (Martinet et al., 2004).

IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

De plus, des résultats préliminaires du laboratoire montrent une activation des marqueurs d'autophagie (LC3-II et Beclin-1) dans des primocultures de CML humaines traitées par des LDLox. Ainsi la mort autophagique des CML pourrait participer à la déstabilisation des lésions.

En revanche, le rôle de l'autophagie que nous rapportons dans la facilitation de la phagocytose des cellules apoptotiques pourrait être bénéfique dans le développement des lésions en accélérant l'épuration des cellules apoptotiques (CE ou CML) et en diminuant les réactions inflammatoires. Ainsi, nous pourrions faire l'hypothèse que l'autophagie qui surviendrait au début de la formation de la lésion serait bénéfique en retardant la formation du centre nécrotique mais la mort autophagique dans les stades plus avancés pourrait contribuer à la déstabilisation des lésions.

Les voies de signalisation à l'origine de l'induction de l'autophagie par les LDLox ne sont pas connues. Ainsi, afin de caractériser les voies cellulaires faisant le lien entre la dérégulation calcique induite par les LDLox et l'induction de l'autophagie, nous avons étudié l'implication de la voie CaMKK β -AMPK-mTOR. Ces résultats préliminaires montrent que l'activation de la CaMKK β et l'inhibition de mTOR semblent impliquer dans l'induction de l'autophagie par les LDLox. Le rôle de AMPK dans cette voie devra être confirmée dans des cellules AMPK $\alpha 1^{-/-}\alpha 2^{-/-}$. Il semble que dans nos conditions, un influx massif de calcium dans le cytosol soit à l'origine de l'activation de l'autophagie. Il a également été montré dans le laboratoire que les LDLox causent préalablement à l'influx calcique massif, des fluctuations précoces de calcium dans le RE qui serait à l'origine de l'augmentation de calcium intracellulaire via l'activation de récepteurs/canaux calciques de la membrane plasmique. Nous pourrions étudier l'influence de ces mouvements calciques précoces sur l'induction de l'autophagie par les LDLox et l'effet des HDL. Cependant, le rôle du Ca²⁺ dans l'autophagie est complexe et certaines études montrent que l'inhibition des IP3R, qui régulent la sortie de Ca²⁺ du RE, active l'autophagie (Criollo et al., 2007).

Comme le montre nos travaux et les études précédentes (Sanson et al., 2009), l'apoptose dépendante du stress du RE fait intervenir des mouvements calciques précoces à partir du RE et une augmentation intense plus tardive de la concentration calcique cytosolique.

IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nous montrons que l'induction de l'autophagie par les LDLox dépend également de la dérégulation calcique. Les HDL en bloquant le pic calcique et probablement les mouvements calciques provenant du RE bloquent à la fois le stress du RE, la signalisation apoptotique consécutive et l'autophagie induite par les LDLox. L'un des mécanismes intervenant dans la dérégulation calcique induite par les LDLox pourrait être le stress oxydant. Or les HDL bloquent la production des ERO induite par les LDLox, ce qui pourrait être le mécanisme à l'origine de l'inhibition de la dérégulation calcique, du stress du RE et de l'autophagie. Ainsi, il faudra déterminer les voies de signalisations induites par les HDL qui protègent contre le stress oxydant à l'origine du stress du RE et de l'autophagie.

Dans une troisième partie, nous avons montré que les LDLox induisent une modification de l'activité de PDI qui potentialise le stress du RE et l'apoptose. L'inhibition de PDI par l'inhibiteur Bacitracine ou par un vecteur codant une PDI enzymatiquement inactive accentue le stress du RE et l'apoptose. Ainsi de la même façon que la chaperone ORP150 (Sanson 2008), PDI serait impliqué dans la protection contre l'apoptose induite par les LDLox.

En perspective à ce travail, nous prévoyons d'étudier le mécanisme par lequel PDI protège contre l'apoptose des LDLox. L'effet antiapoptotique de PDI pourrait impliquer plusieurs mécanismes, en particulier une modulation du stress oxydant et le maintien du potentiel redox cellulaire, *via* la régénération des groupements thiol. Nous étudierons l'effet du stress oxydant et de doses faibles de LDLox sur l'activation et l'expression de PDI. En effet, les résultats préliminaires observés dans les HMEC-1, montrent que les temps courts de pulse avec les LDLox, s'accompagnent d'une augmentation de l'activité enzymatique de PDI, qui pourrait résulter soit d'une activation de PDI, soit une augmentation de son expression ou les deux.

Il a par ailleurs été décrit que PDI diminuerait l'exposition des PS à la paroi externe de la membrane plasmique, et donc inhiberait l'apoptose. L'exposition des PS à la membrane externe est un marqueur précoce d'apoptose, et un signal de reconnaissance pour les phagocytes. Nos travaux (1^o partie de ce travail) montrent que l'exposition des PS est régulée par l'induction de l'autophagie. Nous étudierons les liens entre autophagie et PDI, en particulier l'induction de cette voie dans les cellules mutantes pour PDI

Enfin, les résultats observés dans les plaques d'athérosclérose montrent une surexpression de PDI dans les lésions avancées, où elle est colocalisée avec les macrophages et les adduits 4-HNE. De plus, les immunoprécipités de PDI à partir des plaques d'endartérectomie

IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES

montrent une forte modification *in vivo* de cette chaperone par le 4-HNE. Ces résultats indiquent que l'expression et la modification de PDI sont très augmentées dans les plaques avancées, ce qui suggère que PDI n'est pas fonctionnelle (au vu de son inhibition enzymatique par le 4-HNE), ce qui donc pourrait contribuer aux phénomènes d'apoptose et de fragilisation des plaques avancées. Nous étudierons l'effet de NAC et d'autres carbonyl scavengers (hydralazine) sur l'expression, la modification et l'activité enzymatique de PDI chez des souris apoE^{-/-}, afin de voir si un traitement par des agents permettant la neutralisation des adduits maintient PDI fonctionnelle *in situ*.

Enfin, l'effet protecteur des HDL qui inhibe le stress oxydant et bloque l'accumulation d'adduits sur les protéines cellulaires (Robbesyn et al., 2003), sera étudié sur l'expression, la modification et l'activité enzymatique de PDI dans les cellules vasculaires et les macrophages.

V-BIBLIOGRAPHIE

- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., and Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271, 518-520.
- Adachi, Y., Yamamoto, K., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2008). ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell Struct Funct* 33, 75-89.
- Adams, J.M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17, 2481-2495.
- Adams, J.M., and Cory, S. (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26, 61-66.
- Akar, U., Chaves-Reyez, A., Barria, M., Tari, A., Sanguino, A., Kondo, Y., Kondo, S., Arun, B., Lopez-Berestein, G., and Ozpolat, B. (2008). Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy* 4, 669-679.
- Aleshin, A.N., Sawa, Y., Kitagawa-Sakakida, S., Bando, Y., Ono, M., Memon, I.A., Tohyama, M., Ogawa, S., and Matsuda, H. (2005). 150-kDa oxygen-regulated protein attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 38, 517-525.
- Appenzeller-Herzog, C., and Ellgaard, L. (2008). The human PDI family: versatility packed into a single fold. *Biochim Biophys Acta* 1783, 535-548.
- Ares, M.P., Porn-Ares, M.I., Moses, S., Thyberg, J., Juntti-Berggren, L., Berggren, P., Hultgardh-Nilsson, A., Kallin, B., and Nilsson, J. (2000). 7beta-hydroxycholesterol induces Ca(2+) oscillations, MAP kinase activation and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 153, 23-35.
- Ares, M.P., Porn-Ares, M.I., Thyberg, J., Juntti-Berggren, L., Berggren, P.O., Diczfalusy, U., Kallin, B., Bjorkhem, I., Orrenius, S., and Nilsson, J. (1997). Ca²⁺ channel blockers verapamil and nifedipine inhibit apoptosis induced by 25-hydroxycholesterol in human aortic smooth muscle cells. *J Lipid Res* 38, 2049-2061.
- Argraves, K.M., Gazzolo, P.J., Groh, E.M., Wilkerson, B.A., Matsuura, B.S., Twal, W.O., Hammad, S.M., and Argraves, W.S. (2008). High density lipoprotein-associated sphingosine 1-phosphate promotes endothelial barrier function. *J Biol Chem* 283, 25074-25081.
- Ashby, D.T., Rye, K.A., Clay, M.A., Vadas, M.A., Gamble, J.R., and Barter, P.J. (1998). Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1450-1455.
- Auge, N., Escargueil-Blanc, I., Lajoie-Mazenc, I., Suc, I., Andrieu-Abadie, N., Pieraggi, M.T., Chatelut, M., Thiers, J.C., Jaffrezou, J.P., Laurent, G., *et al.* (1998). Potential role for ceramide in mitogen-activated protein kinase activation and proliferation of vascular smooth muscle cells induced by oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 273, 12893-12900.
- Auge, N., Garcia, V., Maupas-Schwalm, F., Levade, T., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (2002). Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1990-1995.

- Aviram, M., and Brook, J.G. (1983). Platelet interaction with high and low density lipoproteins. *Atherosclerosis* 46, 259-268.
- Aviram, M., and Rosenblat, M. (2004). Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med* 37, 1304-1316.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 182, 685-701.
- Azumi, H., Inoue, N., Ohashi, Y., Terashima, M., Mori, T., Fujita, H., Awano, K., Kobayashi, K., Maeda, K., Hata, K., *et al.* (2002). Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1838-1844.
- Bando, Y., Katayama, T., Aleshin, A.N., Manabe, T., and Tohyama, M. (2004a). GRP94 reduces cell death in SH-SY5Y cells perturbed calcium homeostasis. *Apoptosis* 9, 501-508.
- Bando, Y., Tsukamoto, Y., Katayama, T., Ozawa, K., Kitao, Y., Hori, O., Stern, D.M., Yamauchi, A., and Ogawa, S. (2004b). ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *Faseb J* 18, 1401-1403.
- Barry-Lane, P.A., Patterson, C., van der Merwe, M., Hu, Z., Holland, S.M., Yeh, E.T., and Runge, M.S. (2001). p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *J Clin Invest* 108, 1513-1522.
- Baumann, O., and Walz, B. (2001). Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int Rev Cytol* 205, 149-214.
- Benavides, A., Pastor, D., Santos, P., Tranque, P., and Calvo, S. (2005). CHOP plays a pivotal role in the astrocyte death induced by oxygen and glucose deprivation. *Glia* 52, 261-275.
- Berliner, J.A., and Watson, A.D. (2005). A role for oxidized phospholipids in atherosclerosis. *N Engl J Med* 353, 9-11.
- Berthier, A., Lemaire-Ewing, S., Prunet, C., Monier, S., Athias, A., Bessede, G., Pais de Barros, J.P., Laubriet, A., Gambert, P., Lizard, G., *et al.* (2004). Involvement of a calcium-dependent dephosphorylation of BAD associated with the localization of Trpc-1 within lipid rafts in 7-ketocholesterol-induced THP-1 cell apoptosis. *Cell Death Differ* 11, 897-905.
- Berthier, A., Lemaire-Ewing, S., Prunet, C., Montange, T., Vejux, A., Pais de Barros, J.P., Monier, S., Gambert, P., Lizard, G., and Neel, D. (2005). 7-Ketocholesterol-induced apoptosis. Involvement of several pro-apoptotic but also anti-apoptotic calcium-dependent transduction pathways. *FEBS J* 272, 3093-3104.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2, 326-332.
- Bialik, S., and Kimchi, A. (2010). Lethal weapons: DAP-kinase, autophagy and cell death: DAP-kinase regulates autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 22, 199-205.
- Bisoendial, R.J., Hovingh, G.K., Levels, J.H., Lerch, P.G., Andresen, I., Hayden, M.R., Kastelein, J.J., and Stroes, E.S. (2003). Restoration of endothelial function by increasing

- high-density lipoprotein in subjects with isolated low high-density lipoprotein. *Circulation* 107, 2944-2948.
- Blair, A., Shaul, P.W., Yuhanna, I.S., Conrad, P.A., and Smart, E.J. (1999). Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *J Biol Chem* 274, 32512-32519.
- Blommaart, E.F., Krause, U., Schellens, J.P., Vreeling-Sindelarova, H., and Meijer, A.J. (1997). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* 243, 240-246.
- Boisvert, W.A., Santiago, R., Curtiss, L.K., and Terkeltaub, R.A. (1998). A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 101, 353-363.
- Bolibar, I., von Eckardstein, A., Assmann, G., and Thompson, S. (2000). Short-term prognostic value of lipid measurements in patients with angina pectoris. The ECAT Angina Pectoris Study Group: European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Thromb Haemost* 84, 955-960.
- Bommiasamy, H., Back, S.H., Fagone, P., Lee, K., Meshinchi, S., Vink, E., Sriburi, R., Frank, M., Jackowski, S., Kaufman, R.J., *et al.* (2009). ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 122, 1626-1636.
- Bonelli, F.S., and Jonas, A. (1989). Reaction of lecithin cholesterol acyltransferase with water-soluble substrates. *J Biol Chem* 264, 14723-14728.
- Boren, J., Olin, K., Lee, I., Chait, A., Wight, T.N., and Innerarity, T.L. (1998). Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest* 101, 2658-2664.
- Bowry, V.W., Stanley, K.K., and Stocker, R. (1992). High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10316-10320.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R.A., Casares, N., Perfettini, J.L., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., *et al.* (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 25, 1025-1040.
- Boyce, M., Py, B.F., Ryazanov, A.G., Minden, J.S., Long, K., Ma, D., and Yuan, J. (2008). A pharmacoproteomic approach implicates eukaryotic elongation factor 2 kinase in ER stress-induced cell death. *Cell Death Differ* 15, 589-599.
- Boyd, H.C., Gown, A.M., Wolfbauer, G., and Chait, A. (1989). Direct evidence for a protein recognized by a monoclonal antibody against oxidatively modified LDL in atherosclerotic lesions from a Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol* 135, 815-825.
- Brito, P.M., Devillard, R., Negre-Salvayre, A., Almeida, L.M., Dinis, T.C., Salvayre, R., and Auge, N. (2009). Resveratrol inhibits the mTOR mitogenic signaling evoked by oxidized LDL in smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 205, 126-134.
- Brown, A.J., Dean, R.T., and Jessup, W. (1996). Free and esterified oxysterol: formation during copper-oxidation of low density lipoprotein and uptake by macrophages. *J Lipid Res* 37, 320-335.
- Brown, A.J., and Jessup, W. (1999). Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 142, 1-28.

- Brown, A.J., Leong, S.L., Dean, R.T., and Jessup, W. (1997). 7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque. *J Lipid Res* 38, 1730-1745.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1986). A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232, 34-47.
- Bui, M.N., Sack, M.N., Moutsatsos, G., Lu, D.Y., Katz, P., McCown, R., Breall, J.A., and Rackley, C.E. (1996). Autoantibody titers to oxidized low-density lipoprotein in patients with coronary atherosclerosis. *Am Heart J* 131, 663-667.
- Burdakov, D., Petersen, O.H., and Verkhatsky, A. (2005). Intraluminal calcium as a primary regulator of endoplasmic reticulum function. *Cell Calcium* 38, 303-310.
- Cancel, L.M., and Tarbell, J.M. (2010). The role of apoptosis in LDL transport through cultured endothelial cell monolayers. *Atherosclerosis* 208, 335-341.
- Carbone, D.L., Doorn, J.A., Kiebler, Z., and Petersen, D.R. (2005). Cysteine modification by lipid peroxidation products inhibits protein disulfide isomerase. *Chem Res Toxicol* 18, 1324-1331.
- Castle, C.K., Pape, M.E., Marotti, K.R., and Melchior, G.W. (1991). Secretion of pre-beta-migrating apoA-I by cynomolgus monkey hepatocytes in culture. *J Lipid Res* 32, 439-447.
- Castro, G.R., and Fielding, C.J. (1988). Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry* 27, 25-29.
- Cazanave, S.C., Elmi, N.A., Akazawa, Y., Bronk, S.F., Mott, J.L., and Gores, G.J. (2010). CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299, G236-243.
- Cechowska-Pasko, M., Palka, J., and Bankowski, E. (2007). Glucose-depleted medium reduces the collagen content of human skin fibroblast cultures. *Mol Cell Biochem* 305, 79-85.
- Chang, M.K., Bergmark, C., Laurila, A., Horkko, S., Han, K.H., Friedman, P., Dennis, E.A., and Witztum, J.L. (1999). Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6353-6358.
- Chen, L.Y., and Mehta, J.L. (1994). Inhibitory effect of high-density lipoprotein on platelet function is mediated by increase in nitric oxide synthase activity in platelets. *Life Sci* 55, 1815-1821.
- Chen, W., Sun, Y., Welch, C., Gorelik, A., Leventhal, A.R., Tabas, I., and Tall, A.R. (2001). Preferential ATP-binding cassette transporter A1-mediated cholesterol efflux from late endosomes/lysosomes. *J Biol Chem* 276, 43564-43569.
- Chen, X., Shen, J., and Prywes, R. (2002). The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem* 277, 13045-13052.
- Cheng, C., Tempel, D., van Haperen, R., van der Baan, A., Grosveld, F., Daemen, M.J., Krams, R., and de Crom, R. (2006). Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. *Circulation* 113, 2744-2753.

- Cheng, D., Chang, C.C., Qu, X., and Chang, T.Y. (1995). Activation of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase by cholesterol or by oxysterol in a cell-free system. *J Biol Chem* *270*, 685-695.
- Christison, J.K., Rye, K.A., and Stocker, R. (1995). Exchange of oxidized cholesteryl linoleate between LDL and HDL mediated by cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* *36*, 2017-2026.
- Civelek, M., Manduchi, E., Riley, R.J., Stoeckert, C.J., Jr., and Davies, P.F. (2009). Chronic endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response in arterial endothelium in regions of susceptibility to atherosclerosis. *Circ Res* *105*, 453-461.
- Clarke, M.C., Figg, N., Maguire, J.J., Davenport, A.P., Goddard, M., Littlewood, T.D., and Bennett, M.R. (2006). Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med* *12*, 1075-1080.
- Clarke, M.C., Littlewood, T.D., Figg, N., Maguire, J.J., Davenport, A.P., Goddard, M., and Bennett, M.R. (2008). Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circ Res* *102*, 1529-1538.
- Cockerill, G.W., Huehns, T.Y., Weerasinghe, A., Stocker, C., Lerch, P.G., Miller, N.E., and Haskard, D.O. (2001). Elevation of plasma high-density lipoprotein concentration reduces interleukin-1-induced expression of E-selectin in an in vivo model of acute inflammation. *Circulation* *103*, 108-112.
- Cockerill, G.W., Saklatvala, J., Ridley, S.H., Yarwood, H., Miller, N.E., Oral, B., Nithyanathan, S., Taylor, G., and Haskard, D.O. (1999). High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *19*, 910-917.
- Criollo, A., Maiuri, M.C., Tasdemir, E., Vitale, I., Fiebig, A.A., Andrews, D., Molgo, J., Diaz, J., Lavandro, S., Harper, F., *et al.* (2007). Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell Death Differ* *14*, 1029-1039.
- Cucina, A., Scavo, M.P., Muzzioli, L., Coluccia, P., Ceccarini, S., Fuso, A., and Cavallaro, A. (2006). High density lipoproteins downregulate basic fibroblast growth factor production and release in minimally oxidated-LDL treated smooth muscle cells. *Atherosclerosis* *189*, 303-309.
- Curtiss, L.K., and Boisvert, W.A. (2000). Apolipoprotein E and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* *11*, 243-251.
- Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J., and Fogelman, A.M. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 5134-5138.
- Czarnecka, H., and Yokoyama, S. (1996). Regulation of cellular cholesterol efflux by lecithin:cholesterol acyltransferase reaction through nonspecific lipid exchange. *J Biol Chem* *271*, 2023-2028.
- Dai, G., Kaazempur-Mofrad, M.R., Natarajan, S., Zhang, Y., Vaughn, S., Blackman, B.R., Kamm, R.D., Garcia-Cardena, G., and Gimbrone, M.A., Jr. (2004). Distinct endothelial phenotypes evoked by arterial waveforms derived from atherosclerosis-susceptible and -resistant regions of human vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 14871-14876.

- Danielsen, E.M., Hansen, G.H., and Poulsen, M.D. (1993). Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes. *J Cell Biol* 120, 1347-1356.
- de Backer, G., de Bacquer, D., and Kornitzer, M. (1998). Epidemiological aspects of high density lipoprotein cholesterol. *Atherosclerosis* 137 Suppl, S1-6.
- De Caterina, R., Libby, P., Peng, H.B., Thannickal, V.J., Rajavashisth, T.B., Gimbrone, M.A., Jr., Shin, W.S., and Liao, J.K. (1995). Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 96, 60-68.
- de Souza, J.A., Vindis, C., Hansel, B., Negre-Salvayre, A., Therond, P., Serrano, C.V., Jr., Chantepie, S., Salvayre, R., Bruckert, E., Chapman, M.J., *et al.* (2008). Metabolic syndrome features small, apolipoprotein A-I-poor, triglyceride-rich HDL3 particles with defective anti-apoptotic activity. *Atherosclerosis* 197, 84-94.
- de Souza, J.A., Vindis, C., Negre-Salvayre, A., Rye, K.A., Couturier, M., Therond, P., Chantepie, S., Salvayre, R., Chapman, M.J., and Kontush, A. (2010). Small, dense HDL 3 particles attenuate apoptosis in endothelial cells: pivotal role of apolipoprotein A-I. *J Cell Mol Med* 14, 608-620.
- de Villiers, W.J., Fraser, I.P., Hughes, D.A., Doyle, A.G., and Gordon, S. (1994). Macrophage-colony-stimulating factor selectively enhances macrophage scavenger receptor expression and function. *J Exp Med* 180, 705-709.
- Delepine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Lathrop, G.M., and Julier, C. (2000). EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet* 25, 406-409.
- Despres, J.P., and Marette, A. (1994). Relation of components of insulin resistance syndrome to coronary disease risk. *Curr Opin Lipidol* 5, 274-289.
- Dimayuga, P., Zhu, J., Oguchi, S., Chyu, K.Y., Xu, X.O., Yano, J., Shah, P.K., Nilsson, J., and Cercek, B. (1999). Reconstituted HDL containing human apolipoprotein A-1 reduces VCAM-1 expression and neointima formation following periaortic cuff-induced carotid injury in apoE null mice. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 465-468.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Galle, J., and Zeiher, A.M. (1997). Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* 95, 1760-1763.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., and Zeiher, A.M. (2002). Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis. *Curr Opin Lipidol* 13, 531-536.
- Doran, A.C., Meller, N., and McNamara, C.A. (2008). Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, 812-819.
- Dudek, J., Benedix, J., Cappel, S., Greiner, M., Jalal, C., Muller, L., and Zimmermann, R. (2009). Functions and pathologies of BiP and its interaction partners. *Cell Mol Life Sci* 66, 1556-1569.
- Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U., and Kimchi, A. (2009). Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. *Cell Death Differ* 16, 966-975.
- Endo, M. (2009). Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol Rev* 89, 1153-1176.

- Erbay, E., Babaev, V.R., Mayers, J.R., Makowski, L., Charles, K.N., Snitow, M.E., Fazio, S., Wiest, M.M., Watkins, S.M., Linton, M.F., *et al.* (2009). Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat Med* *15*, 1383-1391.
- Eriksson, E.E., Werr, J., Guo, Y., Thoren, P., and Lindbom, L. (2000). Direct observations in vivo on the role of endothelial selectins and alpha(4) integrin in cytokine-induced leukocyte-endothelium interactions in the mouse aorta. *Circ Res* *86*, 526-533.
- Escargueil-Blanc, I., Meilhac, O., Pieraggi, M.T., Arnal, J.F., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (1997). Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurintricarboxylic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *17*, 331-339.
- Escargueil-Blanc, I., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (1994). Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *Faseb J* *8*, 1075-1080.
- Fader, C.M., Sanchez, D.G., Mestre, M.B., and Colombo, M.I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim Biophys Acta* *1793*, 1901-1916.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* *148*, 2207-2216.
- Farb, A., Burke, A.P., Tang, A.L., Liang, T.Y., Mannan, P., Smialek, J., and Virmani, R. (1996). Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation* *93*, 1354-1363.
- Fawcett, T.W., Martindale, J.L., Guyton, K.Z., Hai, T., and Holbrook, N.J. (1999). Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem J* *339* (Pt 1), 135-141.
- Feaver, R.E., Hastings, N.E., Pryor, A., and Blackman, B.R. (2008). GRP78 upregulation by atheroprone shear stress via p38-, alpha2beta1-dependent mechanism in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *28*, 1534-1541.
- Febbraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K., and Silverstein, R.L. (2000). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* *105*, 1049-1056.
- Feng, B., Yao, P.M., Li, Y., Devlin, C.M., Zhang, D., Harding, H.P., Sweeney, M., Rong, J.X., Kuriakose, G., Fisher, E.A., *et al.* (2003). The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol* *5*, 781-792.
- Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T.W., Kelly, R.A., and Michel, T. (1996). Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J Biol Chem* *271*, 22810-22814.
- Feron, O., Dessy, C., Moniotte, S., Desager, J.P., and Balligand, J.L. (1999). Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* *103*, 897-905.
- Fluiter, K., Vietsch, H., Biessen, E.A., Kostner, G.M., van Berkel, T.J., and Sattler, W. (1996). Increased selective uptake in vivo and in vitro of oxidized cholesteryl esters from high-density lipoprotein by rat liver parenchymal cells. *Biochem J* *319* (Pt 2), 471-476.

- Folcik, V.A., Nivar-Aristy, R.A., Krajewski, L.P., and Cathcart, M.K. (1995). Lipoxygenase contributes to the oxidation of lipids in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 96, 504-510.
- Forte, T.M., Oda, M.N., Knoff, L., Frei, B., Suh, J., Harmony, J.A., Stuart, W.D., Rubin, E.M., and Ng, D.S. (1999). Targeted disruption of the murine lecithin:cholesterol acyltransferase gene is associated with reductions in plasma paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase activities but not in apolipoprotein J concentration. *J Lipid Res* 40, 1276-1283.
- Francis, G.A., Knopp, R.H., and Oram, J.F. (1995). Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J Clin Invest* 96, 78-87.
- Frand, A.R., Cuozzo, J.W., and Kaiser, C.A. (2000). Pathways for protein disulphide bond formation. *Trends Cell Biol* 10, 203-210.
- Fredrickson, D.S. (1971). An international classification of hyperlipidemias and hyperlipoproteinemias. *Ann Intern Med* 75, 471-472.
- Fujita, E., Kouroku, Y., Isoai, A., Kumagai, H., Misutani, A., Matsuda, C., Hayashi, Y.K., and Momoi, T. (2007). Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II). *Hum Mol Genet* 16, 618-629.
- Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Lark, M.W., and Libby, P. (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94, 2493-2503.
- Gargalovic, P.S., Gharavi, N.M., Clark, M.J., Pagnon, J., Yang, W.P., He, A., Truong, A., Baruch-Oren, T., Berliner, J.A., Kirchgessner, T.G., *et al.* (2006a). The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2490-2496.
- Gargalovic, P.S., Imura, M., Zhang, B., Gharavi, N.M., Clark, M.J., Pagnon, J., Yang, W.P., He, A., Truong, A., Patel, S., *et al.* (2006b). Identification of inflammatory gene modules based on variations of human endothelial cell responses to oxidized lipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12741-12746.
- Gautier T., Masson D., Lagrost L., *Métabolisme des lipides et des lipoprotéines chez l'homme*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Endocrinologie-Nutrition, 10-368-A-10, 2010.
- Genest, J.J., McNamara, J.R., Salem, D.N., and Schaefer, E.J. (1991). Prevalence of risk factors in men with premature coronary artery disease. *Am J Cardiol* 67, 1185-1189.
- Ginsberg, H.N. (1998). Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am* 27, 503-519.
- Gofman, J.W., Lindgren, F.T., and Elliott, H. (1949). Ultracentrifugal studies of lipoproteins of human serum. *J Biol Chem* 179, 973-979.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1974). Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 249, 5153-5162.
- Goldstein, J.L., and Brown, M.S. (1977). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 46, 897-930.

- Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., and Brown, M.S. (1979). Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 333-337.
- Gonzalez-Polo, R.A., Boya, P., Pauleau, A.L., Jalil, A., Larochette, N., Souquere, S., Eskelinen, E.L., Pierron, G., Saftig, P., and Kroemer, G. (2005). The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* *118*, 3091-3102.
- Gora, S., Maouche, S., Atout, R., Wanherdrick, K., Lambeau, G., Cambien, F., Ninio, E., and Karabina, S.A. (2010). Phospholipolyzed LDL induces an inflammatory response in endothelial cells through endoplasmic reticulum stress signaling. *Faseb J* *24*, 3284-3297.
- Gordon, D.J., and Rifkind, B.M. (1989). High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* *321*, 1311-1316.
- Gordon, T., Castelli, W.P., Hjortland, M.C., Kannel, W.B., and Dawber, T.R. (1977). High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* *62*, 707-714.
- Gorelick, P.B. (2008). Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of stroke. *Am J Cardiol* *101*, 34F-40F.
- Gotoh, T., Oyadomari, S., Mori, K., and Mori, M. (2002). Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. *J Biol Chem* *277*, 12343-12350.
- Gotoh, T., Terada, K., Oyadomari, S., and Mori, M. (2004). hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death Differ* *11*, 390-402.
- Gotto, A.M., Jr., and Grundy, S.M. (1999). Lowering LDL cholesterol: questions from recent meta-analyses and subset analyses of clinical trial DataIssues from the Interdisciplinary Council on Reducing the Risk for Coronary Heart Disease, ninth Council meeting. *Circulation* *99*, E1-7.
- Goyal, J., Wang, K., Liu, M., and Subbaiah, P.V. (1997). Novel function of lecithin-cholesterol acyltransferase. Hydrolysis of oxidized polar phospholipids generated during lipoprotein oxidation. *J Biol Chem* *272*, 16231-16239.
- Gozuacik, D., Bialik, S., Raveh, T., Mitou, G., Shohat, G., Sabanay, H., Mizushima, N., Yoshimori, T., and Kimchi, A. (2008). DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell Death Differ* *15*, 1875-1886.
- Gu, L., Okada, Y., Clinton, S.K., Gerard, C., Sukhova, G.K., Libby, P., and Rollins, B.J. (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* *2*, 275-281.
- Gueraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P.M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W., and Uchida, K. (2010). Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* *44*, 1098-1124.
- Hamilton, S.L., and Serysheva, II (2009). Ryanodine receptor structure: progress and challenges. *J Biol Chem* *284*, 4047-4051.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., *et al.* (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* *441*, 885-889.

- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. (2000a). Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell* 6, 1099-1108.
- Harding, H.P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D.D., and Ron, D. (2001). Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell* 7, 1153-1163.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., and Ron, D. (2000b). *Perk* is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 5, 897-904.
- Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271-274.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calton, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., *et al.* (2003). An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 11, 619-633.
- Hatahet, F., and Ruddock, L.W. (2009). Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation. *Antioxid Redox Signal* 11, 2807-2850.
- Havel, R.J., Eder, H.A., and Bragdon, J.H. (1955). The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34, 1345-1353.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* 11, 1433-1437.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1999). Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10, 3787-3799.
- He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* 43, 67-93.
- Heacock, C.S., and Sutherland, R.M. (1986). Induction characteristics of oxygen regulated proteins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12, 1287-1290.
- Hermann, C., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (1997). Shear stress inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 3588-3592.
- Hevonoja, T., Pentikainen, M.O., Hyvonen, M.T., Kovanen, P.T., and Ala-Korpela, M. (2000). Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* 1488, 189-210.
- Heydeck, D., Upston, J.M., Viita, H., Yla-Herttuala, S., and Stocker, R. (2001). Oxidation of LDL by rabbit and human 15-lipoxygenase: prevalence of nonenzymatic reactions. *J Lipid Res* 42, 1082-1088.
- Hill, B.G., Haberzettl, P., Ahmed, Y., Srivastava, S., and Bhatnagar, A. (2008). Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* 410, 525-534.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., *et al.* (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* 20, 1981-1991.

- Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., and Swanson, P.E. (2009). Cell death. *N Engl J Med* 361, 1570-1583.
- Hoyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Fehrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., *et al.* (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell* 25, 193-205.
- Hu, B.R., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Liu, C.L. (2000). Protein aggregation after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 20, 3191-3199.
- Huang, J.M., Huang, Z.X., and Zhu, W. (1998). Mechanism of high-density lipoprotein subfractions inhibiting copper-catalyzed oxidation of low-density lipoprotein. *Clin Biochem* 31, 537-543.
- Huang, X., Zhang, Z., Jia, L., Zhao, Y., Zhang, X., and Wu, K. (2010). Endoplasmic reticulum stress contributes to vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *Cancer Lett* 296, 123-131.
- Ingueneau, C., Huynh, U.D., Marcheix, B., Athias, A., Gambert, P., Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., and Vindis, C. (2009). TRPC1 is regulated by caveolin-1 and is involved in oxidized LDL-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *J Cell Mol Med* 13, 1620-1631.
- Innerarity, T.L., and Mahley, R.W. (1978). Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochemistry* 17, 1440-1447.
- Ishigaki, Y., Katagiri, H., Gao, J., Yamada, T., Imai, J., Uno, K., Hasegawa, Y., Kaneko, K., Ogihara, T., Ishihara, H., *et al.* (2008). Impact of plasma oxidized low-density lipoprotein removal on atherosclerosis. *Circulation* 118, 75-83.
- Ishigaki, Y., Oka, Y., and Katagiri, H. (2009). Circulating oxidized LDL: a biomarker and a pathogenic factor. *Curr Opin Lipidol* 20, 363-369.
- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., and Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* 19, 5360-5372.
- Iwawaki, T., Hosoda, A., Okuda, T., Kamigori, Y., Nomura-Furuwatari, C., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K. (2001). Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat Cell Biol* 3, 158-164.
- Jawien, A., Bowen-Pope, D.F., Lindner, V., Schwartz, S.M., and Clowes, A.W. (1992). Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* 89, 507-511.
- Jessup, W., Jurgens, G., Lang, J., Esterbauer, H., and Dean, R.T. (1986). Interaction of 4-hydroxynonenal-modified low-density lipoproteins with the fibroblast apolipoprotein B/E receptor. *Biochem J* 234, 245-248.
- Jia, G., Cheng, G., Gangahar, D.M., and Agrawal, D.K. (2006). Insulin-like growth factor-1 and TNF-alpha regulate autophagy through c-jun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells. *Immunol Cell Biol* 84, 448-454.
- Jiang, H.Y., Wek, S.A., McGrath, B.C., Lu, D., Hai, T., Harding, H.P., Wang, X., Ron, D., Cavener, D.R., and Wek, R.C. (2004). Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol* 24, 1365-1377.

- Jonas, A. (2000). Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1529, 245-256.
- Joza, N., Pospisilik, J.A., Hangen, E., Hanada, T., Modjtahedi, N., Penninger, J.M., and Kroemer, G. (2009). AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann N Y Acad Sci* 1171, 2-11.
- Juhasz, G., and Neufeld, T.P. (2006). Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source. *PLoS Biol* 4, e36.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19, 5720-5728.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 117, 2805-2812.
- Karabina, S.A., Brocheriou, I., Le Naour, G., Agrapart, M., Durand, H., Gelb, M., Lambeau, G., and Ninio, E. (2006). Atherogenic properties of LDL particles modified by human group X secreted phospholipase A2 on human endothelial cell function. *Faseb J* 20, 2547-2549.
- Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Morimoto, M., Hayashida, K., Hashimoto, N., and Kita, T. (2001). Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 955-960.
- Kaufman, R.J. (2002). Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 110, 1389-1398.
- Kedi, X., Ming, Y., Yongping, W., Yi, Y., and Xiaoxiang, Z. (2009). Free cholesterol overloading induced smooth muscle cells death and activated both ER- and mitochondrial-dependent death pathway. *Atherosclerosis* 207, 123-130.
- Khan, B.V., Parthasarathy, S.S., Alexander, R.W., and Medford, R.M. (1995). Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 95, 1262-1270.
- Kiffin, R., Bandyopadhyay, U., and Cuervo, A.M. (2006). Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 8, 152-162.
- Kim, I., Xu, W., and Reed, J.C. (2008). Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 7, 1013-1030.
- Kim, W.J., Cheresnev, I., Gazdoui, M., Fallon, J.T., Rollins, B.J., and Taubman, M.B. (2003). MCP-1 deficiency is associated with reduced intimal hyperplasia after arterial injury. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 936-942.
- Kimura, T., Sato, K., Malchinkhuu, E., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., Murakami, M., and Okajima, F. (2003). High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1283-1288.
- Klee, M., Pallauf, K., Alcalá, S., Fleischer, A., and Pimentel-Muinos, F.X. (2009). Mitochondrial apoptosis induced by BH3-only molecules in the exclusive presence of endoplasmic reticular Bak. *EMBO J* 28, 1757-1768.

- Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Jr., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., *et al.* (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5, 539-545.
- Kockx, M.M., De Meyer, G.R., Muhring, J., Jacob, W., Bult, H., and Herman, A.G. (1998). Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 97, 2307-2315.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., *et al.* (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880-884.
- Korennykh, A.V., Egea, P.F., Korostelev, A.A., Finer-Moore, J., Zhang, C., Shokat, K.M., Stroud, R.M., and Walter, P. (2009). The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature* 457, 687-693.
- Korporaal, S.J., Van Eck, M., Adelmeijer, J., Ijsseldijk, M., Out, R., Lisman, T., Lenting, P.J., Van Berkel, T.J., and Akkerman, J.W. (2007). Platelet activation by oxidized low density lipoprotein is mediated by CD36 and scavenger receptor-A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2476-2483.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., and Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ* 14, 230-239.
- Kroemer, G., and Reed, J.C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-519.
- Kugiyama, K., Kerns, S.A., Morrisett, J.D., Roberts, R., and Henry, P.D. (1990). Impairment of endothelium-dependent arterial relaxation by lysolecithin in modified low-density lipoproteins. *Nature* 344, 160-162.
- Kuivenhoven, J.A., Pritchard, H., Hill, J., Frohlich, J., Assmann, G., and Kastelein, J. (1997). The molecular pathology of lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency syndromes. *J Lipid Res* 38, 191-205.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhisa, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036.
- Kume, N., Cybulsky, M.I., and Gimbrone, M.A., Jr. (1992). Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest* 90, 1138-1144.
- Kume, N., and Gimbrone, M.A., Jr. (1994). Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 93, 907-911.
- Kunitake, S.T., Jarvis, M.R., Hamilton, R.L., and Kane, J.P. (1992). Binding of transition metals by apolipoprotein A-I-containing plasma lipoproteins: inhibition of oxidation of low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6993-6997.
- Kuwabara, K., Matsumoto, M., Ikeda, J., Hori, O., Ogawa, S., Maeda, Y., Kitagawa, K., Imuta, N., Kinoshita, T., Stern, D.M., *et al.* (1996). Purification and characterization of a novel stress protein, the 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150), from cultured rat astrocytes and its expression in ischemic mouse brain. *J Biol Chem* 271, 5025-5032.
- Lagrost, L., Desrumaux, C., Masson, D., Deckert, V., and Gambert, P. (1998). Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 9, 203-209.

- Lagrost, L., Masson, D., and Chapman, J. (2004). Lipoprotéines et métabolisme lipidique. L'athérosclérose : Physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques, 59-77.
- Lamarche, B., St-Pierre, A.C., Ruel, I.L., Cantin, B., Dagenais, G.R., and Despres, J.P. (2001). A prospective, population-based study of low density lipoprotein particle size as a risk factor for ischemic heart disease in men. *Can J Cardiol* 17, 859-865.
- Lassegue, B., and Griendling, K.K. (2010). NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 653-661.
- Laver, D.R. (2009). Luminal Ca(2+) activation of cardiac ryanodine receptors by luminal and cytoplasmic domains. *Eur Biophys J* 39, 19-26.
- Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., and Glimcher, L.H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 23, 7448-7459.
- Lee, J.A., Beigneux, A., Ahmad, S.T., Young, S.G., and Gao, F.B. (2007). ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol* 17, 1561-1567.
- Lee, J.F., Zeng, Q., Ozaki, H., Wang, L., Hand, A.R., Hla, T., Wang, E., and Lee, M.J. (2006). Dual roles of tight junction-associated protein, zonula occludens-1, in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial chemotaxis and barrier integrity. *J Biol Chem* 281, 29190-29200.
- Lee, K., Tirasophon, W., Shen, X., Michalak, M., Prywes, R., Okada, T., Yoshida, H., Mori, K., and Kaufman, R.J. (2002). IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev* 16, 452-466.
- Lee, R.T., and Libby, P. (1997). The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 1859-1867.
- Lee, T., and Chau, L. (2001). Fas/Fas ligand-mediated death pathway is involved in oxLDL-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C709-718.
- Lemaire, S., Lizard, G., Monier, S., Miguet, C., Gueldry, S., Volot, F., Gambert, P., and Neel, D. (1998). Different patterns of IL-1beta secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7alpha-, 7beta-hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol. *FEBS Lett* 440, 434-439.
- Leonarduzzi, G., Gamba, P., Gargiulo, S., Sottero, B., Kadl, A., Biasi, F., Chiarpotto, E., Leitinger, N., Vendemiale, G., Serviddio, G., *et al.* (2008). Oxidation as a crucial reaction for cholesterol to induce tissue degeneration: CD36 overexpression in human promonocytic cells treated with a biologically relevant oxysterol mixture. *Aging Cell* 7, 375-382.
- Lerman, A., and McConnell, J.P. (2008). Lipoprotein-associated phospholipase A2: a risk marker or a risk factor? *Am J Cardiol* 101, 11F-22F.
- Leroyer, A.S., Anfosso, F., Lacroix, R., Sabatier, F., Simoncini, S., Njock, S.M., Jourde, N., Brunet, P., Camoin-Jau, L., Sampol, J., *et al.* (2010). Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 104, 456-463.
- Levine, B., and Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 115, 2679-2688.

- Li, D., Yang, B., and Mehta, J.L. (1998). Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *Am J Physiol* 275, H568-576.
- Li, H., Korennykh, A.V., Behrman, S.L., and Walter, P. (2010). Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16113-16118.
- Liang, C., Lee, J.S., Inn, K.S., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., *et al.* (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 10, 776-787.
- Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874.
- Libby, P., Geng, Y.J., Aikawa, M., Schoenbeck, U., Mach, F., Clinton, S.K., Sukhova, G.K., and Lee, R.T. (1996). Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol* 7, 330-335.
- Little, E., Tocco, G., Baudry, M., Lee, A.S., and Schreiber, S.S. (1996). Induction of glucose-regulated protein (glucose-regulated protein 78/BiP and glucose-regulated protein 94) and heat shock protein 70 transcripts in the immature rat brain following status epilepticus. *Neuroscience* 75, 209-219.
- Liu, X.W., Su, Y., Zhu, H., Cao, J., Ding, W.J., Zhao, Y.C., He, Q.J., and Yang, B. (2010). HIF-1 α -dependent autophagy protects HeLa cells from fenretinide (4-HPR)-induced apoptosis in hypoxia. *Pharmacol Res* 62, 416-425.
- Liu, Y., Adachi, M., Zhao, S., Hareyama, M., Koong, A.C., Luo, D., Rando, T.A., Imai, K., and Shinomura, Y. (2009). Preventing oxidative stress: a new role for XBP1. *Cell Death Differ* 16, 847-857.
- Loree, H.M., Tobias, B.J., Gibson, L.J., Kamm, R.D., Small, D.M., and Lee, R.T. (1994). Mechanical properties of model atherosclerotic lesion lipid pools. *Arterioscler Thromb* 14, 230-234.
- Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120, 237-248.
- Lund, E., Bjorkhem, I., Furster, C., and Wikvall, K. (1993). 24-, 25- and 27-hydroxylation of cholesterol by a purified preparation of 27-hydroxylase from pig liver. *Biochim Biophys Acta* 1166, 177-182.
- Luo, Y., and Tall, A.R. (2000). Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J Clin Invest* 105, 513-520.
- Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241.
- Ma, K., Vattam, K.M., and Wek, R.C. (2002). Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 277, 18728-18735.
- Ma, Y., and Hendershot, L.M. (2003). Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* 278, 34864-34873.
- Maas, R., Schwedhelm, E., Kahl, L., Li, H., Benndorf, R., Luneburg, N., Forstermann, U., and Boger, R.H. (2008). Simultaneous assessment of endothelial function, nitric oxide synthase

- activity, nitric oxide-mediated signaling, and oxidative stress in individuals with and without hypercholesterolemia. *Clin Chem* 54, 292-300.
- Macer, D.R., and Koch, G.L. (1988). Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 91 (Pt 1), 61-70.
- Mackness, B., Durrington, P.N., and Mackness, M.I. (2002). The paraoxonase gene family and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 13, 357-362.
- MacPhee, C.H., Moores, K.E., Boyd, H.F., Dhanak, D., Ife, R.J., Leach, C.A., Leake, D.S., Milliner, K.J., Patterson, R.A., Suckling, K.E., *et al.* (1999). Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J* 338 (Pt 2), 479-487.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 741-752.
- Mallat, Z., Benamer, H., Hugel, B., Benessiano, J., Steg, P.G., Freyssinet, J.M., and Tedgui, A. (2000). Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 101, 841-843.
- Mallat, Z., Nakamura, T., Ohan, J., Leseche, G., Tedgui, A., Maclouf, J., and Murphy, R.C. (1999). The relationship of hydroxyeicosatetraenoic acids and F2-isoprostanes to plaque instability in human carotid atherosclerosis. *J Clin Invest* 103, 421-427.
- Martinet, W., De Bie, M., Schrijvers, D.M., De Meyer, G.R., Herman, A.G., and Kockx, M.M. (2004). 7-ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 2296-2301.
- Martinet, W., and De Meyer, G.R. (2009). Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential. *Circ Res* 104, 304-317.
- Martinet, W., Schrijvers, D.M., Timmermans, J.P., and Bult, H. (2008). Interactions between cell death induced by statins and 7-ketocholesterol in rabbit aorta smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 154, 1236-1246.
- Martinez, J.A., Zhang, Z., Svetlov, S.I., Hayes, R.L., Wang, K.K., and Larner, S.F. (2010). Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells. *Apoptosis* 15, 1480-1493.
- Mason, D.P., Kenagy, R.D., Hasenstab, D., Bowen-Pope, D.F., Seifert, R.A., Coats, S., Hawkins, S.M., and Clowes, A.W. (1999). Matrix metalloproteinase-9 overexpression enhances vascular smooth muscle cell migration and alters remodeling in the injured rat carotid artery. *Circ Res* 85, 1179-1185.
- Matsuzaki, S., Hiratsuka, T., Kuwahara, R., Katayama, T., and Tohyama, M. (2010). Caspase-4 is partially cleaved by calpain via the impairment of Ca²⁺ homeostasis under the ER stress. *Neurochem Int* 56, 352-356.
- Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Takeda, K., and Ichijo, H. (2002). Physiological roles of ASK1-mediated signal transduction in oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: advanced findings from ASK1 knockout mice. *Antioxid Redox Signal* 4, 415-425.

- Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62, 670-684.
- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y., and Holbrook, N.J. (2001). Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* 21, 1249-1259.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H., and Peter, M.E. (1997). FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 16, 2794-2804.
- Meilhac, O., Escargueil-Blanc, I., Thiers, J.C., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (1999). Bcl-2 alters the balance between apoptosis and necrosis, but does not prevent cell death induced by oxidized low density lipoproteins. *Faseb J* 13, 485-494.
- Melnick, J., Dul, J.L., and Argon, Y. (1994). Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 370, 373-375.
- Mercer, C.A., Kaliappan, A., and Dennis, P.B. (2009). A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* 5, 649-662.
- Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L.I., and Opas, M. (2009). Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 417, 651-666.
- Michalak, M., Robert Parker, J.M., and Opas, M. (2002). Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 32, 269-278.
- Michel, J.B., Virmani, R., Arbustini, E., and Pasterkamp, G. (2011). Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *Eur Heart J*.
- Mikoshiha, K. (2007). IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem* 102, 1426-1446.
- Miller, Y.I., Viriyakosol, S., Binder, C.J., Feramisco, J.R., Kirkland, T.N., and Witztum, J.L. (2003). Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem* 278, 1561-1568.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 116, 1679-1688.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395-398.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhsa, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152, 657-668.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15, 1101-1111.

- Moestrup, S.K., and Kozyraki, R. (2000). Cubilin, a high-density lipoprotein receptor. *Curr Opin Lipidol* 11, 133-140.
- Moore, K.J., and Freeman, M.W. (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1702-1711.
- Morice, M.C., Serruys, P.W., Sousa, J.E., Fajadet, J., Ban Hayashi, E., Perin, M., Colombo, A., Schuler, G., Barragan, P., Guagliumi, G., *et al.* (2002). A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 346, 1773-1780.
- Morton, R.E. (1999). Cholesteryl ester transfer protein and its plasma regulator: lipid transfer inhibitor protein. *Curr Opin Lipidol* 10, 321-327.
- Muller, C., Salvayre, R., Negre-Salvayre, A., and Vindis, C. (2011). HDLs inhibit endoplasmic reticulum stress and autophagic response induced by oxidized LDLs. *Cell Death Differ* 18, 817-828.
- Mungrue, I.N., Pagnon, J., Kohanim, O., Gargalovic, P.S., and Lusis, A.J. (2009). CHAC1/MGC4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the ATF4-ATF3-CHOP cascade. *J Immunol* 182, 466-476.
- Musliner, T.A., Long, M.D., Forte, T.M., Nichols, A.V., Gong, E.L., Blanche, P.J., and Krauss, R.M. (1991). Dissociation of high density lipoprotein precursors from apolipoprotein B-containing lipoproteins in the presence of unesterified fatty acids and a source of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 32, 917-933.
- Myoishi, M., Hao, H., Minamino, T., Watanabe, K., Nishihira, K., Hatakeyama, K., Asada, Y., Okada, K., Ishibashi-Ueda, H., Gabbiani, G., *et al.* (2007). Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 116, 1226-1233.
- Na, K.S., Park, B.C., Jang, M., Cho, S., Lee do, H., Kang, S., Lee, C.K., Bae, K.H., and Park, S.G. (2007). Protein disulfide isomerase is cleaved by caspase-3 and -7 during apoptosis. *Mol Cells* 24, 261-267.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.
- Nakamura, T., and Lipton, S.A. (2008). Emerging roles of S-nitrosylation in protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Antioxid Redox Signal* 10, 87-101.
- Naqvi, T.Z., Shah, P.K., Ivey, P.A., Molloy, M.D., Thomas, A.M., Panicker, S., Ahmed, A., Cercek, B., and Kaul, S. (1999). Evidence that high-density lipoprotein cholesterol is an independent predictor of acute platelet-dependent thrombus formation. *Am J Cardiol* 84, 1011-1017.
- Navab, M., Ananthramiah, G.M., Reddy, S.T., Van Lenten, B.J., Ansell, B.J., Hama, S., Hough, G., Bachini, E., Grijalva, V.R., Wagner, A.C., *et al.* (2005). The double jeopardy of HDL. *Ann Med* 37, 173-178.
- Navab, M., Berliner, J.A., Subbanagounder, G., Hama, S., Lusis, A.J., Castellani, L.W., Reddy, S., Shih, D., Shi, W., Watson, A.D., *et al.* (2001). HDL and the inflammatory response induced by LDL-derived oxidized phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 481-488.

- Navab, M., Hama, S.Y., Cooke, C.J., Anantharamaiah, G.M., Chaddha, M., Jin, L., Subbanagounder, G., Faull, K.F., Reddy, S.T., Miller, N.E., *et al.* (2000). Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res* *41*, 1481-1494.
- Navab, M., Imes, S.S., Hama, S.Y., Hough, G.P., Ross, L.A., Bork, R.W., Valente, A.J., Berliner, J.A., Drinkwater, D.C., Laks, H., *et al.* (1991). Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* *88*, 2039-2046.
- Negre-Salvayre, A., Dousset, N., Ferretti, G., Bacchetti, T., Curatola, G., and Salvayre, R. (2006). Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic Biol Med* *41*, 1031-1040.
- Ng, C.J., Bourquard, N., Grijalva, V., Hama, S., Shih, D.M., Navab, M., Fogelman, A.M., Lusis, A.J., Young, S., and Reddy, S.T. (2006). Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins: anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem* *281*, 29491-29500.
- Ng, C.J., Bourquard, N., Hama, S.Y., Shih, D., Grijalva, V.R., Navab, M., Fogelman, A.M., and Reddy, S.T. (2007). Adenovirus-mediated expression of human paraoxonase 3 protects against the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* *27*, 1368-1374.
- Nicholson, D.W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* *6*, 1028-1042.
- Nishio, E., Arimura, S., and Watanabe, Y. (1996). Oxidized LDL induces apoptosis in cultured smooth muscle cells: a possible role for 7-ketocholesterol. *Biochem Biophys Res Commun* *223*, 413-418.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A., and Ichijo, H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev* *16*, 1345-1355.
- Nofer, J.R., Junker, R., Pulawski, E., Fobker, M., Levkau, B., von Eckardstein, A., Seedorf, U., Assmann, G., and Walter, M. (2001a). High density lipoproteins induce cell cycle entry in vascular smooth muscle cells via mitogen activated protein kinase-dependent pathway. *Thromb Haemost* *85*, 730-735.
- Nofer, J.R., Kehrel, B., Fobker, M., Levkau, B., Assmann, G., and von Eckardstein, A. (2002). HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* *161*, 1-16.
- Nofer, J.R., Levkau, B., Wolinska, I., Junker, R., Fobker, M., von Eckardstein, A., Seedorf, U., and Assmann, G. (2001b). Suppression of endothelial cell apoptosis by high density lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem* *276*, 34480-34485.
- Nordestgaard, B.G., and Zilversmit, D.B. (1989). Comparison of arterial intimal clearances of LDL from diabetic and nondiabetic cholesterol-fed rabbits. Differences in intimal clearance explained by size differences. *Arteriosclerosis* *9*, 176-183.
- Nowicki, M., Zabirnyk, O., Duerrs Schmidt, N., Borlak, J., and Spanel-Borowski, K. (2007). No upregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in serum-deprived EA.hy926 endothelial cells under oxLDL exposure, but increase in autophagy. *Eur J Cell Biol* *86*, 605-616.

- Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., *et al.* (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 26, 9220-9231.
- Ohta, T., Takata, K., Horiuchi, S., Morino, Y., and Matsuda, I. (1989). Protective effect of lipoproteins containing apoprotein A-I on Cu²⁺-catalyzed oxidation of human low density lipoprotein. *FEBS Lett* 257, 435-438.
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., and Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 445-450.
- Oram, J.F., Lawn, R.M., Garvin, M.R., and Wade, D.P. (2000). ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem* 275, 34508-34511.
- Oram, J.F., and Yokoyama, S. (1996). Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. *J Lipid Res* 37, 2473-2491.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-565.
- Ostrovsky, O., Makarewich, C.A., Snapp, E.L., and Argon, Y. (2009). An essential role for ATP binding and hydrolysis in the chaperone activity of GRP94 in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11600-11605.
- Oyadomari, S., Koizumi, A., Takeda, K., Gotoh, T., Akira, S., Araki, E., and Mori, M. (2002). Targeted disruption of the Chop gene delays endoplasmic reticulum stress-mediated diabetes. *J Clin Invest* 109, 525-532.
- Ozawa, K., Kondo, T., Hori, O., Kitao, Y., Stern, D.M., Eisenmenger, W., Ogawa, S., and Ohshima, T. (2001). Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. *J Clin Invest* 108, 41-50.
- Pai, J.T., Guryev, O., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1998). Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem* 273, 26138-26148.
- Palinski, W., Ord, V.A., Plump, A.S., Breslow, J.L., Steinberg, D., and Witztum, J.L. (1994). ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 14, 605-616.
- Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Yla-Herttuala, S., Gurtner, G.C., Socher, S.S., Butler, S.W., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Steinberg, D., and Witztum, J.L. (1989). Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1372-1376.
- Pan, M., Maitin, V., Parathath, S., Andreo, U., Lin, S.X., St Germain, C., Yao, Z., Maxfield, F.R., Williams, K.J., and Fisher, E.A. (2008). Presecretory oxidation, aggregation, and autophagic destruction of apoprotein-B: a pathway for late-stage quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5862-5867.
- Park, K.J., Lee, S.H., Lee, C.H., Jang, J.Y., Chung, J., Kwon, M.H., and Kim, Y.S. (2009). Upregulation of Beclin-1 expression and phosphorylation of Bcl-2 and p53 are involved in the JNK-mediated autophagic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 382, 726-729.

- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122, 927-939.
- Pearse, B.R., and Hebert, D.N. (2010). Lectin chaperones help direct the maturation of glycoproteins in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1803, 684-693.
- Pearson, J.D. (1999). Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 12, 329-341.
- Pedruzzi, E., Guichard, C., Ollivier, V., Driss, F., Fay, M., Prunet, C., Marie, J.C., Pouzet, C., Samadi, M., Elbim, C., *et al.* (2004). NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol* 24, 10703-10717.
- Pei, G., Powers, D.D., and Lentz, B.R. (1993). Specific contribution of different phospholipid surfaces to the activation of prothrombin by the fully assembled prothrombinase. *J Biol Chem* 268, 3226-3233.
- Peiro, C., Redondo, J., Rodriguez-Martinez, M.A., Angulo, J., Marin, J., and Sanchez-Ferrer, C.F. (1995). Influence of endothelium on cultured vascular smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* 25, 748-751.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E.F., Meijer, A.J., and Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem* 275, 992-998.
- Plutzky, J. (1999). Atherosclerotic plaque rupture: emerging insights and opportunities. *Am J Cardiol* 84, 15J-20J.
- Podrez, E.A., Poliakov, E., Shen, Z., Zhang, R., Deng, Y., Sun, M., Finton, P.J., Shan, L., Gugu, B., Fox, P.L., *et al.* (2002). Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 277, 38503-38516.
- Pollman, M.J., Hall, J.L., Mann, M.J., Zhang, L., and Gibbons, G.H. (1998). Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med* 4, 222-227.
- Porn-Ares, M.I., Saido, T.C., Andersson, T., and Ares, M.P. (2003). Oxidized low-density lipoprotein induces calpain-dependent cell death and ubiquitination of caspase 3 in HMEC-1 endothelial cells. *Biochem J* 374, 403-411.
- Porter, N.A., Caldwell, S.E., and Mills, K.A. (1995). Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30, 277-290.
- Proud, C.G. (2005). eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* 16, 3-12.
- Putcha, G.V., Le, S., Frank, S., Besirli, C.G., Clark, K., Chu, B., Alix, S., Youle, R.J., LaMarche, A., Maroney, A.C., *et al.* (2003). JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* 38, 899-914.
- Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Gunn, P., Lee, L., Kelly, P.N., Huntington, N.D., Hughes, P.D., Michalak, E.M., McKimm-Breschkin, J., Motoyama, N., *et al.* (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* 129, 1337-1349.
- Qu, X., Zou, Z., Sun, Q., Luby-Phelps, K., Cheng, P., Hogan, R.N., Gilpin, C., and Levine, B. (2007). Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* 128, 931-946.

- Rader, D.J., and Jaye, M. (2000). Endothelial lipase: a new member of the triglyceride lipase gene family. *Curr Opin Lipidol* *11*, 141-147.
- Raij, L. (2006). Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* *8*, 30-39.
- Rajavashisth, T.B., Andalibi, A., Territo, M.C., Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., and Lusis, A.J. (1990). Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* *344*, 254-257.
- Randow, F., and Seed, B. (2001). Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nat Cell Biol* *3*, 891-896.
- Rapoport, T.A. (2007). Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* *450*, 663-669.
- Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., *et al.* (2010). Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* *90*, 1383-1435.
- Razi, M., Chan, E.Y., and Tooze, S.A. (2009). Early endosomes and endosomal coatome are required for autophagy. *J Cell Biol* *185*, 305-321.
- Resink, T.J., Bochkov, V.N., Hahn, A.W., Philippova, M.P., Buhler, F.R., and Tkachuk, V.A. (1995). Low- and high-density lipoproteins as mitogenic factors for vascular smooth muscle cells: individual, additive and synergistic effects. *J Vasc Res* *32*, 328-338.
- Riddell, D.R., Vinogradov, D.V., Stannard, A.K., Chadwick, N., and Owen, J.S. (1999). Identification and characterization of LRP8 (apoER2) in human blood platelets. *J Lipid Res* *40*, 1925-1930.
- Riemer, J., Bulleid, N., and Herrmann, J.M. (2009). Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process. *Science* *324*, 1284-1287.
- Robbesyn, F., Garcia, V., Auge, N., Vieira, O., Frisach, M.F., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (2003). HDL counterbalance the proinflammatory effect of oxidized LDL by inhibiting intracellular reactive oxygen species rise, proteasome activation, and subsequent NF-kappaB activation in smooth muscle cells. *Faseb J* *17*, 743-745.
- Ron, D. (2002). Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest* *110*, 1383-1388.
- Rong, J.X., Shapiro, M., Trogan, E., and Fisher, E.A. (2003). Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13531-13536.
- Rong, Y.P., Bultynck, G., Aromolaran, A.S., Zhong, F., Parys, J.B., De Smedt, H., Mignery, G.A., Roderick, H.L., Bootman, M.D., and Distelhorst, C.W. (2009). The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 14397-14402.
- Roosbeek, S., Vanloo, B., Duverger, N., Caster, H., Breyne, J., De Beun, I., Patel, H., Vandekerckhove, J., Shoulders, C., Rosseneu, M., *et al.* (2001). Three arginine residues in apolipoprotein A-I are critical for activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res* *42*, 31-40.

- Rothblat, G.H., and Phillips, M.C. (2010). High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* *21*, 229-238.
- Rouschop, K.M., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., *et al.* (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* *120*, 127-141.
- Rubins, H.B., Robins, S.J., Collins, D., Fye, C.L., Anderson, J.W., Elam, M.B., Faas, F.H., Linares, E., Schaefer, E.J., Schectman, G., *et al.* (1999). Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med* *341*, 410-418.
- Rye, K.A., Clay, M.A., and Barter, P.J. (1999). Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* *145*, 227-238.
- Rzymiski, T., Milani, M., Pike, L., Buffa, F., Mellor, H.R., Winchester, L., Pires, I., Hammond, E., Ragoussis, I., and Harris, A.L. (2010). Regulation of autophagy by ATF4 in response to severe hypoxia. *Oncogene* *29*, 4424-4435.
- Saleh, M., Vaillancourt, J.P., Graham, R.K., Huyck, M., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Steinberg, M.H., Nolan, V., Baldwin, C.T., Hotchkiss, R.S., *et al.* (2004). Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature* *429*, 75-79.
- Salvayre, R., Auge, N., Benoist, H., and Negre-Salvayre, A. (2002). Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* *1585*, 213-221.
- Sanson, M., Auge, N., Vindis, C., Muller, C., Bando, Y., Thiers, J.C., Marachet, M.A., Zarkovic, K., Sawa, Y., Salvayre, R., *et al.* (2009). Oxidized low-density lipoproteins trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: prevention by oxygen-regulated protein 150 expression. *Circ Res* *104*, 328-336.
- Sanson, M., Ingueneau, C., Vindis, C., Thiers, J.C., Glock, Y., Rousseau, H., Sawa, Y., Bando, Y., Mallat, Z., Salvayre, R., *et al.* (2008). Oxygen-regulated protein-150 prevents calcium homeostasis deregulation and apoptosis induced by oxidized LDL in vascular cells. *Cell Death Differ* *15*, 1255-1265.
- Sanz, J., and Fayad, Z.A. (2008). Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature* *451*, 953-957.
- Sata, M., and Walsh, K. (1998a). Endothelial cell apoptosis induced by oxidized LDL is associated with the down-regulation of the cellular caspase inhibitor FLIP. *J Biol Chem* *273*, 33103-33106.
- Sata, M., and Walsh, K. (1998b). Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* *102*, 1682-1689.
- Sattler, W., Christison, J., and Stocker, R. (1995). Cholesterylester hydroperoxide reducing activity associated with isolated high- and low-density lipoproteins. *Free Radic Biol Med* *18*, 421-429.
- Sattler, W., and Stocker, R. (1993). Greater selective uptake by Hep G2 cells of high-density lipoprotein cholesteryl ester hydroperoxides than of unoxidized cholesteryl esters. *Biochem J* *294* (Pt 3), 771-778.

- Scanu, A.M., and Edelstein, C. (2008). HDL: bridging past and present with a look at the future. *Faseb J* 22, 4044-4054.
- Scheuner, D., Song, B., McEwen, E., Liu, C., Laybutt, R., Gillespie, P., Saunders, T., Bonner-Weir, S., and Kaufman, R.J. (2001). Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 7, 1165-1176.
- Schissel, S.L., Jiang, X., Tweedie-Hardman, J., Jeong, T., Camejo, E.H., Najib, J., Rapp, J.H., Williams, K.J., and Tabas, I. (1998). Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH. Implications for atherosclerotic lesion development. *J Biol Chem* 273, 2738-2746.
- Schonbeck, U., Gerdes, N., Varo, N., Reynolds, R.S., Horton, D.B., Bavendiek, U., Robbie, L., Ganz, P., Kinlay, S., and Libby, P. (2002). Oxidized low-density lipoprotein augments and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors limit CD40 and CD40L expression in human vascular cells. *Circulation* 106, 2888-2893.
- Schumaker, V.N., Phillips, M.L., and Chatterton, J.E. (1994). Apolipoprotein B and low-density lipoprotein structure: implications for biosynthesis of triglyceride-rich lipoproteins. *Adv Protein Chem* 45, 205-248.
- Seetharam, D., Mineo, C., Gormley, A.K., Gibson, L.L., Vongpatanasin, W., Chambliss, K.L., Hahner, L.D., Cummings, M.L., Kitchens, R.L., Marcel, Y.L., *et al.* (2006). High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circ Res* 98, 63-72.
- Seimon, T., and Tabas, I. (2009). Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J Lipid Res* 50 *Suppl*, S382-387.
- Shan, D., Marchase, R.B., and Chatham, J.C. (2008). Overexpression of TRPC3 increases apoptosis but not necrosis in response to ischemia-reperfusion in adult mouse cardiomyocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 294, C833-841.
- Shang, Y.Y., Wang, Z.H., Zhang, L.P., Zhong, M., Zhang, Y., Deng, J.T., and Zhang, W. (2009). TRB3, upregulated by ox-LDL, mediates human monocyte-derived macrophage apoptosis. *FEBS J* 276, 2752-2761.
- Shen, C.M., Mao, S.J., Huang, G.S., Yang, P.C., and Chu, R.M. (2001). Stimulation of smooth muscle cell proliferation by ox-LDL- and acetyl LDL-induced macrophage-derived foam cells. *Life Sci* 70, 443-452.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., and Prywes, R. (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* 3, 99-111.
- Shi, W., Haberland, M.E., Jien, M.L., Shih, D.M., and Lusis, A.J. (2000). Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice. *Circulation* 102, 75-81.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., and Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6, 1221-1228.
- Simonsen, A., and Tooze, S.A. (2009). Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol* 186, 773-782.
- Six, D.A., and Dennis, E.A. (2000). The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 1488, 1-19.

- Soutar, A.K., and Naoumova, R.P. (2007). Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4, 214-225.
- Spieker, L.E., Sudano, I., Hurlimann, D., Lerch, P.G., Lang, M.G., Binggeli, C., Corti, R., Ruschitzka, F., Luscher, T.F., and Noll, G. (2002). High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation* 105, 1399-1402.
- Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 92, 1355-1374.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., and Witztum, J.L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320, 915-924.
- Steinbrecher, U.P. (1999). Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1436, 279-298.
- Stender, S., and Zilversmit, D.B. (1981). Transfer of plasma lipoprotein components and of plasma proteins into aortas of cholesterol-fed rabbits. Molecular size as a determinant of plasma lipoprotein influx. *Arteriosclerosis* 1, 38-49.
- Suc, I., Escargueil-Blanc, I., Troly, M., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (1997). HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2158-2166.
- Sugano, M., Tsuchida, K., and Makino, N. (2000). High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 272, 872-876.
- Sumi, T., Yamashita, A., Matsuda, S., Goto, S., Nishihira, K., Furukoji, E., Sugimura, H., Kawahara, H., Imamura, T., Kitamura, K., *et al.* (2010). Disturbed blood flow induces erosive injury to smooth muscle cell-rich neointima and promotes thrombus formation in rabbit femoral arteries. *J Thromb Haemost* 8, 1394-1402.
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., *et al.* (1997). A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386, 292-296.
- Sviridov, D., and Nestel, P. (2002). Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. *Atherosclerosis* 161, 245-254.
- Swirski, F.K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F.W., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytois and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest* 117, 195-205.
- Szalai, G., Krishnamurthy, R., and Hajnoczky, G. (1999). Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J* 18, 6349-6361.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., and Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 7, 880-885.
- Tabas, I. (1995). The stimulation of the cholesterol esterification pathway by atherogenic lipoproteins in macrophages. *Curr Opin Lipidol* 6, 260-268.

- Tabas, I. (2005). Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 2255-2264.
- Tabas, I. (2010). The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circ Res* 107, 839-850.
- Tamama, K., Tomura, H., Sato, K., Malchinkhuu, E., Damirin, A., Kimura, T., Kuwabara, A., Murakami, M., and Okajima, F. (2005). High-density lipoprotein inhibits migration of vascular smooth muscle cells through its sphingosine 1-phosphate component. *Atherosclerosis* 178, 19-23.
- Tamatani, M., Matsuyama, T., Yamaguchi, A., Mitsuda, N., Tsukamoto, Y., Taniguchi, M., Che, Y.H., Ozawa, K., Hori, O., Nishimura, H., *et al.* (2001). ORP150 protects against hypoxia/ischemia-induced neuronal death. *Nat Med* 7, 317-323.
- Tanaka, S., Uehara, T., and Nomura, Y. (2000). Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. *J Biol Chem* 275, 10388-10393.
- Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Komatsu, M., Ueno, T., and Kominami, E. (2002). Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J Biol Chem* 277, 13739-13744.
- Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Ueno, T., and Kominami, E. (2001). The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J Biol Chem* 276, 1701-1706.
- Taylor, C.W., and Laude, A.J. (2002). IP3 receptors and their regulation by calmodulin and cytosolic Ca²⁺. *Cell Calcium* 32, 321-334.
- Taylor, C.W., Prole, D.L., and Rahman, T. (2009). Ca²⁺ channels on the move. *Biochemistry* 48, 12062-12080.
- Tedgui, A., and Mallat, Z. (2001). Apoptosis as a determinant of atherothrombosis. *Thromb Haemost* 86, 420-426.
- Terasaka, N., Wang, N., Yvan-Charvet, L., and Tall, A.R. (2007). High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15093-15098.
- Theilmeier, G., De Geest, B., Van Veldhoven, P.P., Stengel, D., Michiels, C., Lox, M., Landeloos, M., Chapman, M.J., Ninio, E., Collen, D., *et al.* (2000). HDL-associated PAF-AH reduces endothelial adhesiveness in apoE^{-/-} mice. *Faseb J* 14, 2032-2039.
- Thorp, E., Li, G., Seimon, T.A., Kuriakose, G., Ron, D., and Tabas, I. (2009). Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of ApoE^{-/-} and Ldlr^{-/-} mice lacking CHOP. *Cell Metab* 9, 474-481.
- Thuerauf, D.J., Morrison, L., and Glembotski, C.C. (2004). Opposing roles for ATF6 α and ATF6 β in endoplasmic reticulum stress response gene induction. *J Biol Chem* 279, 21078-21084.
- Tian, F., Zhou, X., Wikstrom, J., Karlsson, H., Sjolund, H., Gan, L.M., Boren, J., and Akyurek, L.M. (2009). Protein disulfide isomerase increases in myocardial endothelial cells

- in mice exposed to chronic hypoxia: a stimulatory role in angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H1078-1086.
- Tirasophon, W., Welihinda, A.A., and Kaufman, R.J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* 12, 1812-1824.
- Tong, X., Evangelista, A., and Cohen, R.A. (2010). Targeting the redox regulation of SERCA in vascular physiology and disease. *Curr Opin Pharmacol* 10, 133-138.
- Tricot, O., Mallat, Z., Heymes, C., Belmin, J., Leseche, G., and Tedgui, A. (2000). Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 101, 2450-2453.
- Tselepis, A.D., Dentan, C., Karabina, S.A., Chapman, M.J., and Ninio, E. (1995). PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VHDL-1 in human plasma. Catalytic characteristics and relation to the monocyte-derived enzyme. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15, 1764-1773.
- Tu, B.P., and Weissman, J.S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol* 164, 341-346.
- Uchida, K. (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 42, 318-343.
- Uehara, T., Nakamura, T., Yao, D., Shi, Z.Q., Gu, Z., Ma, Y., Masliah, E., Nomura, Y., and Lipton, S.A. (2006). S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* 441, 513-517.
- Uittenbogaard, A., Shaul, P.W., Yuhanna, I.S., Blair, A., and Smart, E.J. (2000). High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J Biol Chem* 275, 11278-11283.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* 287, 664-666.
- Van Herck, J.L., De Meyer, G.R., Martinet, W., Bult, H., Vrints, C.J., and Herman, A.G. (2010). Proteasome inhibitor bortezomib promotes a rupture-prone plaque phenotype in ApoE-deficient mice. *Basic Res Cardiol* 105, 39-50.
- Vandecaetsbeek, I., Trekels, M., De Maeyer, M., Ceulemans, H., Lescrinier, E., Raeymaekers, L., Wuytack, F., and Vangheluwe, P. (2009). Structural basis for the high Ca²⁺ affinity of the ubiquitous SERCA2b Ca²⁺ pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18533-18538.
- Verheye, S., Martinet, W., Kockx, M.M., Knaapen, M.W., Salu, K., Timmermans, J.P., Ellis, J.T., Kilpatrick, D.L., and De Meyer, G.R. (2007). Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy. *J Am Coll Cardiol* 49, 706-715.
- Vieira, O., Escargueil-Blanc, I., Jurgens, G., Borner, C., Almeida, L., Salvayre, R., and Negre-Salvayre, A. (2000). Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *Faseb J* 14, 532-542.
- Vindis, C., Elbaz, M., Escargueil-Blanc, I., Auge, N., Heniquez, A., Thiers, J.C., Negre-Salvayre, A., and Salvayre, R. (2005). Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 639-645.

- Virmani, R., Burke, A.P., Farb, A., and Kolodgie, F.D. (2006). Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol* 47, C13-18.
- Vohl, M.C., Neville, T.A., Kumarathasan, R., Braschi, S., and Sparks, D.L. (1999). A novel lecithin-cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation. *Biochemistry* 38, 5976-5981.
- von dem Bussche, A., Machida, R., Li, K., Loevinsohn, G., Khander, A., Wang, J., Wakita, T., Wands, J.R., and Li, J. (2010). Hepatitis C virus NS2 protein triggers endoplasmic reticulum stress and suppresses its own viral replication. *J Hepatol* 53, 797-804.
- von Eckardstein, A., Jauhiainen, M., Huang, Y., Metso, J., Langer, C., Pussinen, P., Wu, S., Ehnholm, C., and Assmann, G. (1996). Phospholipid transfer protein mediated conversion of high density lipoproteins generates pre beta 1-HDL. *Biochim Biophys Acta* 1301, 255-262.
- von Eckardstein, A., Nofer, J.R., and Assmann, G. (2001). High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 13-27.
- Waddington, E.I., Croft, K.D., Sienuarine, K., Latham, B., and Puddey, I.B. (2003). Fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque: an analysis of clinical and histopathological correlates. *Atherosclerosis* 167, 111-120.
- Walter, D.H., Haendeler, J., Galle, J., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (1998). Cyclosporin A inhibits apoptosis of human endothelial cells by preventing release of cytochrome C from mitochondria. *Circulation* 98, 1153-1157.
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., and Reed, J.C. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284, 339-343.
- Wang, M., Ye, R., Barron, E., Baumeister, P., Mao, C., Luo, S., Fu, Y., Luo, B., Dubeau, L., Hinton, D.R., *et al.* (2010). Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis. *Cell Death Differ* 17, 488-498.
- Wang, X.Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E.M., Kuroda, M., and Ron, D. (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J* 17, 5708-5717.
- Watson, A.D., Berliner, J.A., Hama, S.Y., La Du, B.N., Faull, K.F., Fogelman, A.M., and Navab, M. (1995). Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 96, 2882-2891.
- Watson, A.D., Leitinger, N., Navab, M., Faull, K.F., Horkko, S., Witztum, J.L., Palinski, W., Schwenke, D., Salomon, R.G., Sha, W., *et al.* (1997). Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. *J Biol Chem* 272, 13597-13607.
- Wei, Y., Patingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* 30, 678-688.
- Weissberg, P.L., Clesham, G.J., and Bennett, M.R. (1996). Is vascular smooth muscle cell proliferation beneficial? *Lancet* 347, 305-307.

- Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E.K., Saiki, S., Siddiqi, F.H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., *et al.* (2008). Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat Chem Biol* 4, 295-305.
- Williams, D.L., Connelly, M.A., Temel, R.E., Swarnakar, S., Phillips, M.C., de la Llera-Moya, M., and Rothblat, G.H. (1999). Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol* 10, 329-339.
- Wintergerst, E.S., Jelk, J., Rahner, C., and Asmis, R. (2000). Apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein in human monocyte-derived macrophages involves CD36 and activation of caspase-3. *Eur J Biochem* 267, 6050-6059.
- Wu, Y., Li, X., Xie, W., Jankovic, J., Le, W., and Pan, T. (2010). Neuroprotection of deferoxamine on rotenone-induced injury via accumulation of HIF-1 alpha and induction of autophagy in SH-SY5Y cells. *Neurochem Int* 57, 198-205.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L., and Missiaen, L. (2002). Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* 32, 279-305.
- Xu, K., Yang, Y., Yan, M., Zhan, J., Fu, X., and Zheng, X. (2010). Autophagy plays a protective role in free cholesterol overload-induced death of smooth muscle cells. *J Lipid Res* 51, 2581-2590.
- Xu, X.P., Meisel, S.R., Ong, J.M., Kaul, S., Cercek, B., Rajavashisth, T.B., Sharifi, B., and Shah, P.K. (1999). Oxidized low-density lipoprotein regulates matrix metalloproteinase-9 and its tissue inhibitor in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 99, 993-998.
- Xu, Y., Kim, S.O., Li, Y., and Han, J. (2006). Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *J Biol Chem* 281, 19179-19187.
- Yamada, Y., Ichihara, S., Fujimura, T., and Yokota, M. (1998). Identification of the G994->T missense in exon 9 of the plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene as an independent risk factor for coronary artery disease in Japanese men. *Metabolism* 47, 177-181.
- Yamamoto, K., Ichijo, H., and Korsmeyer, S.J. (1999). BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 19, 8469-8478.
- Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., and Mori, K. (2007). Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell* 13, 365-376.
- Yanagitani, K., Imagawa, Y., Iwawaki, T., Hosoda, A., Saito, M., Kimata, Y., and Kohno, K. (2009). Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA. *Mol Cell* 34, 191-200.
- Yang, L., and Sinensky, M.S. (2000). 25-Hydroxycholesterol activates a cytochrome c release-mediated caspase cascade. *Biochem Biophys Res Commun* 278, 557-563.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2000). ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6, 1355-1364.
- Yeh, Y.Y., Wrasman, K., and Herman, P.K. (2010). Autophosphorylation within the Atg1 activation loop is required for both kinase activity and the induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 185, 871-882.

- Yin, L., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2009). MUC1 oncoprotein promotes autophagy in a survival response to glucose deprivation. *Int J Oncol* 34, 1691-1699.
- Yla-Herttuala, S., Lipton, B.A., Rosenfeld, M.E., Sarkioja, T., Yoshimura, T., Leonard, E.J., Witztum, J.L., and Steinberg, D. (1991). Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5252-5256.
- Yla-Herttuala, S., Palinski, W., Rosenfeld, M.E., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Butler, S., Witztum, J.L., and Steinberg, D. (1989). Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest* 84, 1086-1095.
- Ylitalo, R., Oksala, O., Yla-Herttuala, S., and Ylitalo, P. (1994). Effects of clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. *J Lab Clin Med* 123, 769-776.
- Yokoyama, M. (2004). Oxidant stress and atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 4, 110-115.
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., and Tohyama, M. (2001). Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem* 276, 13935-13940.
- Yoshida, H., Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., and Mori, K. (2001). XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 107, 881-891.
- Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M., and Mori, K. (2000). ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol* 20, 6755-6767.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E.H., and Lenardo, M.J. (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 304, 1500-1502.
- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., and Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15077-15082.
- Yuhanna, I.S., Zhu, Y., Cox, B.E., Hahner, L.D., Osborne-Lawrence, S., Lu, P., Marcel, Y.L., Anderson, R.G., Mendelsohn, M.E., Hobbs, H.H., *et al.* (2001). High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med* 7, 853-857.
- Yuste, V.J., Sanchez-Lopez, I., Sole, C., Moubarak, R.S., Bayascas, J.R., Dolcet, X., Encinas, M., Susin, S.A., and Comella, J.X. (2005). The contribution of apoptosis-inducing factor, caspase-activated DNase, and inhibitor of caspase-activated DNase to the nuclear phenotype and DNA degradation during apoptosis. *J Biol Chem* 280, 35670-35683.
- Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R., and Kimchi, A. (2009). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep* 10, 285-292.

- Zand, T., Hoffman, A.H., Sivilonis, B.J., Underwood, J.M., Nunnari, J.J., Majno, G., and Joris, I. (1999). Lipid deposition in rat aortas with intraluminal hemispherical plug stenosis. A morphological and biophysical study. *Am J Pathol* 155, 85-92.
- Zeiger, A.M., Schachlinger, V., Hohnloser, S.H., Saurbier, B., and Just, H. (1994). Coronary atherosclerotic wall thickening and vascular reactivity in humans. Elevated high-density lipoprotein levels ameliorate abnormal vasoconstriction in early atherosclerosis. *Circulation* 89, 2525-2532.
- Zeng, L., Zampetaki, A., Margariti, A., Pepe, A.E., Alam, S., Martin, D., Xiao, Q., Wang, W., Jin, Z.G., Cockerill, G., *et al.* (2009). Sustained activation of XBP1 splicing leads to endothelial apoptosis and atherosclerosis development in response to disturbed flow. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8326-8331.
- Zhang, K., and Kaufman, R.J. (2004). Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279, 25935-25938.
- Zhang, W., Li, D., and Mehta, J.L. (2004). Role of AIF in human coronary artery endothelial cell apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286, H354-358.
- Zhang, Y.L., Cao, Y.J., Zhang, X., Liu, H.H., Tong, T., Xiao, G.D., Yang, Y.P., and Liu, C.F. (2010). The autophagy-lysosome pathway: a novel mechanism involved in the processing of oxidized LDL in human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 377-382.
- Zhao, Y., Thorngate, F.E., Weisgraber, K.H., Williams, D.L., and Parks, J.S. (2005). Apolipoprotein E is the major physiological activator of lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) on apolipoprotein B lipoproteins. *Biochemistry* 44, 1013-1025.
- Zhou, D., Palam, L.R., Jiang, L., Narasimhan, J., Staschke, K.A., and Wek, R.C. (2008). Phosphorylation of eIF2 directs ATF5 translational control in response to diverse stress conditions. *J Biol Chem* 283, 7064-7073.
- Zhou, J., Lhotak, S., Hilditch, B.A., and Austin, R.C. (2005). Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 111, 1814-1821.
- Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R.T., Remotti, H., Stevens, J.L., and Ron, D. (1998). CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 12, 982-995.

Autre source : Biochimie, 2è édition par D.Voet et JG. Voet, de Boeck 2004, chapitre 9 p.288.

V-Annexes

Oxidized Low-Density Lipoproteins Trigger Endoplasmic Reticulum Stress in Vascular Cells: Prevention by Oxygen-Regulated Protein 150 Expression

Marie Sanson, Nathalie Augé, Cécile Vindis, Carole Muller, Yoshio Bando, Jean-Claude Thiers, Marie-Agnès Marachet, Kamelija Zarkovic, Yoshiki Sawa, Robert Salvayre and Anne Nègre-Salvayre

Circ. Res. 2009;104;328-336; originally published online Dec 23, 2008;

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.183749

Circulation Research is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2009 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0009-7330. Online ISSN: 1524-4571

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circres.ahajournals.org/cgi/content/full/104/3/328>

Data Supplement (unedited) at:

<http://circres.ahajournals.org/cgi/content/full/CIRCRESAHA.108.183749/DC1>

Subscriptions: Information about subscribing to Circulation Research is online at
<http://circres.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Oxidized Low-Density Lipoproteins Trigger Endoplasmic Reticulum Stress in Vascular Cells

Prevention by Oxygen-Regulated Protein 150 Expression

Marie Sanson, Nathalie Augé, Cécile Vindis, Carole Muller, Yoshio Bando, Jean-Claude Thiers, Marie-Agnès Marachet, Kamelija Zarkovic, Yoshiki Sawa, Robert Salvayre, Anne Nègre-Salvayre

Abstract—Oxidized low-density lipoproteins (oxLDLs) trigger various biological responses potentially involved in atherogenesis. Disturbing endoplasmic reticulum (ER) function results in ER stress and unfolded protein response, which tends to restore ER homeostasis but switches to apoptosis when ER stress is prolonged. We aimed to investigate whether ER stress is induced by oxLDLs and can be prevented by the ER-associated chaperone ORP150 (150-kDa oxygen-regulated protein). oxLDLs and the lipid oxidation products 7-ketocholesterol and 4-hydroxynonenal induce ER stress in human endothelial cells (HMEC-1), characterized by the activation of ER stress sensors (phosphorylation of Ire1 α and PERK, nuclear translocation of ATF6) and of their subsequent pathways (eukaryotic initiation factor 2 α phosphorylation, expression of XBP1/spliced XBP1, CHOP, and KDEL chaperones GRP78, GRP94, ORP150). ER stress was inhibited by the antioxidant *N*-acetylcysteine. In advanced atherosclerotic lesions, phospho-Ire1 α , KDEL, and ORP150 staining were localized in lipid-rich areas with 4-hydroxynonenal adducts and CD68-positive macrophagic cells. By comparison, staining for 4-hydroxynonenal, phospho-Ire1 α , KDEL, and ORP were faint and more diffuse in intimal hyperplasia. ER stress takes part in the apoptotic effect of oxLDLs, through the Ire1 α /c-Jun N-terminal kinase pathway, as assessed by the protective effect of specific small interfering RNAs and c-Jun N-terminal kinase inhibitor. Forced expression of the chaperone ORP150 reduced both oxLDL-induced ER stress and apoptosis. ER stress markers and ORP150 chaperone are expressed in areas containing oxLDLs in atherosclerotic lesions and are induced by oxLDLs and oxidized lipids in cultured cells. The forced expression of ORP150 highlights its new protective role against oxLDL-induced ER stress and subsequent apoptosis. (*Circ Res.* 2009;104:328-336.)

Key Words: ER stress ■ apoptosis ■ ORP150 ■ oxidized LDL ■ atherosclerosis

Low oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) concentration exhibit proinflammatory and mitogenic effects, whereas higher concentrations elicit a progressive inhibition of survival mechanisms and the induction of proapoptotic signaling pathways.¹⁻⁵ oxLDLs may alter the fragile balance between survival and death of vascular cells, thereby leading to stable-to-vulnerable plaque transition and finally to atherothrombotic events.⁶⁻⁸

The stress of the endoplasmic reticulum (ER) occurs in atherosclerotic lesions of hypercholesterolemic (apolipoprotein [apo]E^{-/-}) mice,⁹ and could be associated with acute coronary syndrome.¹⁰ ER stress emerges as a new adaptive system determining the fate of cells to survive or die¹¹ and may thereby be implicated in the erosion or rupture of atherosclerotic plaques.

Altered protein folding and ER stress occurs in various pathological conditions, including ischemia, hypoxia, heat shock, proteasome inhibition, glycosylation inhibition, oxidative stress, and calcium depletion of ER stores.^{12,13} The accumulation of unfolded protein aggregates leads to the activation of transmembrane sensors/transducers inositol-requiring enzyme (Ire)1 α , PERK (RNA-dependent protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase), and activating transcription factor (ATF)6 that regulate several signaling pathways, gene expression, and protein synthesis.¹¹

The presence of ER-resident chaperones is crucial for facilitating and maintaining the protein folding, thereby preventing ER stress and promoting cell survival.¹⁴⁻¹⁷ GRP78/BiP, the best characterized ER-resident chaperone, plays a central role in regulating ER stress via its ability to

Original received July 23, 2008; revision received December 11, 2008; accepted December 11, 2008.

From Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (M.S., N.A., C.V., C.M., J.-C.T., M.-A.M., R.S., A.N.-S.), U-858, Vascular Biology Department, IFR-31, Toulouse, France; Faculty of Medicine-Rangueil, Biochemistry and Molecular Biology Laboratory (J.-C.T., R.S., A.N.-S.), University of Toulouse, France; Department of Anatomy (Y.B.), Asahikawa Medical College Hokkaido, Japan; Division of Pathology (K.Z.), University of Zagreb and Clinical Hospital Centre, Croatia; and Department of Surgery (Y.S.), Division of Cardiovascular Surgery, Graduate School of Medicine, University of Osaka, Japan.

Correspondence to Dr A. Negre-Salvayre, Biochimie, INSERM U858, Eq10, IFR-31, CHU Rangueil, 1, avenue Jean Poulhès, BP84225-31432, Toulouse Cedex 4, France. E-mail anne.negre-salvayre@inserm.fr

© 2009 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://circres.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.183749

control the activation of transmembrane ER stress sensors/transducers, through a binding–release mechanism.¹⁸ On ER stress induction, GRP78/BiP binds misfolded proteins, thereby releasing the ER stress sensors that become activated, leading to the unfolded protein response (UPR). UPR triggers adaptive responses to ER dysfunction,^{11,19} and switches to apoptosis in case of prolonged or severe ER stress.^{20–22}

The antiapoptotic ER-associated chaperone ORP150 (150-kDa oxygen-regulated protein) is induced by hypoxia and oxidative stress.^{23–25} The mechanism of protection evoked by ORP150 could include an inhibition of calcium mobilization from ER.^{26,27} The interactions between ORP150 and ER stress are not yet clarified.

This led us to investigate whether induction of ER stress by oxLDLs is implicated in oxLDL-induced apoptosis of vascular cells and whether expression of the ER resident chaperone protein ORP150 may prevent oxLDL-induced ER stress and apoptosis.

Materials and Methods

Human LDLs (1.019_d_1.063) were isolated by sequential ultracentrifugation and oxidized by UV/copper irradiation.^{4,5} We used human microvascular endothelial cells (HMEC-1) (Dr Candal, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga), wild-type or transfected with a ORP150 sense plasmid.²⁷ The following methods were used: immunocytochemistry, immunoprecipitation, Western blot analysis, knockdown of protein by small interfering (si)RNA transfection, MTT viability test, and DEVDase activity. Human arteries obtained from vascular surgery and carotid endarterectomy were used for immunohistochemistry or Western blot analysis. Statistical analysis was performed by ANOVA (Tukey test; SigmaStat).

An expanded Materials and Methods section is available in the online data supplement at <http://circres.ahajournals.org>.

Results

oxLDLs Induce the Activation of ER Stress in HMEC-1 Cells

ER stress is characterized by the activation of ER stress sensors, leading to UPR induction and expression of ER-resident proteins bearing the unique C-terminal sequence KDEL.¹⁸

Incubation of HMEC-1 cells with mildly oxLDLs (200 μ g apoB/mL) induced a time-dependent activation of the ER stress transducers, as assessed by the phosphorylation of PERK and Ire1 α (Figure 1A and 1B). Moreover, the detection of ATF6 in the nucleus of cells treated with oxLDLs is indicative of the cleavage of ATF6 by site 1 and site 2 proteases, allowing the release of its cytosolic domain and its nuclear translocation (Figure 1C). Consistent with the activation of ATF6, oxLDLs induced a time-dependent expression of the proapoptotic factor CHOP mRNA (Figure 2A and 2B) and of XBP1 mRNA and its spliced form (sXBP1) (Figure 2C and 2D). As expected, PERK activated by oxLDLs, in turn, induced the phosphorylation of its substrate eukaryotic initiation factor (eIF)2 α (Figure 2E), which is known to inhibit the general pathway of protein biosynthesis. Finally, oxLDLs induced the expression of the KDEL motif-bearing ER chaperones at 150 kDa (ORP150), 94 kDa (GRP94), and 78 kDa (GRP78/BiP) (Figure 2F). It may be noted that similar results were observed with cell-oxidized LDL (data not

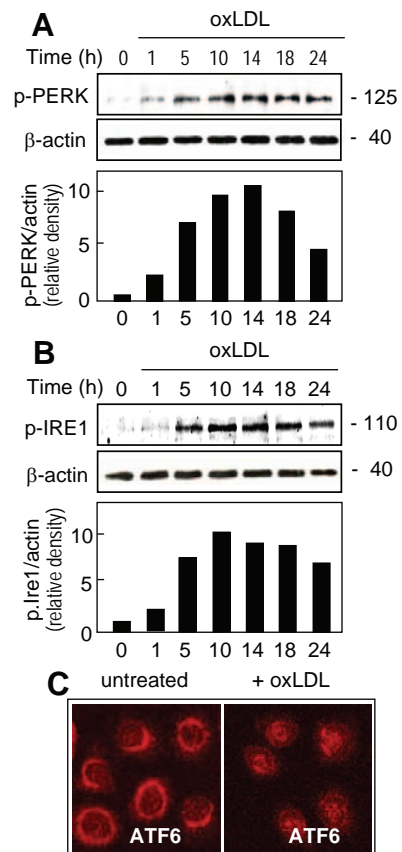


Figure 1. oxLDLs trigger ER stress activation in HMEC-1 cells. A and B, Time course of phosphorylation of the ER stress sensors PERK and Ire1 α in HMEC-1 cells treated with oxLDLs (200 mg apoB/L). Western blot experiments were performed on total protein extracts using β -actin expression as control house-keeping protein. A, Phospho-PERK. B, Phospho-Ire1 α (p-Ire1). C, Immunocytochemistry experiments showing the nuclear translocation of ATF6 after 10 hours of treatment with oxLDLs. These data are representative of 4 separate experiments.

shown), but we have chosen to use UV/copper oxLDLs to avoid interference by bioactive compounds potentially emitted from the cells used for LDL oxidation.

Altogether, these data indicate that oxLDLs activate the 3 pathways of ER stress, which lead concomitantly to the activation of proapoptotic mediators (CHOP) and the expression of protective ER chaperones.

ER Stress Markers in Atherosclerotic Lesions

Because oxLDLs (and oxidized lipids) are present in atherosclerotic lesions,²⁸ we investigated whether the expression of UPR markers, such as phospho-Ire1 α and KDEL motif-bearing cells, is increased in human atherosclerotic lesions of carotid endarterectomy and in aortas obtained at autopsy. As shown in Figure 3, staining for phospho-Ire1 α (pIre1 α) and KDEL were markedly increased in the core area of advanced atherosclerotic lesions from carotid endarterectomy, in agreement with Zhou et al.⁹ These markers were faintly expressed in stable aortic plaques, whereas they were not detected in normal mammary artery. Interestingly, ER stress markers were expressed in the same area as the lipid peroxidation marker 4-hydroxynonenal (4-HNE) (Figure I in the online

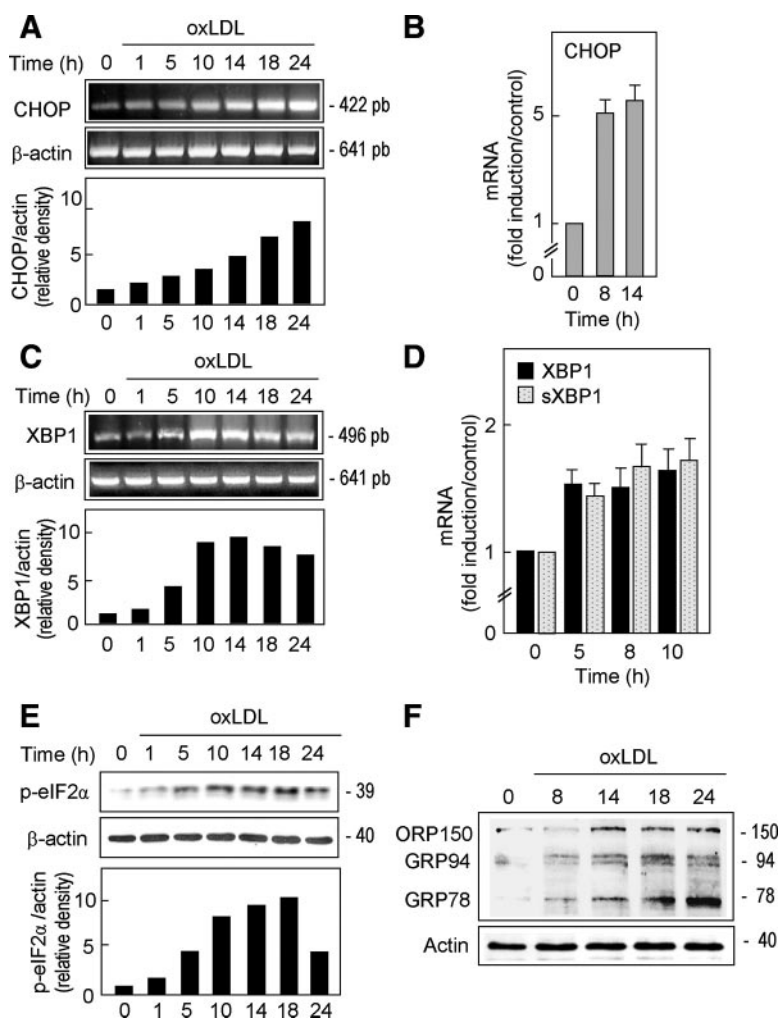


Figure 2. oxLDLs trigger UPR. A through D, RT-PCR (A and C) and quantitative PCR (B and D) experiments showing the time course of mRNA expression of human CHOP (A and B), XBP1 (C and D), and its spliced form (sXBP1) (D) in HMEC-1 cells treated with oxLDLs (200 mg/L). For RT-PCR, housekeeping β -actin mRNAs were used as control. For quantitative PCR experiments, relative mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA. E, Western blot of the time course of eIF2 α phosphorylation in HMEC-1 cells treated with oxLDLs (200 mg/L). F, Western blot of the time course of oxLDL-induced expression of KDEL-motif-bearing proteins (150 kDa, ORP150; 94 kDa, GRP94; 78 kDa, GRP78). A, C, E, and F are representative from 3 experiments. In B and D, Quantitative PCR data (expressed as ratio of the initial level) are means \pm SEM of 3 experiments.

supplement data supplement). It may be noted that in advanced plaques, 4-HNE was localized mainly in the lipid core, labeled by CD68, a marker of macrophages. In contrast, α -actin-positive smooth muscle cells were located in the surroundings of the central core, and expressed no (or only slightly) ER stress markers.

These data suggest that lipid peroxidation markers and ER stress/UPR markers are present in the same area within the lesions, thus suggesting that oxLDLs (and oxidized lipids) may contribute to ER stress induction, in agreement with the data reported for oxysterols by Myoishi et al.¹⁰

4-HNE and 7-Ketocholesterol Trigger ER Stress

Because 4-HNE is a component of oxLDLs and is found in atherosclerotic lesions, like ER stress markers, we investigated whether it may trigger ER stress. As shown in Figure 4A, incubation of HMEC-1 cells with 4-HNE (20 μ mol/L) induced the phosphorylation of Ire1 α and eIF2 α , peaking after 10 to 14 hours. Similarly, 7-ketocholesterol (10 μ mol/L), another oxidized lipid that plays a role in the apoptotic effect of oxLDLs, also induced the phosphorylation of Ire1 α and eIF2 α , (Figure 4B). These data strongly suggest that oxysterols and lipid peroxidation derivatives of polyunsaturated fatty acids participate in the activation of ER stress by oxLDLs.

N-Acetylcysteine Prevents oxLDL-Induced ER Stress

oxLDLs and oxidized lipids are known to trigger intracellular generation of reactive oxygen species (ROS) and cellular oxidative stress^{29,30} that may trigger ER stress.³¹ This led us to investigate whether antioxidants may prevent the oxLDL-induced ER stress. Among the antioxidants tested in preliminary experiments, *N*-acetylcysteine (NAC) was the most effective and prevented the phosphorylation of Ire1 α and eIF2 α triggered by oxLDLs (Figure 5A), 7-ketocholesterol (Figure 5B), and 4-HNE (Figure 5C). These data suggest that oxidative stress triggered by oxidized lipids is involved in ER stress induction and that NAC is able to prevent it.

ER Stress Is Involved in oxLDL-Induced Apoptosis Through JNK Activation

Prolonged ER stress is known to mediate apoptosis through CHOP induction and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation.¹⁹ Because oxLDLs induced a protracted and intense activation of ER stress sensors PERK and Ire1 α , and induced CHOP mRNA, a classic marker of ER stress-dependent apoptosis (Figures 1 and 2), we expected the activation of JNK/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK), which is activated through the Ire1 α /ASK1 pathway.³² As shown in Figure 6A, oxLDLs induced a time-dependent phosphoryla-

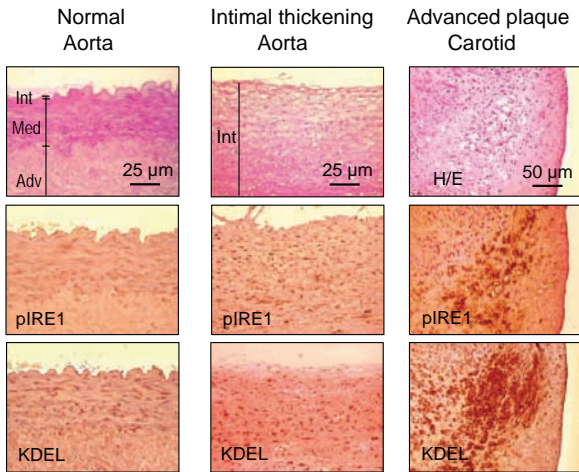


Figure 3. Induction of UPR in the vascular wall. Paraffin sections of arteries obtained at autopsy and carotid plaques from endarterectomy were analyzed for ER stress markers phospho-Ire1 α (pIre1) (top) and KDEL (bottom). From left to right, normal human aorta human ascending aorta with intimal hyperplasia and human carotid advanced plaque. Int indicates intima; Med, Media; Adv, adventitia. These images are representative of analysis for 3 separate normal aorta, 3 human ascending aortas, and 3 advanced carotid plaques. The scale bars represent 25 μ m (normal mammary artery and intimal thickening aorta) and 50 μ m (advanced carotid plaque).

tion of JNK, which was completely inhibited in cells treated with siRNA specific for Ire1 α (Figure 6B). Moreover, siRNA silencing of Ire1 α , in part, prevented the oxLDL-mediated apoptosis (Figure 6C and 6D) and DEVDase (caspase) activation (Figure 6E). The proapoptotic role of JNK in our experimental model was supported by the effect of the JNK inhibitor SP600125, which, in part, inhibited the oxLDL-mediated apoptosis (Figure 6C through 6E).

Altogether, these data strongly suggest that ER stress plays a role in oxLDL-induced apoptosis through a pathway involving Ire1 α and JNK.

ORP150 Expression Inhibits ER Stress and Apoptosis Induced by oxLDLs

ORP150 is an antiapoptotic ER-resident chaperone, induced by hypoxia and oxidative stress, that exerts a protective effect against ER stress-dependent apoptosis.^{23–25} We investigated whether ORP150 overexpression could protect against oxLDL-mediated apoptosis by modulating ER stress. For this purpose, we used either HMEC-1 cells stably transfected with an ORP150 cDNA-containing vector (ORP-HMECs), compared to HMEC-1 cells transfected with the empty vector (ev-HMEC), or HMEC-1 cells treated with siRNA specific for ORP150 (Figure 7A).

ORP150-forced expression was associated with increased resistance of cells to oxLDL-induced cytotoxicity and apoptosis, whereas ORP150 silencing by siRNA potentiated oxLDL-induced cell death and DEVDase activation (Figure 7B and supplemental Figure II). The expression of XBP1, sXBP1, and CHOP mRNA were significantly attenuated in ORP-HMECs incubated with oxLDLs (Figure 7C and supplemental Figure III). Moreover, the phosphorylation of eIF2 α , Ire1 α , and JNK was inhibited in ORP-HMECs (Figure

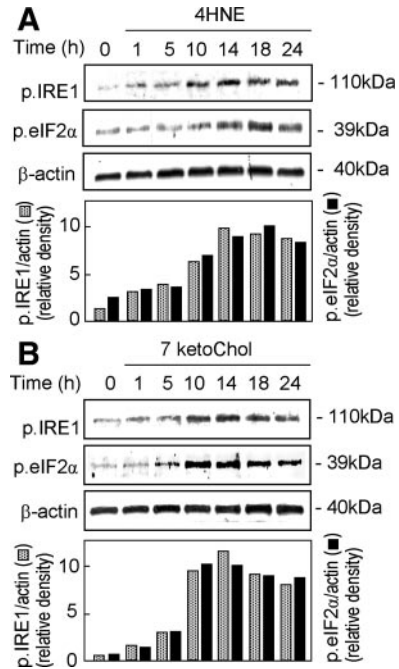


Figure 4. ER stress is induced by lipid peroxidation products. Time course of eIF2 α and Ire1 α phosphorylation induced by 4-HNE (20 μ mol/L) (A) and by 7-ketocholesterol (7-ketoChol) (10 μ mol/L) (B) in HMEC-1 cells and detected by Western blotting. These data are representative of 4 separate experiments.

7D and 7E), in agreement with the resistance of these cells to oxLDL-induced apoptosis.

Moreover, oxLDLs triggered the activation of Akt/PKB, a survival signaling pathway, as shown by Akt phosphorylation in wild-type HMECs and in ORP-HMECs (supplemental Figure IV, A). In contrast, oxLDL-induced Akt phosphorylation was strongly inhibited in ORP150-silenced cells (Figure IV, B). This suggests that ORP150 depletion reduces the oxLDL-induced activation of the Akt survival pathway. This mechanism may participate in the increase of oxLDL-induced apoptosis observed in ORP150-silenced HMECs (Figure 7B and supplemental Figure II).

Because ORP150 can prevent structural alteration of proteins in ER,^{23,24} we investigated whether ORP150, like GRP78, could bind the ER stress sensors, thereby inhibiting UPR induction. This was explored by coimmunoprecipitating ORP150 with the ER stress sensors Ire1 α , PERK, and ATF6 from ev-HMECs and from ORP-HMEC. As shown in Figure 8A through 8C, in ORP-HMEC, ORP150 was detected in the immunoprecipitates of each ER stress sensor (PERK, ATF6, Ire1 α) under basal and oxLDL-stimulated conditions. In contrast, ORP150 was not or only slightly present on ER stress sensor immunoprecipitated from ev-HMEC. These data indicate that, in cells expressing constitutively ORP150, this ER chaperone may bind the ER stress sensors. This may participate to maintain them in an inactive state (Figure 7E through 7G), thereby contributing to inhibit, limit, or delay the UPR activation by oxLDLs.

Because ORP150 is expressed in atherosclerotic lesions in human vessels,²⁵ we investigated whether it may interact in vivo with the nonphosphorylated form of Ire1 α . As shown in Figure 8D, coimmunoprecipitation experiments of Ire1 α

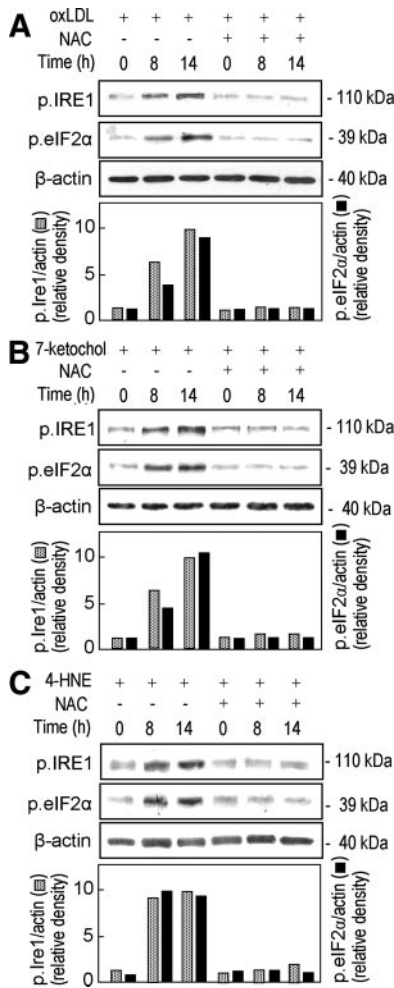


Figure 5. NAC inhibits ER stress evoked by oxLDLs and lipid oxidation products. HMEC-1 cells were preincubated with NAC (5 mmol/L) for 1 hour before adding oxLDLs (200 mg/L) (A), 7-ketocholesterol (10 μmol/L) (B), or 4-HNE (20 μmol/L) (C), and the phosphorylation of eIF2α and Ire1α was revealed by Western blot. These data are representative of 4 separate experiments.

and ORP150 performed on protein extracts from carotid atherosclerotic plaque clearly indicated the interaction between both proteins in atherosclerotic lesions, whereas no or very low ORP150 was observed on Ire1α immunoprecipitates from normal human mammary artery. In contrast, the phosphorylated form of Ire1α and ORP150 did not coimmunoprecipitate in tissue extracts from normal artery and atherosclerotic lesions (Figure 8E).

Altogether, these data indicate that ORP150 overexpression inhibits or delays ER stress in vascular cells stimulated with oxLDLs by interacting with ER stress sensors and by maintaining them in an inactive state. The observation that ORP150 and Ire1α also interact in situ in atherosclerotic lesions suggests that ORP150 may contribute to protect ER function and control apoptosis in the vascular wall.

Discussion

In this study, we report that ER stress is induced by oxLDLs in human vascular cells and modulate the balance between survival and apoptosis induced by oxLDLs. The detection of

ER stress markers (phospho-Ire1α and KDEL motif-bearing proteins) in human stable and advanced atherosclerotic lesions exhibiting high 4-HNE adduct staining indicates that lipid oxidation products (such as 4-HNE and 4-HNE-containing LDL) probably contribute to induce ER stress within the plaque. Forced expression of the ER-resident chaperone ORP150 inhibits ER stress induction triggered by oxLDLs by interacting with the ER stress sensors in vitro and in vivo in atherosclerotic lesions, which suggests that ORP150 could modulate ER stress in the vascular wall.

The first important result of this study is the induction of ER stress by oxLDLs and its potential involvement in oxLDL-induced apoptosis. The oxLDL-induced ER stress and UPR were assessed by the phosphorylation of ER stress sensors and the expression of ER-resident chaperones.³³ UPR is an adaptive response that first tends to restore ER activity and cellular homeostasis but switches toward apoptosis when ER stress is prolonged, depending on the nature of the agent and of the stress intensity.³⁴ The most significant evidence showing the oxLDL-dependent switch of ER stress toward apoptosis was supported by the persistent expression of CHOP, a transcription factor induced through the ATF6 and PERK pathways and possibly by Ire1α.^{35,36} CHOP induces the transcription of several proapoptotic genes such as *Gadd34*, *ERO1*, or *DR5*^{37,38} and represses the transcription of the antiapoptotic factor Bcl-2.³⁹ However, its final involvement in apoptosis is not really clarified. Thus, we also explored the role of Ire1α, which can trigger ER stress-dependent apoptosis through the JNK/SAPK proapoptotic pathway,⁴⁰ which is activated by oxLDLs.^{8,41} Here we show that JNK was activated by oxLDLs, in agreement with previous reports,^{8,41} and that silencing Ire1α by siRNA blocked the phosphorylation of JNK and, in part, inhibited the oxLDL-induced by apoptosis, in agreement with the role of Ire1α and JNK on cadmium-induced apoptosis.⁴²

The cellular events leading to ER stress induction by oxLDLs include an oxidative stress, as suggested by the protective effect of the antioxidants NAC (present work) and PDTTC (data not shown) and in agreement with the known role of oxidative stress in the activation of UPR, in response to oxidatively modified or misfolded protein accumulation.³¹ Moreover, lipid oxidation products present in oxLDLs are also involved in ER stress induction because 7-ketocholesterol or 4-HNE (used at concentrations relevant to those generated during LDL oxidation^{43,44}) mimicked the effect of oxLDLs by triggering the phosphorylation of Ire1α and eIF2α. These data are in agreement with the observation of Pedruzzi et al⁴⁵ showing that 7-ketocholesterol activates the Ire1/JNK signaling pathway, CHOP mRNA expression, and apoptosis of aortic smooth muscle cells via the activation of Nox-4 and oxidative stress. Recent findings indicate that the apoptosis of macrophages elicited by free cholesterol involves the mitochondrial apoptotic pathway and results from cholesterol trafficking to ER and the induction of UPR-dependent caspase activation.^{46,47}

4-HNE (either free or originating from oxLDLs) can modify the cellular proteins by forming adducts on free amino groups and thiol residues, thereby leading to structural alteration of proteins, inhibition of the proteasome, and

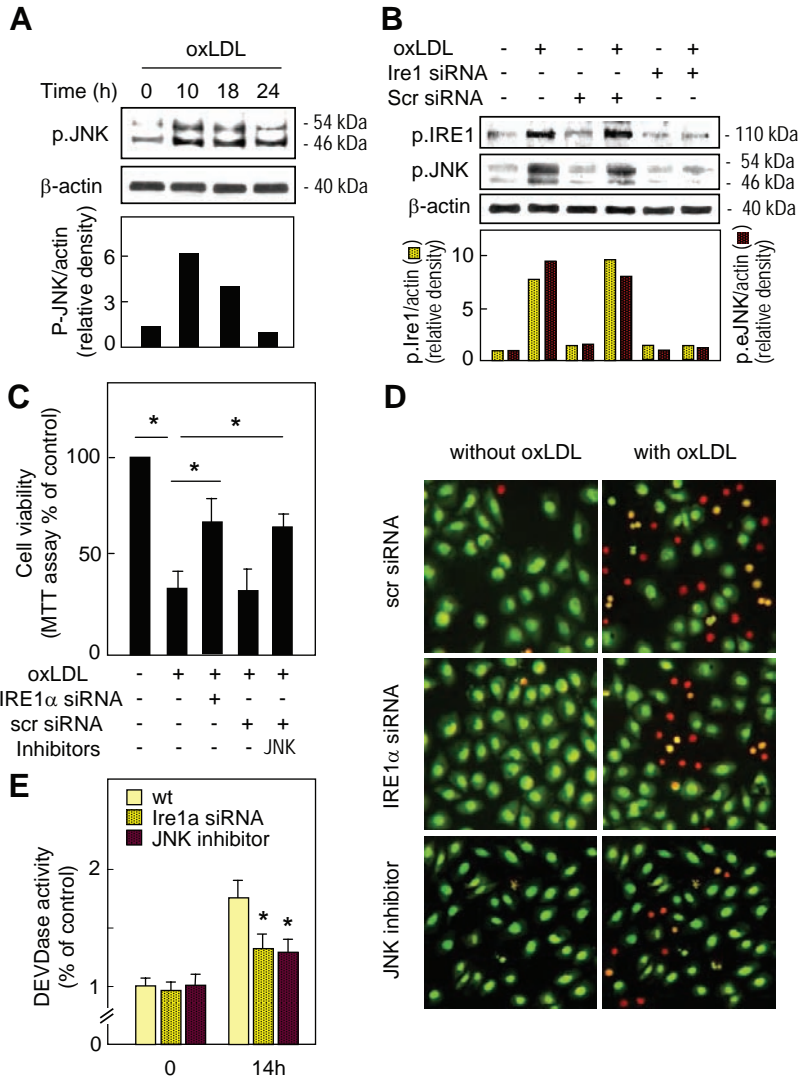


Figure 6. ER stress is involved in oxLDL-induced apoptosis. A, Time course of JNK phosphorylation in HMEC-1 cells incubated with oxLDLs (200 mg/L). B, siRNA silencing of Ire1 α (Ire1 siRNA) inhibits the phosphorylation of JNK in HMEC-1 cells incubated for 18 hours with oxLDLs (200 mg/L). Scr siRNA indicates scrambled siRNA used as control. C and D, Ire1 α silencing and JNK inhibitor SP600125 (10 μ mol/L), in part, prevent oxLDL-induced toxicity, evaluated by the MTT assay (C), apoptosis (visualized by syto13/PI labeling) (D), and DEVDase activation (E). Western blots (A and B) and fluorescence microscopy (D) are representative of 4 separate experiments. In C and E, the data (expressed as percentages of the control) are means \pm SEM of 4 separate experiments. * P <0.05.

accumulation of polyubiquitinated proteins.⁴⁸ Altogether, these data indicate that UPR is activated by oxLDLs and lipid oxidation products and could play a role in the initiation and the progression of atherosclerotic lesion.

oxLDLs induced the expression of ER resident chaperones, BiP (GRP78), GRP94, and ORP150, a chaperone induced by hypoxia and oxidative stress. GRP78 and GRP94 are induced by ER stress and inhibit ER stress-mediated apoptosis in hypoxic cells and ischemic neurons.^{15,49} The expression of ORP150 in various cell types confers resistance to apoptosis induced by celecoxib, hypoxia, or glutamate^{23,24,50} and in diabetes, neuronal ischemia, and atherosclerosis.^{25,51,52} However, the mechanisms underlying the antiapoptotic effect of ORP150 and its role on ER stress modulation are not elucidated. Here, we show that the silencing of ORP150 by specific siRNA enhances the activation of DEVDase (caspase-3) and oxLDL-induced cytotoxicity, whereas forced expression of ORP150 in ORP-HMECs confers a significant resistance to oxLDL-induced DEVDase activation and apoptosis. Interestingly, ORP150 silencing resulted in an inhibition of Akt phosphorylation, which suggests that links exist between ORP150, ER stress, and the prosurvival phosphati-

dylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway, in agreement with the findings of Nakatani et al⁵³ indicating that the phosphorylation state of IRS1 and Akt is strongly altered in the liver of mice expressing an antisense form of ORP150. Because Akt downregulation induces CHOP expression and cell death,⁵⁴ it can be hypothesized that enhanced apoptosis observed in HMEC-1 cells silenced for ORP150 (which results in Akt inhibition) is attributable, at least in part, to an inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, in agreement with our previous report.⁴ On the other hand, forced expression of ORP150 attenuates the activation of ER stress apoptotic pathways induced by oxLDLs, as shown by the reduced phosphorylation of Ire1 α and JNK and expression of XBP1, sXBP1, and CHOP mRNAs. Besides the known properties of ORP150, centered on calcium buffering and protection against ER-calcium stores depletion,^{24,51} we report here that ORP150 can bind the ER stress sensors PERK, ATF6, and Ire1 α , which probably maintains them in an inactive state, thereby inhibiting UPR. This “binding” mechanism is known for GRP78 under basal conditions, while under stress-inducing conditions, this chaperone preferentially binds misfolded proteins, which leads to the ER

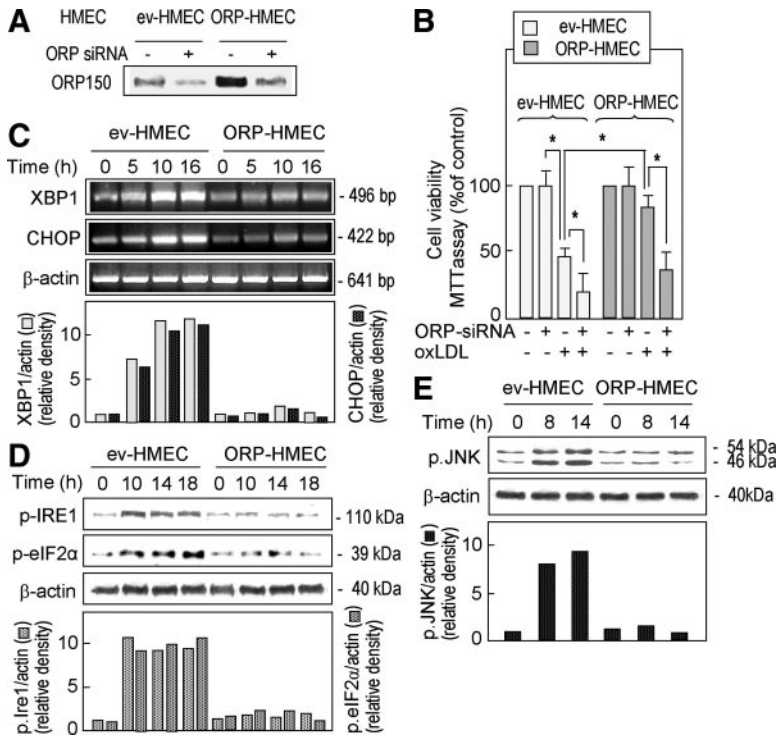


Figure 7. ORP150 overexpression inhibits ER stress induction by oxLDLs. A, ORP150 expression in HMEC-1 cells transfected with an empty vector (ev-HMEC [ev]) or a vector coding for the human ORP150cDNA (ORP-HMEC) and in ev-HMECs and ORP-HMECs transfected with siRNA specific for ORP150 (ORPsiRNA). B, ev-HMECs and ORP-HMECs pretreated or not with ORPsiRNA were incubated with oxLDLs (200 mg/L) for 18 hours. Cell viability was determined by the MTT assay. The data (expressed as percentages of the control) are means \pm SEM of 3 separate experiments. * $P < 0.05$. C, RT-PCR experiments showing the levels of mRNAs for XBP1 and CHOP. Housekeeping β -actin mRNAs were used as control. D and E, Time course of phosphorylation of eIF2 α and Ire1 α (D) and JNK (E) induced by oxLDLs (200 mg/L) in ev-HMECs and ORP-HMECs. The data are representative of 4 separate experiments.

stress sensors activation. It is to note that in ev-HMEC, ORP150 is poorly expressed under basal conditions and thus can neither bind the ER stress sensors nor prevent UPR. In ev-HMECs, the oxLDL-induced expression of ORP150 depends on UPR induction and occurs as a consequence of (thus after) ER stress sensors activation. In contrast, in ORP-HMECs, ORP150 is expressed before oxLDL treatment and, therefore, allows maintenance of inactive the ER sensors under basal and stress conditions. These data suggest that oxLDL-induced expression of ORP150 and other ER chaperones may lead to a feedback mechanism tending to down-regulate ER stress.

Finally, the expression of ER stress markers such as phospho-Ire1 α and KDEL-positive cells was observed in advanced human atherosclerotic lesions, and, to a lesser extent, in stable fibrous plaques, but not in control vessels. Interestingly, this expression was observed in atherosclerotic areas containing high level of 4-HNE adducts, thus suggesting that lipid peroxidation derivatives present in advanced atherosclerotic lesions (as previously reported by Jurgens et al⁵⁵ for 4-HNE and by Myoishi et al¹⁰ for oxysterols) may locally contribute to trigger ER stress. Another finding of this work is the interaction between ORP150 and the inactive nonphosphorylated Ire1 α in the vascular wall, as evidenced by coimmuno-

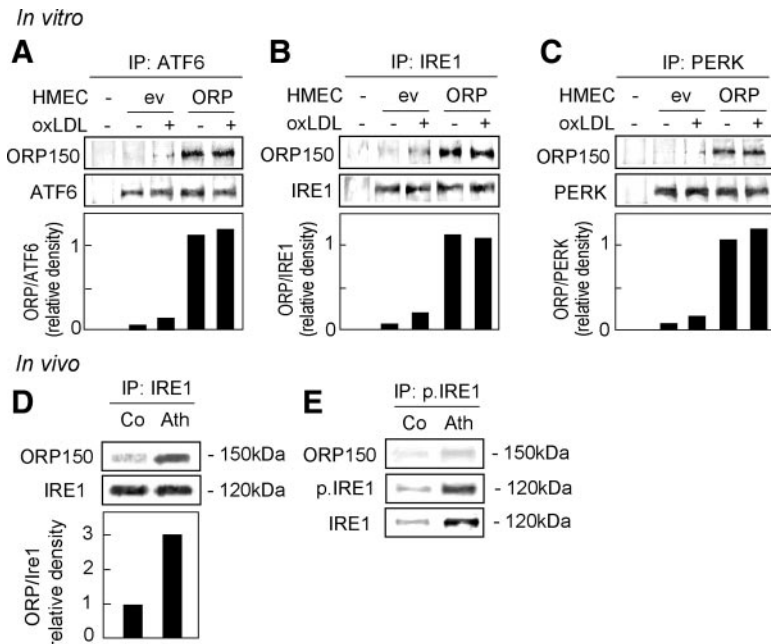


Figure 8. ORP150 interacts with ER stress sensors. ATF6 (A), PERK (B), and Ire1 α (C) were immunoprecipitated from cell extracts of ev-HMECs and ORP-HMECs under basal unstimulated conditions and after 14 hours of incubation with oxLDLs (200 mg/L) and were immunoblotted with their corresponding antibodies and with the anti-ORP150 antibody. These data are representative of 3 separate experiments. D and E, Immunoprecipitation experiments of Ire1 α (D) and phospho-Ire1 α (E) from human normal mammary artery used as control (Co) and from advanced carotid atherosclerotic plaque (At). The same amount of tissular protein homogenate was used for each immunoprecipitate. Western blots were revealed with anti-ORP150 and anti-Ire1 α (D and E) and antiphospho-Ire1 α antibodies (E).

precipitation experiments, in agreement with the results reported for BiP (GRP78) by Bertolotti et al¹⁸ showing that the interactions between BiP and PERK, or Ire1 α , implicate the nonphosphorylated form of the sensors.

The role of ER chaperones in atherosclerosis is still unclear. In a recent review, Ni and Lee⁵⁶ report the beneficial properties of GRP78 overexpression, which could slow down the progression of atherosclerosis through several mechanisms including (1) modulation of ER stress (mediated by homocysteine); (2) inhibition of vascular cell apoptosis; (3) inhibition of tissue factor procoagulant activity; and (4) inhibition of sterol regulatory element binding protein activation; sterol regulatory element binding proteins are involved in the activation of genes of the cholesterol and triglyceride biosynthesis pathways. Interestingly mice overexpressing ORP150 exhibit severe growth retardation and vacuolar muscle degeneration but also low serum concentration of triglycerides, cholesterol, and insulin, as well as increased glucose catabolism,⁵⁷ in agreement with Nakatani et al,⁵³ who report a beneficial role of ORP150 on insulin resistance and glucose tolerance.

These reports, as well as our data on the increased expression of ORP150 in advanced carotid lesions, suggest a protective role for ORP150 against ER stress, deregulation of calcium homeostasis,²⁷ and apoptosis, and thereby support speculation that ORP150 expression could be beneficial under the local challenging conditions of severe atherosclerosis. In contrast, ORP150 downregulation could aggravate vascular apoptosis, thereby increasing the risk of plaque rupture, thrombosis, and cardiovascular events.

Acknowledgments

Dr Virginie Gallet (Société Nationale des Chemins de Fer Laboratory, Toulouse, France) is gratefully acknowledged for providing human sera. We thank Elodie Mucher, Marie-Hélène Grazide, and Corinne Bernis for excellent technical assistance.

Sources of Funding

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, L'Agence Nationale de Recherches (LISA project no. ANR-05-PCOD-019-01); Université Paul Sabatier, Fondation Coeur et Artères (FCA-06T6); Fondation pour la Recherche Médicale (DCV2007040927); and European COST-B35. M.S. is the recipient of a Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire grant.

Disclosures

None.

References

- Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991;88:1785–1792.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233–241.
- Salvyre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvyre A. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1585:213–221.
- Auge N, Garcia V, Maupas-Schwalm F, Levade T, Salvyre R, Negre-Salvyre A. Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1990–1995.
- Vindis C, Escargueil-Blanc I, Uchida K, Elbaz M, Salvyre R, Negre-Salvyre A. Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:639–645.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1135–1143.
- Holvoet P, Collen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB J.* 1994;8:1279–1284.
- Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1010:698–709.
- Zhou J, Werstuck GH, Lhoták S, de Koning AB, Sood SK, Hossain GS, Möller J, Ritskes-Hoitinga M, Falk E, Dayal S, Lentz SR, Austin RC. Association of multiple cellular stress pathways with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2004;110:207–213.
- Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K, Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Mochizuki N, Kitakaze M. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation.* 2007;116:1226–1233.
- Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol.* 2004;14:20–28.
- Treiman M. Regulation of the endoplasmic reticulum calcium storage during the unfolded protein response—significance in tissue ischemia? *Trends Cardiovasc Med.* 2002;12:57–62.
- Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J.* 2007;274:630–658.
- Ma Y, Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat.* 2004;28:51–65.
- Bando Y, Katayama T, Kasai K, Taniguchi M, Tamatani M, Tohyama M. GRP94 (94 kDa glucose-regulated protein) suppresses ischemic neuronal cell death against ischemia/reperfusion injury. *Eur J Neurosci.* 2003;18:829–840.
- Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem.* 2003;278:20915–20924.
- Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, Ozawa K, Kitao Y, Hori O, Stern DM, Yamauchi A, Ogawa S. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death. *FASEB J.* 2004;18:1401–1403.
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000;2:326–332.
- Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 2006;7:880–885.
- Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004;11:381–389.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest.* 2005;115:2656–2664.
- Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ.* 2004;11:372–380.
- Aleshin AN, Sawa Y, Kitagawa-Sakakida S, Bando Y, Ono M, Memon IA, Tohyama M, Ogawa S, Matsuda H. 150-kDa oxygen-regulated protein attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2005;38:517–525.
- Bando Y, Ogawa S, Yamauchi A, Kuwabara K, Ozawa K, Hori O, Yanagi H, Tamatani M, Tohyama M. 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) functions as a novel molecular chaperone in MDCK cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278:C1172–C1182.
- Tsukamoto Y, Kuwabara K, Hirota S, Ikeda J, Stern D, Yanagi H, Matsumoto M, Ogawa S, Kitamura Y. 150-kD oxygen-regulated protein is expressed in human atherosclerotic plaques and allows mononuclear phagocytes to withstand cellular stress on exposure to hypoxia and modified low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1996;98:1930–1941.
- Tanaka K, Tsutsumi S, Ishihara T, Mima S, Suzuki K, Ogawa S, Mizushima T. Up-regulation of 150-kDa oxygen-regulated protein by celecoxib in human gastric carcinoma cells. *Mol Pharmacol.* 2007;71:860–870.
- Sanson M, Ingueneau C, Vindis C, Thiers JC, Glock Y, Rousseau H, Sawa Y, Bando Y, Mallat Z, Salvyre R, Nègre-Salvyre A. Oxygen-regulated protein-150 prevents calcium homeostasis deregulation and apoptosis induced by oxidized LDL in vascular cells. *Cell Death Differ.* 2008;15:1255–1265.
- Colles SM, Maxson JM, Carlson SG, Chisolm GM. Oxidized LDL-induced injury and apoptosis in atherosclerosis. Potential roles for oxyterols. *Trends Cardiovasc Med.* 2001;11:131–138.

29. Leonarduzzi G, Chiarpotto E, Biasi F, Poli G. 4-Hydroxynonenal and cholesterol oxidation products in atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res*. 2005;49:1044–1049.
30. Vindis C, Escargueil-Blanc I, Elbaz M, Marcheix B, Grazide MH, Uchida K, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Desensitization of platelet-derived growth factor receptor-beta by oxidized lipids in vascular cells and atherosclerotic lesions: prevention by aldehyde scavengers. *Circ Res*. 2006;98:785–792.
31. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxidant Redox Signal*. 2007;9:2277–2293.
32. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*. 2000;287:664–666.
33. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*. 2005;74:739–789.
34. Rutkowski DT, Kaufman RJ. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem Sci*. 2007;32:469–476.
35. Ma Y, Brewer JW, Diehl JA, Hendershot LM. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J Mol Biol*. 2002;318:1351–1365.
36. Ron D, Habener JF. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*. 1992;6:439–453.
37. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 2004;18:3066–3077.
38. Yamaguchi H, Wang HG. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2004;279:45495–45502.
39. McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*. 2001;21:1249–1259.
40. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*. 2002;16:1345–1355.
41. Schroeter H, Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem J*. 2001;358:547–557.
42. Yokouchi M, Hiramatsu N, Hayakawa K, Kasai A, Takano Y, Yao J, Kitamura M. Atypical, bidirectional regulation of cadmium-induced apoptosis via distinct signaling of unfolded protein response. *Cell Death Differ*. 2007;14:1467–1474.
43. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*. 1992;13:341–390.
44. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991;11:81–128.
45. Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C, O'dowd Y, Bens M, Vandewalle A, Gougerot-Pocidal MA, Lizard G, Ogier-Denis E. NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol*. 2004;24:10703–10717.
46. Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher EA, Marks AR, Ron D, Tabas I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol*. 2003;5:781–792.
47. Devries-Seimon T, Li Y, Yao PM, Stone E, Wang Y, Davis RJ, Flavell R, Tabas I. Cholesterol-induced macrophage apoptosis requires ER stress pathways and engagement of the type A scavenger receptor. *J Cell Biol*. 2005;171:61–73.
48. Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jurgens G, Borner C, Almeida L, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *FASEB J*. 2000;14:532–542.
49. Yu Z, Luo H, Fu W, Mattson MP. The endoplasmic reticulum stress-responsive protein GRP78 protects neurons against excitotoxicity and apoptosis: suppression of oxidative stress and stabilization of calcium homeostasis. *Exp Neurol*. 1999;155:302–314.
50. Kitao Y, Ozawa K, Miyazaki M, Tamatani M, Kobayashi T, Yanagi H, Okabe M, Ikawa M, Yamashita T, Stern DM, Hori O, Ogawa S. Expression of the endoplasmic reticulum molecular chaperone (ORP150) rescues hippocampal neurons from glutamate toxicity. *J Clin Invest*. 2001;108:1439–1450.
51. Ozawa K, Kuwabara K, Tamatani M, Takatsuji K, Tsukamoto Y, Kaneda S, Yanagi H, Stern DM, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Ogawa S, Tohyama M. 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death. *J Biol Chem*. 1999;274:6397–6404.
52. Kovacs P, Yang X, Permana PA, Bogardus C, Baier LJ. Polymorphisms in the oxygen-regulated protein 150 gene (ORP150) are associated with insulin resistance in Pima Indians. *Diabetes*. 2002;51:1618–1621.
53. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem*. 2005;280:847–851.
54. Hyoda K, Hosoi T, Horie N, Okuma Y, Ozawa K, Nomura Y. PI3K-Akt inactivation induced CHOP expression in endoplasmic reticulum-stressed cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340:286–290.
55. Jurgens G, Chen Q, Esterbauer H, Mair S, Ledinski G, Dinges HP. Immunostaining of human autopsy aortas with antibodies to modified apolipoprotein B and apoprotein(a). *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1689–1699.
56. Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett*. 2007;581:3641–3651.
57. Kobayashi T, Iguchi T, Ohta Y. Abetalipoproteinemia induced by overexpression of ORP150 in mice. *Comp Med*. 2007;57:247–254.

Supplement Material - CIRCRESAHA/2008/183749

Oxidized LDL trigger Endoplasmic Reticulum stress in vascular cells - Prevention by Oxygen Regulated Protein 150 expression.

Marie Sanson¹, Nathalie Augé¹, Cécile Vindis¹, Carole Muller¹, Yoshio Bando³, Jean-Claude Thiers^{1,2}, Marie-Agnès Marachet¹, Kamelija Zarkovic⁴, Yoshiki Sawa⁵, Robert Salvayre^{1,2}, Anne Nègre-Salvayre^{1,2}.

- ¹ - Inserm U-858; IFR-31; Vascular Biology Department, IFR-31, Toulouse, France.
- ² - University of Toulouse; Faculty of Medicine-Rangueil; Biochemistry and Molecular Biology Laboratory, Toulouse, France.
- ³ - Asahikawa Medical College, Department of Anatomy, Hokkaido 078-8510, Japan
- ⁴ - University of Zagreb and Clinical Hospital Centre, Division of Pathology, Zagreb, Croatia
- ⁵ - University of Osaka; Graduate School of Medicine, Division of Cardiovascular Surgery, Department of Surgery, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Mailing Address: Dr. A. Negre-Salvayre

INSERM U858 – Eq10 - IFR-31 and Biochimie - CHU Rangueil

1, avenue Jean Poulhès – BP84225 - 31432 Toulouse Cedex 4 - France.

Tel. (33) 561-32-27-05 - **Fax** (33) 561-32-20-84

e-mail: anne.negre-salvayre@inserm.fr

Expanded Materials and Methods

Chemicals and reagents

Anti-ORP150 antibody was from IBL (Gunma, Japan). Anti-phospho-eIF2 α and phospho-JNK were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA), anti-phospho-Ire1 α from Affinity BioReagents and anti- β -actin from Sigma-Aldrich. Anti-Ire1, anti-ATF6, anti-KDEL, anti-PERK, anti-phospho-PERK, and secondary antibodies were from Santa Cruz (Tebu-France), anti-4-HNE monoclonal antibody was from Oxis Int (Foster City, CA). Acrylamide-4X/bisacrylamide-2X solution, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) were from Euromedex (Souffelweyersheim, FR). SYTO-13, propidium iodide (PI), and red Alexa Fluor secondary antibody were from Molecular Probes (Invitrogen, San Diego, CA). 4-hydroxynonenal was from Calbiochem (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ). 7 ketocholesterol, N-acetyl-L cysteine (NAC), and other reagents were from Sigma-Aldrich.

LDL isolation and oxidation

LDL from human pooled sera were prepared and oxidized by UVC/copper under the previously reported conditions¹. Mildly oxidized LDL (oxLDL) used here contained 71-104 nmol lipid hydroperoxide/mg apoB and 6.4-9.7 nmol TBARS/mg apoB, under standard conditions.

Evaluation of cell viability, apoptosis and necrosis.

Cytotoxicity was estimated using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay^{2,3}. Apoptosis and necrosis were evaluated using a two-color fluorescence live/dead assay, using 2 vital fluorescent dyes, 0.6 μ M SYTO-13 (a permeant DNA intercalating green-colored probe) and 15 μ M propidium iodide (a non permeant intercalating red probe), as described⁴. Live cells (green nucleus with normal morphology), cells with necrotic (red) nucleus and apoptotic cells (green nucleus with apoptotic features) were counted by using an inverted fluorescence microscope (Fluovolt FU, Leitz).

Fluorogenic assay for caspase (DEVDase) activity

DEVDase (caspase) activity was determined as previously reported³. Briefly, cells were lysed in ice-cold 10 mmol/L Tris-HCl buffer pH 7.4 (containing 10 g/L NP-40, 200 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 5 mg/L leupeptin, aprotinin and 100 μ mol/L PMSF).

The assay mixture, containing 100 μ L of the cell lysate and 100 μ L of 40 μ mol/L Ac-DEVD-AMC, was incubated for 30 min, and the released fluorescent product AMC (aminomethylcoumarin) was determined by fluorometry (excitation and emission wavelengths, 351 and 430 nm, respectively).

Cell culture and transfection by ORP150 plasmid and by ORP150 and Ire1 α siRNAs

HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cell) (Dr. Candal, CDC, Atlanta), were grown in MCDB-131 culture medium supplemented with 10% fetal calf serum and 40 μ mol/L of glutamine. Subconfluent HMEC-1 were transfected with 10 μ g of ORP150 sense plasmid⁵ (ORP-HMEC) or with empty vector (ev-HMEC), using 20 μ L of lipofectamine (Invitrogen), and cultured in the presence of G418 (1.5 mg/L) (PAA laboratories), as reported⁵. Scrambled and ORP150 siRNA were from Dharmacon (Smartpool Accession number: NM_006389), scrambled and Ire1 α siRNAs were a pool of 3 sequences from Santa Cruz Biotechnology. SiRNA were transfected under the previously used conditions⁵. Cells were starved in serum-free medium for 12 h before the experiments.

Immunocytochemistry

Cells grown on glass cover slides, were washed with PBS and fixed in cold methanol for 10 min, then incubated with the respective antibodies, revealed with Alexa Fluor-conjugated secondary antibody, and visualized using a Zeiss LSM 510 fluorescence confocal microscope.

Immunohistochemistry

Segments of ascending thoracic aortal arch were obtained at autopsy from patients with non-cardiac death (40 to 70 years old). Human advanced carotid plaques (patients 70-75 years old) were obtained after endarterectomy (Cardiovascular Surgery Department, CHU Toulouse, Pr. Y. Glock). Each specimen was formalin-fixed and paraffin embedded. Serial 3 μ m thin sections of each sample were characterized by hemalun/eosin staining, and were incubated with the antibodies, anti-phospho-Ire1 α , anti-KDEL, anti-4-HNE-adducts, anti-CD68, and anti- α -actin. After incubation with appropriate biotin-labelled antibody, sections were revealed by using avidin-biotin horseradish peroxidase visualization system (Vectastain, ABC kit Elite, Vector Laboratories).

Western blot analysis

Cultured HMEC and human vascular tissue samples, were homogenized in extraction buffer, and used for SDS-PAGE/immunoblotting either as total protein extracts or after immunoprecipitation experiments, as previously described ¹.

Quantitative and semi-quantitative RT-PCR analysis

Cells were trypsinized and washed in PBS, then diluted in SV RNA lysis buffer (Promega) and placed at -80°C until use. Total extract was purified (Promega) and equal amounts of total RNA were reverse transcribed by using a random hexamer and Superscript II Reverse Transcriptase (Fermentas). Expression levels of human XBP1, CHOP and housekeeping β -actin (Eurogentec) mRNAs were determined by using the specific primer as follows: XBP1 (5'- TGG AAC AGC AAG TGG TAG ATT TAG AA-3') and reverse total XBP1 (5'- CAT CCC CAA GCG CTG TCT T-3'), forward CHOP (5'-CAG ATG AAA ATG GGG GTA CCT-3') and reverse CHOP (5'- AGA AGC AGG GTC AAG AGT GGT-3'), and forward β -actin (5'-AAA-TCT-GGC-ACC-ACA-CCT-TC-3') and reverse β -actin (5'AGC-ACT-GTG-TTG-GCG-TAC-AG-3'). cDNA were amplified (Taq polymerase Promega) and PCR products were analyzed on 3% agarose gel stained with ethidium bromide.

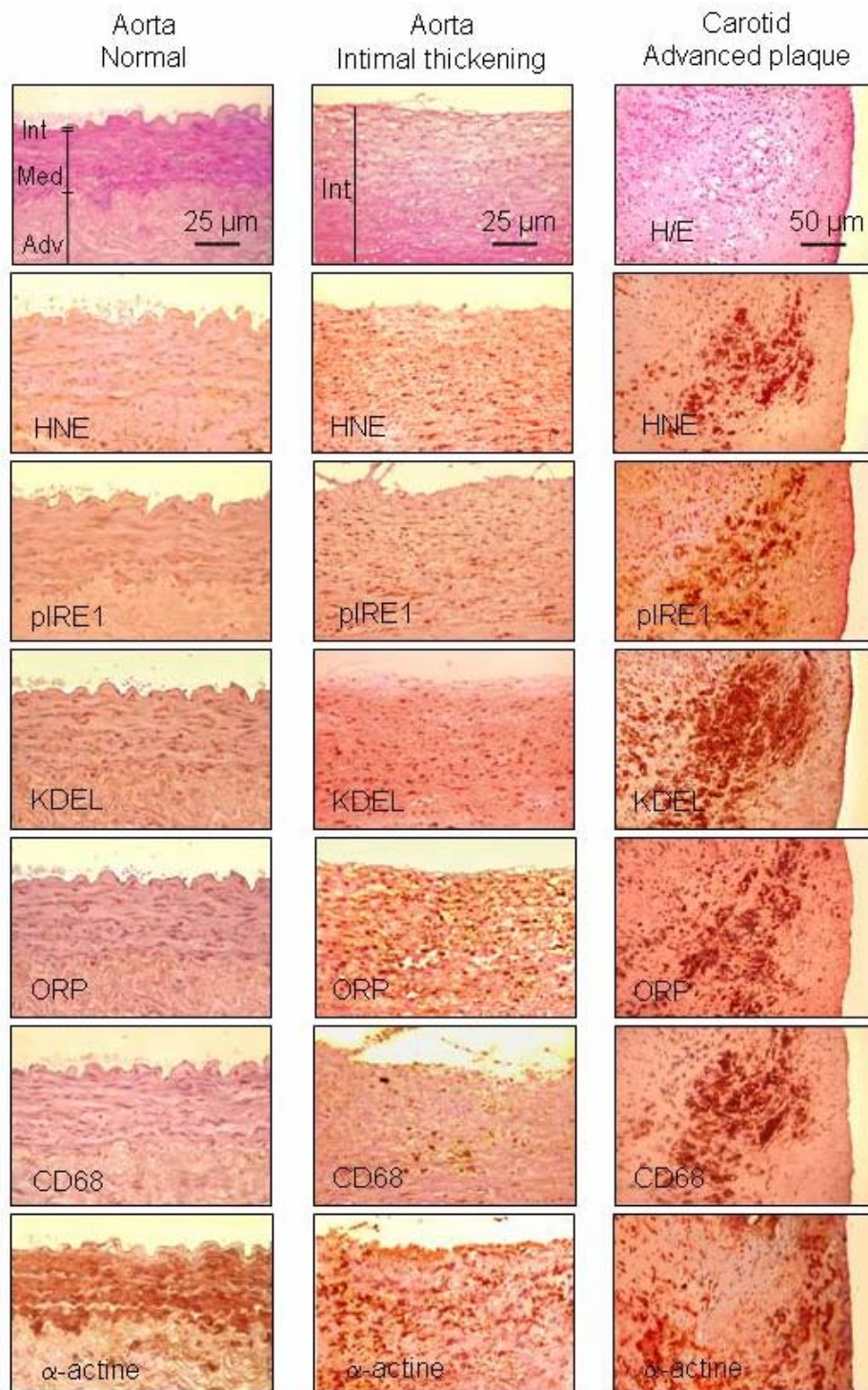
For Real-Time Quantitative PCR Analysis, the expression levels of CHOP and total XBP1, were determined by using the above cited primers, forward spliced XBP1 (5'- GCA GGT GCA GGC CCA GT-3') and reverse spliced XBP1 (5'- GAA TGC CCA ACA GGA TAT CAG ACT-3'), forward GAPDH (5'- CCT CCC GCT TCG CTC TCT-3') and reverse GAPDH (5'- CCT CCC GCT TCG CTC TCT-3'). The Fast SYBR Green MasterMix (Applied Biosystems) and the StepOne PlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems) were used to detect the real-time quantitative PCR products of reverse-transcribed cDNA samples according to the manufacturer's instructions. The incubation conditions were as follows : 95°C for 20 s, followed by 40 cycles of 3 s at 95°C, annealing/extension for 30 s, at 60°C. For each sample, PCR were done in duplicate for both the target genes and GAPDH control. The data were analyzed using StepOne Software v2.0.

Statistical analysis

Data are given as mean \pm SEM. Estimates of statistical significance were performed by ANOVA (Tukey test - SigmaStat software). Values of P < 0.05 were considered significant.

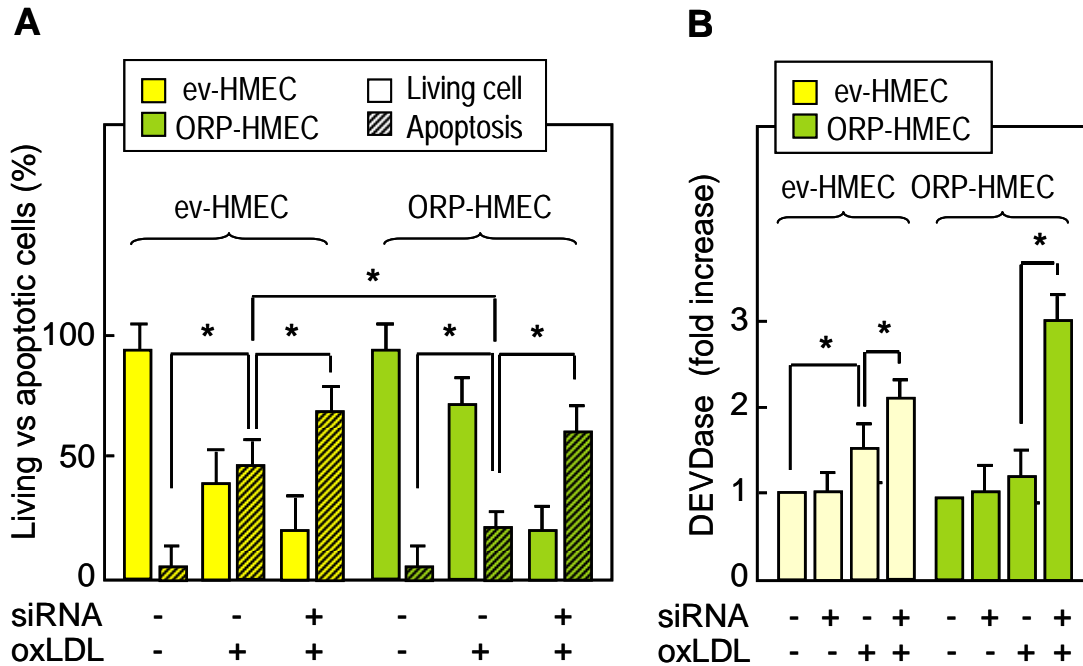
Additional Results

ER stress markers in atherosclerotic lesions

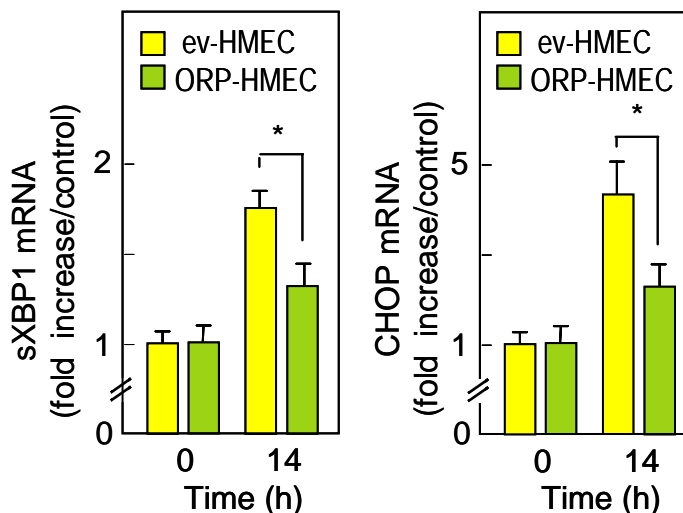


Supplemental Figure I: Induction of ER stress and UPR in the vascular wall. Paraffin sections of arteries obtained at autopsy and carotid plaques from endarterectomy were analyzed. From left to right, normal control (human aorta), stable plaque from human ascending aorta, and human carotid advanced plaque. Int, intima; Med, Media; Adv, adventice. From top to bottom, hematoxylin/eosin (H/E) staining, and immunostaining for 4-HNE-adduct (HNE), phospho-Ire1 α (pIre1), KDEL, ORP150, CD68 and α -actin. These pictures are representative of analysis for 3 separate normal control aortas, 3 human ascending aortas with intimal hyperplasia and 3 advanced carotid plaques. The scale bars represent 25 μ m (normal aorta and aorta with intimal thickening), and 50 μ m (advanced carotid plaque).

ORP150 expression inhibits ER stress and apoptosis induced by oxLDLs.



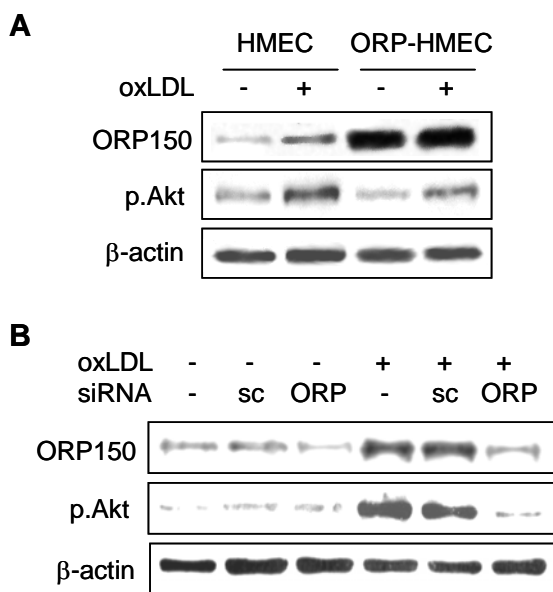
Supplemental Figure II: ORP150 overexpression inhibits apoptosis induced by oxLDLs. Empty vector-transfected HMEC-1 (ev-HMEC), and ORP150-transfected HMEC-1 (ORP-HMEC) were treated (or not) with ORPsiRNA and stimulated by oxLDLs (200 mg/L) for 18h. In A, cell count of living, apoptotic and necrotic cells after Syto13/PI staining, as described in Methods. In B, DEVDase activity evaluated by the fluorometric assay. The data are mean \pm SEM of 3 separate experiments. * $p < 0.05$.



Supplemental Figure III: ORP150 overexpression inhibits ER stress induction by oxLDLs. ORP-HMEC and ev-HMEC were (or not) stimulated by oxLDLs (200 mg/L) for 14h. The levels of mRNAs for sXBP1 and CHOP, normalized to GAPDH mRNA levels were evaluated by qPCR. The data (expressed as % of the control) are mean \pm SEM of 3 separate experiments. * $p < 0.05$.

ORP150 down-regulation by siRNA inhibits Akt phosphorylation induced by oxLDLs.

Since it has been reported that ORP150 may regulate Akt activation⁶, and since Akt down-regulation by ER stress results in increased CHOP expression and apoptosis⁷, we checked the phosphorylation (activation) status of Akt in wt-HMEC, in HMEC-1 overexpressing ORP150 (ORP-HMEC), and in HMEC-1 silenced for ORP150 by specific siRNA. As previously reported¹, 2 h incubation of cells with oxLDL (100 mg/L) resulted in Akt phosphorylation in wt-HMEC, like in wt-HMEC¹, and in ORP-HMEC (supplemental Fig.IVA). In contrast, the phosphorylation of Akt was strongly inhibited in cells pre-treated with ORP150 specific siRNA, but not with scrambled siRNA (supplemental Fig.IVB), thus indicating that ORP150 expression may participate in the regulation of Akt, in agreement with Nakatani et al⁶. This suggests that increased oxLDL-induced apoptosis observed in ev-HMEC silenced for ORP150 may result, at least in part, from Akt inhibition, as previously reported in SMC¹.



Supplemental Figure IV: ORP150 expression regulates the oxLDL-induced Akt phosphorylation. A. Wt-HMEC and ORP-HMEC were incubated with oxLDLs (100 mg/L, for 2 h) and the phosphorylation (activation) of Akt was revealed on immunoblots from cell extracts using anti-phosphoAkt (middle band). ORP150 level (upper band) and β-actin, used as control (lower band). B. Wt-HMEC and ORP-HMEC, pre-treated (or not) with ORP-specific siRNA, were incubated with oxLDLs (100 mg/L, for 2 h), and cell extracts were used for western blots performed under the conditions used in A. These data are representative of 4 separate experiments.

References

- 1 - Auge N, Garcia V, Maupas-Schwalm F, Levade T, Salvayre R., Negre-Salvayre A. Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1990-1995.
- 2 - Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 3 - Vindis C, Elbaz M, Escargueil-Blanc I, Augé N, Heniquez A, Thiers JC, Nègre-Salvayre A, Salvayre R. Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:639-645.
- 4 - Meilhac O, Escargueil-Blanc I, Thiers JC, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Bcl-2 alters the balance between apoptosis and necrosis, but does not prevent cell death induced by oxidized low density lipoproteins. *FASEB J.* 1999;13:485-494.
- 5 - Sanson M, Ingueneau C, Vindis C, Thiers JC, Glock Y, Rousseau H, Sawa Y, Bando Y, Mallat Z, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Oxygen-regulated protein-150 prevents calcium homeostasis deregulation and apoptosis induced by oxidized LDL in vascular cells. *Cell Death Differ.* 2008;15:1255-1265.
- 6 - Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, Ogawa S, Hori M, Yamasaki Y, Matsuhisa M. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem.* 2005; 280:847-851.
- 7 - Hyoda K, Hosoi T, Horie N, Okuma Y, Ozawa K, Nomura Y. PI3K-Akt inactivation induced CHOP expression in endoplasmic reticulum-stressed cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 340:286-90.

Oxidized LDLs trigger endoplasmic reticulum stress and autophagy

Prevention by HDLs

Carole Muller,¹ Robert Salvayre,^{1,2} Anne Nègre-Salvayre¹ and Cécile Vindis^{1,*}

¹INSERM U-1048/I2MC; ²Faculty of Medicine; University Paul Sabatier; Toulouse, France

Oxidized LDLs (oxLDLs) induce various cellular dysfunctions potentially implicated in the pathogenesis of atherosclerosis. For instance, toxic concentrations of oxLDLs trigger ER stress, autophagy and apoptosis. High-density lipoproteins (HDLs) counteract several adverse biological effects triggered by oxLDLs. Our recent study reveals that HDLs inhibit the activation of ER stress and of autophagy induced by oxLDLs.

LDLs are thought to become atherogenic when they infiltrate atherosclerosis-prone regions of the artery, where they are modified through oxidation, enzymatic attack, aggregation and glycation. Oxidized LDLs (oxLDLs) play a crucial role in the formation and the progression of atherosclerotic lesions, by triggering lipid storage, local inflammation and toxic events that may participate in vascular wall injury, plaque erosion/rupture and subsequent atherothrombosis. The proapoptotic effects of oxLDLs are mediated through a complex sequence of signaling events that lead to the activation of caspase-dependent or caspase-independent apoptotic pathways. We previously reported that treatment of human vascular endothelial and smooth muscle cells with oxLDLs induced a sustained rise of cytosolic calcium leading to the activation of the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway. The cytosolic calcium deregulation triggers a proteolytic cascade involving calcium-dependent calpains, Bid cleavage and cytochrome *c* release, leading finally to caspase-3 activation.

A growing body of evidence indicates that ER stress plays a crucial role in both

atherosclerosis and plaque rupture. Early lesions and advanced atherosclerotic plaques have a pathophysiological environment that causes ER stress due to the presence of oxidized lipids, inflammation and metabolic stress. ER stress represents adaptive and protective responses to perturbations in ER function via the activation of cytoplasmic and nuclear signaling pathways, collectively termed the unfolded protein response (UPR), leading to upregulation of ER resident chaperones, inhibition of protein synthesis and activation of protein degradation. Sustained and unresolved ER stress can lead to apoptotic cell death via the induction of the proapoptotic transcriptional factor C/EBP homologous protein (CHOP), activation of c-jun amino-terminal kinase (JNK) and members of the Bcl-2 family.

Accumulating data now point out that autophagy is activated under ER stress conditions. Although autophagy is primarily a protective process that plays a role in recycling substance and energy for cell survival, excessive autophagic activity can lead to non-apoptotic cell death in the case of prolonged ER stress, or when apoptotic pathways are defective. However, despite the increasing interest in autophagy in various pathophysiological situations such as neurodegeneration, cancer and cardiac myopathies, the process remains poorly understood with regard to atherosclerosis.

High-density lipoproteins (HDLs) display antioxidant, antiapoptotic and anti-inflammatory properties involved in their antiatherogenic effect. Recently, the anti-inflammatory role of HDLs has been linked to a reduced induction of ER stress by oxidized phospholipids. To

Key words: oxidized LDL, HDL, apoptosis, endoplasmic reticulum stress, autophagy

Submitted: 01/25/11

Revised: 01/27/11

Accepted: 01/28/11

DOI:

*Correspondence to: Cécile Vindis;
Email: cecile.vindis@inserm.fr

Punctum to: Muller C, Salvayre R, Nègre-Salvayre A, Vindis C. HDLs inhibit endoplasmic reticulum stress and autophagic response induced by oxidized LDLs. *Cell Death Differ* 2010; In press; PMID: 21113143; DOI: 10.1038/cdd.2010.149.

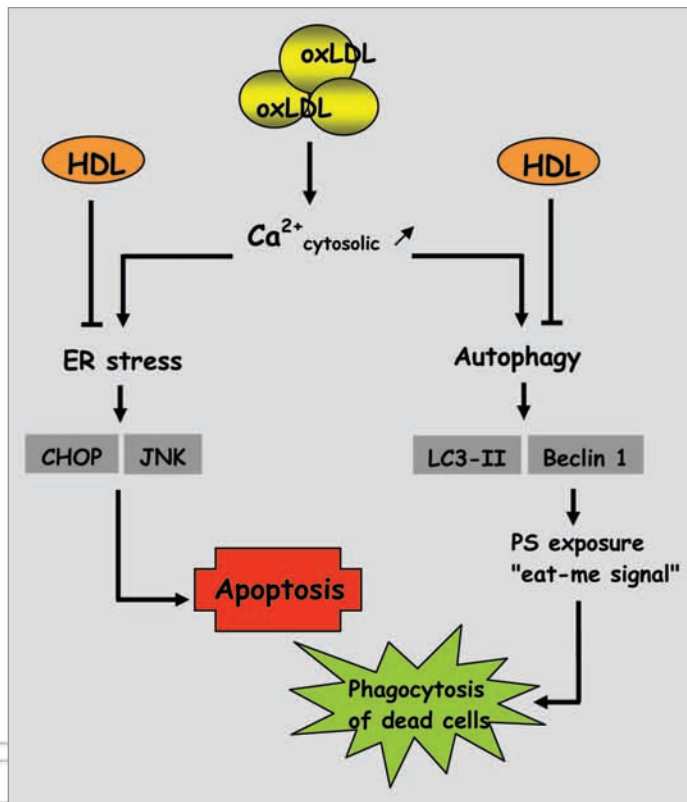


Figure 1. Schematic drawing describing the activation of ER stress and autophagy by oxLDLs in human endothelial cells, and the inhibitory effect of HDLs. Cytosolic calcium deregulation mediated by oxLDLs triggers ER stress and autophagy. The long-lasting ER stress induced by oxLDLs leads to apoptotic signaling as shown by increased expression of the pro-apoptotic transcription factor CHOP and activation of JNK. Concomitantly, oxLDLs provoke the conversion of LC3-I to the lipidated form, LC3-II and an increased expression of the autophagy regulator Beclin 1, which takes part in the PS exposure process, as the "eat-me" signal is required for dead-cell clearance. Pretreatment of cells with HDLs prevents ER stress and autophagy activation thus suggesting that HDLs may act upstream, probably by inhibiting a signaling pathway common to ER stress-induced apoptosis and autophagy.

more deeply investigate the mechanisms mediating the protective role of HDLs, we studied whether ER stress and autophagy were implicated in oxLDLs-induced apoptosis and whether HDLs prevented these stress processes.

We report that HDLs inhibit in human endothelial cells, the phosphorylation (i.e., activation) of IRE1 α , a proximal sensor of ER stress, and of eIF2 α , a substrate of PERK, as well as the nuclear translocation of ATF6 triggered by oxLDLs. The long-lasting ER stress induced by oxLDLs, leads to apoptotic signaling as shown by increased expression of the pro-apoptotic transcriptional factor CHOP and activation of the IRE1 α -TRAF2-JNK pathway, all events being prevented by HDLs pretreatment. The inhibitory effect of HDLs against the pro-apoptotic arm of ER stress

highlights a new mechanism in the anti-apoptotic properties of HDLs.

An important consideration in the study of ER stress-induced apoptosis is that the initial ER stress is often accompanied by activation of cell survival signaling pathways, such as autophagy, which are overwhelmed when the apoptotic stress rises. We demonstrated that oxLDLs induce the conversion of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) to the lipidated form, LC3-II, and an increased expression of the autophagy regulator Beclin 1, these events being concomitant with the activation of ER sensors. Our findings are consistent with recent reports showing that 7-ketocholesterol, one of the major oxysterols present in oxLDLs and lipid peroxidation-derived aldehyde (4-hydroxynonenal) trigger autophagic signaling.

Unexpectedly, pretreatment of human endothelial cells with HDLs prevents the increase in LC3-II and Beclin 1 expression, thus suggesting that HDLs may act upstream, probably by inhibiting a signaling pathway common to ER stress-induced apoptosis and autophagy.

Another surprising result of our study is that oxLDLs-induced autophagy is independent of the ER stress apoptotic pathway. Indeed, silencing of Beclin 1 by siRNA does not alter the whole apoptotic program (metabolic status and morphological characteristics of apoptosis) triggered by oxLDLs, but reduces significantly the proportion of annexin V-staining in oxLDLs-exposed cells. These intriguing discrepancies led us to study whether Beclin 1 takes part in the phosphatidylserine exposure process, as an "eat-me" signal is required for dead-cell clearance.

Using a phagocytosis assay, we found that endothelial cells silenced for Beclin 1 and exposed to oxLDLs exhibit less recognition and uptake by phagocytic macrophages. These results suggest that Beclin 1 is involved in the generation of engulfment signals required for the phagocytic removal of dying cells exposed to oxLDLs.

Finally, we provide evidence that the cytosolic calcium deregulation mediated by oxLDLs is a common signaling pathway that mediates ER stress-induced cell death and autophagy (Fig. 1). Our results are further supported by recent studies showing that elevation of cytosolic calcium is a strong inducer of ER stress and autophagy, as previously shown in response to calcium-mobilizing stimuli such as ATP, thapsigargin or vitamin D analogs. Moreover, we report for the first time that the inhibitory effect of HDLs towards oxLDLs-induced ER stress and autophagy is mediated by their ability to prevent the cytosolic calcium rise.

In conclusion, our study highlights that the ER stress triggered by oxLDLs is associated with autophagy activation, which is not involved in oxLDLs-induced apoptosis, but contributes to the exposure of PS as an "eat-me" signal involved in the efferocytosis of apoptotic cells. From a pathophysiological point of view, the new protective role of

HDLs on oxLDLs-induced ER stress and autophagy is important to better understand the anti-atherogenic role of these lipoproteins, and may help for the future direction for HDLs-based therapy development.

Acknowledgements

This work was supported by Institut National de la Santé et de la recherche Médicale, la “Fondation Coeur et Artères” n° FCA06T6, et la Fondation pour la Recherche Médicale n° DCV2007040927.

©2011 Landes Bioscience.
Do not distribute.

