HAL
open science

Contrôle métabolique de la production et de la clairance des monocytes dans les pathologies inflammatoires

Manon Viaud

To cite this version:

Manon Viaud. Contrôle métabolique de la production et de la clairance des monocytes dans les pathologies inflammatoires. Interactions cellulaires [q-bio.CB]. Université Côte d'Azur, 2018. Français. NNT : 2018AZUR4033 . tel-01881169

HAL Id: tel-01881169

https://theses.hal.science/tel-01881169

Submitted on 25 Sep 2018

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

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

UNIVERSITÉ CÔTE D'AZUR

ÉCOLE DOCTORALE
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Inserm U1065

THÈSE DE DOCTORAT

Contrôle métabolique de la production et de la clairance des monocytes dans les pathologies inflammatoires

Manon VIAUD

Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)

Présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Interactions moléculaires et cellulaires de l'Université Côte d'Azur

Dirigée par : Dr. **Laurent YVAN-CHARVET**
Soutenue le : 18 Mai 2018

Devant le jury, composé de :
Pr. **Giulia CHINETTI**, *Président*, UCA/U1065
Dr. **Wilfried LE GOFF**, *Rapporteur*, UPMC/ UMRS 1166
Pr. **David MASSON**, *Rapporteur*, Université de Bourgogne, INSERM/UMR1231
Dr. **Naomi TAYLOR**, *Examinateur*, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, CNRS
Pr. **Philippe VALET**, *Examinateur*, Université Toulouse III, INSERM/UMR1048

LA LIGUE CONTRE LE CANCER

Région Provence Alpes Côte d'Azur

Contrôle métabolique de la production et de la clairance des monocytes dans les pathologies inflammatoires

JURY

Présidente du jury
Professeur Giulia CHINETTI, Professeur des Universités, Université Côte d'Azur, INSERM U1065

Rapporteurs
Docteur Wilfried Le Goff, Chargé de Recherche, Médecine Sorbonne Université, INSERM UMRS1166

Professeur David MASSON, Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Bourgogne, INSERM U866

Examinateurs
Docteur Naomi TAYLOR, Directeur de Recherche, CNRS-UMR 5535

Professeur Philippe VALET, Professeur des Universités, Université Paul Sabatier Toulouse III, INSERM UMR 1048

Remerciements

En bref, je pense que tout est possible à qui rêve, ose, travaille et n'abandonne jamais.
*-**Xavier Dolan**, Cannes, 2014-*

Il est rare qu'on se souvienne des épisodes du chemin.
*-**Georges Brassens,** Les passantes-*

`

La vie est belle, le destin s´en écarte
Personne ne joue avec les mêmes cartes
Le berceau lève le voile, multiples sont les routes qu´il dévoile
Tant pis, on n´est pas né sous la même étoile.
*-**IAM**-*

Merci,

Aux membres du jury,

Je remercie tout d'abord les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.
En premier lieu, je tiens à remercier le **Professeur Giulia Chinetti** de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse.
Merci à mes rapporteurs, le **Professeur David Masson** et le **Docteur Wilfried Le Goff** d'avoir pris de leur temps précieux pour évaluer mon travail de thèse. Je vous remercie pour les remarques et l'intérêt que vous avez montré pour ce travail.
Je tiens aussi à vivement remercier mes examinateurs, le **Docteur Naomi Taylor** et le **Professeur Philippe Valet** qui m'ont fait le plaisir de lire mon travail de thèse. Merci d'avoir trouvé une place pour moi dans vos emplois du temps.

Aux financeurs,

Je remercie la **région Provence Alpes Cote d'Azur** (PACA) d'avoir financé ce projet de thèse. Je tiens aussi à vivement remercier **la Ligue contre le Cancer** qui m'a permis de terminer cette thèse dans les meilleures conditions en financement mes derniers mois de thèse.

A mes compagnons de route,

A **Laurent**, évidemment, mon directeur de thèse. Sans toi, rien n'aurait été possible. Tu es quelqu'un de brillant et tu as le bon goût de partager cette lumière avec les autres. Merci d'avoir été un directeur de thèse à l'écoute, patient et disponible. Je souhaite à tous les étudiants en thèse d'avoir un chef comme toi. Merci de m'avoir toujours soutenue, de m'avoir guidée, de m'avoir poussée plus haut que je ne l'aurais jamais fait, de m'avoir donné les moyens de réussir. Merci de m'avoir donné ma chance et d'avoir cru en moi. Cette thèse fera partie des belles aventures de ma vie !

A **Stoyan**, mon « compain(g) ». Merci pour ton aide précieuse, pour ton soutien, pour ta bonne humeur. Merci de m'avoir écouté quand j'en avais besoin, oreille précieuse et attentive. Merci pour tes conseils avisés. Merci d'avoir été mon binôme de labo, de congrès et d'aventures ! Je suis admirative de ton parcours. Tu mènes réussite personnelle et professionnelle avec une facilité déconcertante. Tu es quelqu'un de humble et de brillant.

A **Rodolphe**, merci pour ton humour et tes interventions toujours à propos. Merci aussi pour ton aide si importante sur tous les plans. Tu es un as, toujours capable de trouver une solution. Je suis toujours admirative des idées que tu peux avoir !

Aux autres membres actuels de l'équipe,

A **Johanna**, merci pour ton énergie, ton aide efficace, surtout ces derniers temps. Merci !! Que la suite de ta thèse soit brillante !

A **Marion A.**, merci d'avoir pris le relais pour beaucoup de choses ! Je pense que tu n'imagines pas à quel point cela m'a aidé. Merci de prendre soin de l'équipe. Merci pour la relecture de ce manuscrit, aide précieuse !!

A **Marion S.**, tu es une personne courageuse, bosseuse et déterminée. Je suis admirative de ta volonté ! Que ta thèse soit à ton image !

A **Julie**, merci de faire partie de ces gens motivés et motivants ! Que la suite de ta carrière soit belle ! Ne t'en fais pas trop, tu gères !

A **Gaël** et **Emma,** vous êtes arrivés un peu tard dans mon aventure. Merci pour votre soutien. Gaël, j'espère que tu réussiras dans cette équipe et dans cette nouvelle vie.

Aux anciens de l'équipe, avec qui j'ai commencé ou avec qui j'ai partagé quelques mois,

En particulier, merci à **Vincent**, qui m'a accueilli ici. A **Sophie**, technicienne hors pair, merci pour ton aide précieuse. Vous avez été d'une aide inestimable au commencent, à la base. Merci de l'avoir faite solide.

Aux différents stagiaires que j'ai croisé, **Clémence**, **Laura** et **Alexandre**. Merci d'avoir participé à la vie de l'équipe pendant quelques temps.

A **Lila**, au départ, nous étions juste collègues, et puis avec le temps, nous sommes devenues amies, merci pour tout.

A Thibault, je ne pouvais pas t'oublier dans cette liste. Merci d'avoir partagé ton expérience !

Aux autres membres du centre avec qui j'ai pu interagir,

Aux chercheurs avec qui j'ai pu discuter dans le centre, merci pour vos conseils et votre bienveillance envers la nouvelle génération. Merci de nous donner envie d'y croire.

Merci aux différents responsables de plateformes. Merci à **Maëva** pour la microscopie, je te souhaite une belle évolution. Merci à **Véronique** et au staff animalier, votre travail n'est pas dissociable du nôtre, merci pour votre aide. Merci à **Fred Larbret** pour ton aide pour la cytométrie.

Une pensée particulière pour **Carole**, gestionnaire au top ! Merci pour ton aide, non scientifique mais non moins importante. Merci pour tout. Une pensée aussi pour les autres gestionnaires **Dominique**, **Marie** et **Virginie**.

Dans l'ensemble, je voudrais remercier toutes les personnes qui ont rendu cette thèse plus simple tant sur le plan matériel qu'intellectuel, même si je ne vous nomme pas, votre rôle n'a pas été moins important.

A mes copain(g)s de thèse,

A **Bastien**, merci d'avoir été là au tout début, quand je ne connaissais personne et que je ne parlais pas encore bien le français ! A ta bonne humeur constante malgré tout. Merci d'avoir toujours des idées, de la motivation et de l'entrain. Je ne te souhaite que le meilleur pour la suite.

A **Gwenaelle**, tu mènes de front une vie de famille et fin de thèse, je suis admirative. Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton écoute ! Que ta vie d'après soit douce !

A **Lisa**, tu as été une oreille précieuse et attentive, merci pour cela. Merci pour ton aide précieuse, sans toi je ferai encore des radios des dents, pour tout le reste et j'en passe ! Que notre amitié dure ! Je te souhaite réussite et bonheur pour la suite !

A **Robin**, je suis admirative de la constance et du calme dont tu fais preuve. Parcours atypique pour un mec qui l'est tout autant. Tu mérites le meilleur mon petit !

A **Aurélie**, merci pour ton écoute, ton franc-parler et tes conseils avisés ! Merci d'avoir su m'écouter, d'avoir compris et d'être aussi bienveillante !

A **Emilie**, merci pour ta personnalité passionnée, contrastante, étonnante ! Tu es une fille en or. Plein de bonheur pour la suite !

A tous les autres, **Sofia**, **Pierre**, **Elodie** (la corse), **Elodie** (la toulousaine), **Déborah**, **Cynthia**, **Faustine**, **Njala**, **Lazaro**, … avec qui j'ai pu échangé durant ma thèse, merci d'avoir partagé un bout du chemin avec moi ! Soyez heureux ! Be happy ! Siate Felici !

Aux personnes avec qui j'ai travaillé auparavant,

Même si je vous ai déjà remercié plus haut, merci au **Professeur Philippe Valet**, pour votre soutien tout au long de ces années, pour votre bienveillance envers vos étudiants et pour votre gentillesse.

Merci au **Docteur Jean-Sébastien Saulnier-Blache**, j'ai commencé la Science avec toi, tu m'as donné ma première chance, cela ne s'oublie pas. Pour cela merci. Au passage, merci à **Sandra** et **Chloé** ainsi qu'aux **Docteurs Jean-Loup Bascand** et **Joost-Peter Schanstra.**

Merci au **Professeur Isabelle Castan** et au **Docteur Claude Knauf**, sans le savoir vous m'avez donné l'envie de faire de la recherche. Sans vos interventions dans mon parcours universitaire, je n'en serais pas là. Merci.

A mes proches,

A ma famille, à mes parents et mon frère,

A mes parents, merci. Ce n'est pas avec ces quelques mots que je pourrais exprimer tout ce que je vous dois. Merci pour votre soutien sans faille. Grâce à vous j'ai l'essentiel : des racines et des ailes.

A mon frère, **Maxime**, merci de me démontrer chaque jour que vivre de sa passion est possible. Merci de m'apprendre que le travail finit toujours par payer. A ton futur !

A tous les membres de ma famille, ce serait trop long de tous vous remercier un à un. Merci. Pensées particulières pour mon grand-père, **Alexandre**.

A mes amis, la famille que l'on choisit,

A **Nadia**, évidemment, merci d'être ce que tu es. Aussi forte, aussi lumineuse, comme une étoile. Force et Honneur. Merci pour ton soutien sans faille et de supporter ma folie.

A mon binôme, ma **Camille**. Merci d'avoir été un moteur par ton entrain, ta motivation et ta passion. Nous voilà toutes les deux Docteur ! Je réalise à quel point t'avoir à mes cotés est essentiel.

A **Christophe**, la force tranquille. A **Manon** N', qui dit et qui ose. A **Manon** ON', remarquable dans tout ce que tu fais. Vous avez été indispensables, vous le serez encore. A à **Marie** et **Charlotte T.** ne tardez pas à rentrer ! A mes camarades, **Alexandre** et **Charlotte M.**, moitié du quatuor de Master, votre réussite me réjouit !

A ceux qui sont entrés dans ma vie par surprise. A **Alexis**, merci pour ton soutien. A un m'en donné, merci quoi ! A **Marjorie**, toulousaine expatriée comme moi, merci pour tout.

A **Bernard**, **Dominique**, et **Jean-Alain,** merci pour votre soutien.

A **Sébastien**, merci pour tes visites ! A ta présence toujours agréable.

A tous les autres, que je ne cite pas, mais qui comptent. Vous vous reconnaitrez. Merci.

MERCI.

SOMMAIRE ET LISTE DES FIGURES

Résumé 1

Summary 2

Liste des abréviations 3

INTRODUCTION 7

I. L'athérosclérose, une maladie inflammatoire chronique 8

Figure 1: Récapitulatif de l'évolution de la plaque d'athérosclérose selon la classification de Stary 9

a- La description de la pathologie athéromateuse 8

b- Le métabolisme systémique du cholestérol 10

Figure 2: Le métabolisme systémique des lipoprotéines 11

Figure 3: Classification des différentes classes de lipoprotéines circulantes 12

b-1- Les chylomicrons (CM) ou l'absorption intestinale du cholestérol 12

b-2- L'excrétion trans-instestinale du cholestérol, le TICE 13

b-3- Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) ou le transport des lipides endogènes 14

b-4- Les lipoprotéines intermédiaires de faible densité 14

b-5- Les lipoprotéines de faible densité (LDL) ou le transport du cholestérol endogène et l'apport aux cellules périphériques 14

b-6- Les lipoprotéines de haute densité (HDL) et le retour inverse du cholestérol 15

b-6-A- Le rôle d'ABCA1 dans le retour inverse du cholestérol 15

Figure 4: Le transporteur ABCA1, ses différents domaines, son rôle dans l'efflux de cholestérol et sa régulation 17

b-6-B- Le rôle d'ABCG1 dans le retour inverse du cholestérol 19

Figure 5: Le transporteur ABCG1, représentation de sa structure schématique et son rôle dans l'efflux de cholestérol vers les HDL 20

b-6-C- Le rôle de SR-B1 dans le retour inverse du cholestérol 21

b-6-D- Le remodelage des particules d'HDL durant le RCT 22

b-6-E- La capture des HDL par le foie ou l'élimination du cholestérol 23

c- Le métabolisme intracellulaire du cholestérol 23

c-1- Les esters de cholestérol et le cholestérol libre 23

Figure 6: Le métabolisme intracellulaire du cholestérol 24

c-2- L'hydrolyse neutre des esters de cholestérol 25

c-3- Mobilisation du cholestérol, le rôle de l'autophagie et de la lipase acide lysosomale 26

c-4- Le trafic intracellulaire du cholestérol libre 27

c-5- Le cholestérol à la membrane plasmique 30

d- Les thérapies anti-athérosclérose actuelles et futures 31

d-1- Les modulateurs lipides, autres que les statines 32

d-2- L'augmentation du HDL-cholestérol 33

d-3- La modulation du métabolisme du glucose 33

II. Le rôle des cellules myéloïdes dans la pathologie athéromateuse 35

a- Le recrutement des monocytes au sein de la plaque d'athérosclérose 35

Figure 7: Le rôle des cellules méyloïdes dans les plaques d'athérosclérose 37

Figure 8: Les mécanismes de recrutement des monocytes dans les plaques d'athérosclérose 38

b- Le rôle de l'émigration et de la prolifération des cellules myéloïdes dans les lésions d'athérosclérose 40

c- Le rôle des macrophages dans la plaque d'athérosclérose et leurs différentes polarisations 42

c-1- Les macrophages M1, classiquement activés 42

Figure 9: Tableau récapitulatif des polarisations possibles des macrophages au sein des lésions d'athérosclérose 43

c-2- Les macrophages M2, alternativement activés 44

c-3- Les macrophages en conditions hémorragiques: M(Hb) et M(Heme) 45

c-4- Les macrophages en réponse au facteur PF4: M4 45

c-5- Les macrophages en réponse aux lipides oxydés 46

d- Le rôle de l'immuno-métabolisme des cellules myéloïdes au sein de la plaque d'athérosclérose 46

d-1- La capture des lipoprotéines par les macrophages 47

Figure 10: Le rôle des LDL et des LDL oxydées dans la formation des cellules spumeuses et dans le développement de la plaque d'athérosclérose 48

d-1-A- La capture des LDL via le SR-A1 49

d-1-B- La capture des LDL via le CD36 49

d-1-C- La capture des LDL via le récepteur LOX-1 50

d-1-D- La capture des LDL via le récepteur MARCO 50

d-2- Le défaut du métabolisme intracellulaire du cholestérol 50

d-3- Le défaut d'efflux du cholestérol des monocytes et des macrophages de la plaque 51

Figure 11: Le rôle bénéfique des HDL dans les lésions d'athérosclérose 52

d-3-A- Le rôle du transporteur ABCA1 dans l'efflux actif de cholestérol 53

d-3-B- Le rôle du transporteur ABCG1 dans l'efflux actif de cholestérol 55

d-3-C- Le rôle du transporteur SR-BI dans l'efflux actif de cholestérol 57

e- Le rôle du métabolisme du glucose et des lipides dans la polarisation des monocytes et des macrophages 57

e-1- Le rôle du métabolisme du glucose 58

e-2- Le rôle du métabolisme des lipides 59

f- Le rôle de l'efferocytose dans la plaque d'athérosclérose 60

Figure 12: Le défaut d'efferocytose dans les plaques d'athérosclérose induit une vulnérabilité de la plaque et un défaut de résolution de l'inflammation 61

f-1- Principes généraux de l'efferocytose 61

Figure 13: Le rôle des signaux « find-me » et « eat-me » dans la régulation de l'inflammation dans des conditions d'efferocytose 63

f-2- Rôle de l'efferocytose dans les plaques précoces d'athérosclérose 64
f-3- Rôle de l'efferocytose dans les plaques avancées d'athérosclérose 64
f-4- Le rôle de l'efferocytose dans la régulation de l'inflammation 65

III. Les cellules myéloïdes: les monocytes et les macrophages **69**
a- L'hématopoïèse et la myélopoïèse 69
Figure 14: La myélopoïèse et sortie de la moelle des monocytes **70**
b- La niche hématopoïètique et l'émigration des monocytes de la moelle osseuse 71
b-1- Le rôle des cellules non-hématopoïétiques dans la niche 71
b-2- La sortie des monocytes de la moelle osseuse ou leur mobilisation 72
c- La circulation des monocytes dans le sang 73
d- Les macrophages 74
d-1- La différenciation des monocytes en macrophages en conditions physiologiques 74
d-2- La différenciation des monocytes en macrophages en conditions inflammatoires 74
d-3- Les macrophages tissulaires résidents d'origine embryonnaire 75
Figure 15: Les macrophages résidents tissulaires et leur localisation **76**

IV. La régulation métabolique des cellules souches hématopoïétiques **77**
a- La régulation métabolique des cellules souches hématopoïétiques 77
a-1- La régulation des CSH par le métabolisme du glucose 77
Figure 16: Régulation des cellules souches hématopoïétiques par le métabolisme du glucose **82**
a-2- La régulation des CSH par le métabolisme des acides aminés 83
Figure 17: Régulation des cellules souches hématopoïétiques par le métabolisme des acides aminés et des lipides **84**
a-3- La régulation des CSH par le métabolisme des acides gras 85
a-4- La régulation des CSH par le métabolisme du cholestérol 86
Figure 18: Régulation des cellules souches hématopoïétiques par le métabolisme du cholestérol **89**

RÉSULTATS **90**
Papier 1 **91**
Papier 2 **93**
Projet 3 **95**
Annexe 1 **115**

DISCUSSION **116**
Figure 19: Schéma récapitulatif général **125**

Contrôle métabolique de la production et de la clairance des monocytes dans les pathologies inflammatoires

L'hématopoïèse permet la production des cellules sanguines à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH). La production des monocytes (ou myélopoïèse) est finement régulée, notamment au niveau métabolique. Les monocytes ont aussi pour but de se différencier en macrophages au sein des tissus où ils sont recrutés, où ils sont impliqués dans la phagocytose. Les cellules myéloïdes (monocytes et macrophages) sont au centre de nombreuses pathologies. Ma thèse s'est portée sur le rôle du métabolisme des cellules myéloïdes dans les pathologies inflammatoires, où une augmentation de la quantité de monocytes dans le sang est observée (i.e. monocytose).

Nous nous sommes intéressé à l'impact de l'altération du métabolisme du cholestérol dans la prolifération anarchique des monocytes, soit à leur cancérisation. La fonction majeure des HDL (High Density Lipoprotein) est de maintenir l'homéostasie cellulaire du cholestérol en enlevant l'excès de cholestérol, notamment par des mécanismes d'efflux du cholestérol. Nous avons étudié des mutations « perte de fonction » du transporteur ABCA1 (ATP-Binding Cassette A1) impliqué dans l'efflux de cholestérol. Ces mutations sont à l'origine d'une prolifération accrue des monocytes, soulignant l'impact du métabolisme lipidique dans la régulation de la prolifération cellulaire, et donc de l'apparition de cancer.

Nous nous sommes ensuite intéressés au métabolisme du glucose des cellules myéloïdes. En effet, en plus du métabolisme du cholestérol, le métabolisme du glucose est lui aussi largement impliqué dans la régulation de la myélopoïèse. Nous avons étudié le rôle du transporteur au glucose, Glut-1, dans un modèle murin d'athérosclérose. L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique, à l'origine des maladies cardiovasculaires. Nous avons démontré que les CSH et les progéniteurs myéloïdes sur-expriment le transporteur Glut-1, induisant une expansion des monocytes. Cette monocytose est à l'origine d'une accumulation de macrophages dans les lésions athéromateuses, ce qui provoque une inflammation locale et une augmentation du flux glycolytique. Chez les souris, après délétion de Glut-1 dans les cellules myéloïdes, nous avons démontré que la déficience en Glut-1 réduisait la prolifération des CSH et des progéniteurs, ainsi cela prévient la monocytose et le développement des plaques d'athérosclérose. Ces travaux identifient un nouveau mécanisme impliqué dans le développement de la pathologie athéromateuse. Glut-1 apparaît donc comme une cible thérapeutique dans le traitement de l'athérosclérose.

Je me suis intéressée au rôle de la lipase acide lysosomale (LIPA) dans la phagocytose des cellules apoptotiques (i.e. l'efferocytose) par les macrophages. Le nombre de monocyte est en équilibre entre production et clairance. Les macrophages ont un rôle nécessaire dans le contrôle de l'inflammation. Lorsqu'un macrophage phagocyte une cellule apoptotique, il ingère une grande quantité de cholestérol qui doit être dégradé pour maintenir l'homéostasie tissulaire. Nous avons pu montré que LIPA en est un acteur central, puisqu'elle est la seule enzyme lysosomale capable de dégrader le cholestérol. Après inhibition de cette enzyme, nous avons démontré que la production du 25- et du 27-hydroxycholestérol (25- et 27-OHC) était diminuée. Cela provoque un stress oxydatif mitochondrial, et active l'inflammasome NLRP3, contribuant à une inflammation chronique. L'altération de la production des 25- et 27-OHC réduit l'activation des LXR (Liver-X-Receptor), facteurs de transcription clés dans le métabolisme du cholestérol, connus pour maintenir l'équilibre inflammatoire. L'inhibition de LIPA induit un défaut d'efferocytose des macrophages de la rate et du foie, ce qui participe à l'apparition d'une inflammatoire chronique. L'hydrolyse acide du cholestérol par l'enzyme LIPA est un processus essentiel qui prévient l'inflammation métabolique en maintenant l'efficacité de l'efferocytose dans les tissus.

Mots clés : Monocytes, Macrophages, Inflammation, Immuno-métabolisme, Efferocytose.

Metabolic control of production and clearance of monocytes in inflammatory diseases

Blood cells are produced through a process called hematopoiesis originating from hematopoietic stem cells (HSCs). Differentiation towards myelopoiesis contributes to the production of myeloid cells including monocytes. In chronic inflammatory diseases, an increased amount of monocytes is observed in the blood (i.e. monocytosis). All the different steps leading to the myelopoiesis are fine-tuned regulated, notably at the metabolic level. My thesis focuses on the role of the myeloid cell metabolism in the context of chronic inflammatory diseases.

We focused on the impact of cholesterol metabolism alterations into the anarchic proliferation of monocytes (carcinogenesis) in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). Indeed, we have identified novel “loss of function” somatic mutations in the cholesterol efflux transporter ATP-Binding Cassette A1 (ABCA1) in CMML samples. Cholesterol efflux pathway is essential to maintain cellular cholesterol homeostasis by removing cholesterol excess towards exogenous high-density lipoproteins (HDL). Consistently, I showed that 3 out of 5 of these mutations altered cellular cholesterol homeostasis and induced an increased proliferation of monocytes *in vitro*. These somatic mutations cooperated with Tet2 loss to drive myeloid transformation in mice. These findings highlight the impact of cholesterol efflux pathway in the regulation of monocyte proliferation and provide insights into how metabolic and signaling mutations cooperate in CMML.

I studied glycolysis in the context of atherosclerosis. Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease dominated by hypercholesterolemia, which is at the origin of cardiovascular diseases. An enhanced glycolytic flux was observed in hypercholesteromia-driven atherosclerosis in inflammatory sites. We focused on the role of Glut-1, the main glucose transporter expressed in myeloid cells. HSCs and myeloid progenitors exhibited higher Glut-1 expression in a murine model of atherosclerosis leading to a bias in myeloid commitment. The associated monocytosis caused an enhanced monocyte infiltration and an accumulation of macrophages into atherosclerotic lesions. The consequence of macrophage accumulation was an enhanced local inflammatory response that contributed to accelerated atherosclerosis and higher glycolytic flux. A partial deletion of Glut-1 in the hematopoietic compartment reduced HSCs and progenitors proliferation, limiting monocytosis and atherosclerotic plaques development in a murine model of atherosclerosis. Glut-1 appears to be a potential therapeutic target into the treatment of atherosclerosis.

I studied the role of lysosomal acid lipase (LIPA) in the phagocytosis of apoptotic cells by macrophages (efferocytosis). The number of monocytes is balanced by their production and clearance. Efferocytosis is part of a paracrine loop between monocytes and macrophages to maintain an accurate myelopoiesis homeostasis. The metabolic regulation of efferocytosis is still poorly understood. When a macrophage phagocytized an apoptotic cell, an important amount of cholesterol has to be degraded to maintain homeostasis. We showed that LIPA is a key player in this process because this enzyme is the unique enzyme able to hydrolyze cholesterol esters into free cholesterol. When LIPA is inhibited, we observed a reduced production of 25- and 27-hydroxycholesterol (25- and 27-OHC). A low concentration of 25-OHC induced an increased mitochondrial oxidative stress, which activated NLRP3 inflammasome activation, known to be involved in chronic inflammation. 25- and 27-OHC are LXR agonists and their defective production lead to reduced LXR activation, key regulators of cholesterol metabolism and inflammatory regulation. LIPA inhibition leads to a defective efferocytosis *in vitro*. In mice, this inhibition induces a defective efferocytosis for splenic and hepatic macrophages, leading to a pro-inflammatory profile. The lysosomal hydrolysis of cholesterol by LIPA enzyme is an essential process to prevent metabolic inflammation by maintaining effective efferocytosis in tissues.

Keys words : Monocytes, Macrophages, Inflammation, Immuno-metabolism, Efferocytosis.

Liste des abréviations

α-KG : alpha-cétoglutarate
ABCA1 : ATP-Binding Cassette de classe A1
ABCG1/5/8 : ATP-Binding Cassette de classe G1/G5/G8
ABL : Abelson
ACAT : Acyl-Coenzyme A cholesterol acyl Transferase
acLDL : LDL acétylée
ACSL1 : Long-Chain Acyl-CoA Synthetase 1
AHA : American Hearth Association
AMPK : AMP-activated protein kinase
ANGPTL3 : Angiopoïétine like-3
APC : Antigen Presentating Cell
Apo : Apolipoprotéine
ASCT2 : Alanine Serine Cysteine-Preferring Transporter 2
ASXL1 : Additional Sex combs-Like protein 1
ATF-1 : Activating Transcription Factor-1
Atg : Autophagy related gene
BAI-1 : Brain-specific Angiogenesis Inhibitor 1
BCR : Breakpoint Cluster Region
BCR : B-Cell Receptor
CANTOS : Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Out-comes Study
CBL : Casistas B-lineage lymphoma
CCL : C-C Chemokine Ligand
CCN1 : cysteine-rich angiogenic protein 61 or CCN1
CCR : C-C Chemokine Receptor
CD : Cluster de Différenciation
CESD : Cholesteryl Ester Storage Disease
CETP : Cholesterol Esters Transfert Protein
CITED2 : CBP/p300 Interacting Transactivator 2
CM : Chylomicrons
CMP : Common Myeloid Progenitor
CMR : Chylomicrons remnants
COSMIC : Catalog of Somatic Mutations in Cancer
CPT : Carnitine Palmitoyl-Transferase
CRE : cAMP Responsive Element
CREB1 : cAMP responsive element binding protein 1
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
CX3CL1 : CX3C Chemokine Ligand 1
CX3CR : CX3C Chemokine Receptor 1
CXCL : CXC Chemokine Ligand
CXCR : CXC Chemokine Receptor
DHCR24 : 24- Dehydrocholesterol Reductase
DLK1 : Delta Like Non-Canonical Notch Ligand 1
DLL1 : Delta Like Canonical Notch Ligand 1
DNMT3A : DNA Méthyl Transférase 3
ERK : Extracellular signal-regulated kinases
ETP : Enhancer of trithorax and polycomb
EZH2 : Enhancer of zeste homolog 2
FAO : Fatty Acid Oxidation
FAS : Fatty Acid Synthase
FLT3 : fms-like tyrosine kinase 3
FOXO : Forkhead box protein O
GLUT : Glucose Transporter
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

GMP : Granulocytes/Macrophages Progenitor
GRP78 : 78kDa Glucose-Regulated Protein
GWAS : Genome-Wide Association Studies
HDL : Lipoprotéine de haute densité
HIF : Hypoxia Inducible Factor
HK2 : Hexokinase 2
HMOX-1 : Heme Oxygenase 1
I-CAM : Intercellular Cell-Adhesion Molecule-1
INF : Interferon
IDH : Isocitrate Déshydrogénase
IDL : Lipoprotéine de densité intermédiaire
IGF : Insulin-like Growth Factor
IL : Interleukine
JAK2 : Janus Kinase 2
LAMP : Lysosomal Associated Membrane Protein
LAP : LC-3 Associated Phagocytosis
LCAT : Lécithine-Cholestérl Acyl-Transférase
LDH : Lactate Déshydrogénase
LDL : Lipoprotéine de faible densité
LDL-R ou LDL-r : Récepteur aux LDL
LE : Lipase Endothéliale
LFA-1 : Lymphocyte function-associated antigen 1
LH : Lipase Hépatique
LIPA : Lysosomal Acide Lipase
LKB1 : Liver Kinase B1
LMMC : Leucémie MyéloMonocytaire Chronique
LOX1 : Lectin-type Oxidized LDL receptor 1
LPL : Lipoprotéine Lipase
LPS : lipopolysaccharide
LRP1 : Low Density lipoprotein related 1 protein
LTP : Lipid Transfert Protein
LXR : Liver X Receptor
LysoPC : LysoPhosphatidylCholine
MAM : Mitochondria Associated Membranes
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MARCO : Macrophage Receptor with Collagenous structure
MCP : Monocyte Chemotatic Protein
M-CSF : Macrophages-Colony Stimulating Factor
M-CSF-R : M-CSF Receptor
MDP : Macrophages/Dendritic cells Progenitor
MEIS1 : Myeloid Ecotropic Viral Integration Site 1 Homolog 1
MEP : Megakaryocyte–Erythroid Progenitor
MerTK : Myeloid-epithelial-reproductive Tyrosine Kinase
MFG-E8 : Milk fat globule-EGF factor 8 protein
MMP : Métalloprotéinase
MMP : Mutlipotent Myloid Progenitor
MPP : MultiPotent Progenitors
MSC : Mesenchymal and Stroma Cells
MTP : Microsomal Triglycérides Transfert Protein
MyRP : Myeloid-Restricted Progenitor
NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
NADP : NAD Phosphate
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NBD : Nucleotide Binding Domain
nCEH : neutral Cholesterol Ester Hydrolase

NFE2L2 : Nuclear Factor Erythroid 2 Like 2
NLRP3 : NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3
NO : Monoxide d'azote
NPC : Niemann-Pick C
NPC1L1 : Niemann-Pick C1-Like 1
NPM1 : Nucleophosmin
Nr4a1 : Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1
OCR : Oxygen Consumption Rate
ORP : OSBP Related Protein
OSBP : Oxysterol Binding Protein
oxLDL : LDL oxydée
PCSK9 : Proprotein Convertase Subtilisine/Kexine de type 9
PDGFRB : Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta
PDH : Prolyl Hydroxylase
PDK : Pyruvate Déshydrogénase Kinase Isozyme
PDPK1 : 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PDZK1 : PDZ Domain Containing 1
PF4 : Platelet Factor 4
PGC1 : PPARγ coactivator 1
PI3K : Phospho-Inositide 3-Kinase
PIP_2 : phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate
PIP_3 : phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphate
PKA : Protein Kinase A
PKC : Protein Kinase C
PKM2 : Pyruvate Kinase 2
PLA2 : Phospholipase A2
PLTP : Phospholipid Transfer Protein
PML : Promyelocytic Leukemia Protein
PPARs : Peroxisome Proliferator Activated Receptors
PRC2 : Polycomb repressive complex 2
PRR : Pattern Recognition Receptor
PS : PhosphatidylSérine
PSGL1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
PTPMT1 : Protein Tyrosine Phosphatase Mitochondrial 1
PXR : Pregnane X Receptor
RAS : Rous Avian Sarcoma
ROS : Espèces Réactive de l'Oxygène
RUNX1 : Runt-related transcription factor 1
RXR : Retinoid X Receptor
S1P : Shingosine-1-Phosphate
S1PR : Récepteur à la S1P
SCF : Stem Cell Factor
SDF-1 : Stromal cell-Derived Factor-1
SF-1 : Sterodogenic Factor-1
SF3B1 : Splicing Factor 3b Subunit 1
SFK : Src family kinase
SGLT : cotransporteur Sodium Glucose
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein receptor
SORT1 : Sortiline 1
SRA : Scavenger Receptor A
SR-B1 : Scavenger Receptor class B type 1
SREBP : Sterol Regulatory Element Binding Protein
SRSF2 : Serine Arginine Rich Splicing Factor 2
Stab : Stabiline
STARD : Steroidogenic Acute Regulatory Protein Related Lipid Transfer Domain

STAT : Signal transducer and activator of transcription
STPs : Sterols Transfer Proteins
TAM : Tyro3, AXL, MerTK
TCR : T-Cell Receptor
Tet2 : Ten-Eleven Translocation 2
TFEB : Transcription Factor EB
TGF : Transforming Growth Factor
Thbs1 : Thrombospondin 1
TICE : Trans-Intestinal Cholesterol Excretion
TIM : T cell/transmembrane, immunoglobulin, and mucin
TLR : Toll Like Receptor
TMD : Trans Membrane Domain
TMS : Trans Membrane Segment
TNF : Tumor Necrosis Factor
TR4 : Testicular Receptor 4
TRIB1 : Tribbles Homolog 1
Tyk2 : Non-receptor tyrosine-protein kinase
Tyro3 : transmembrane receptor kinase receptor
U2AF1 : U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
UTX : Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome
VCAM-1 : Vascular Cell-Adhesion Molecule-1
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL : Lipoprotéine de très faible densité
VLDL-R : Récepteur aus lipoprotéines de très faible densité
ZRSR2 : Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2

Introduction bibliographique

I. L'athérosclérose, une maladie inflammatoire chronique

L'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique à l'origine des maladies cardiovasculaires. Véritable fléau actuel, les maladies cardiovasculaires sont à l'origine de millions de morts par an. Actuellement, chaque année, plus de personnes meurent à cause des maladies cardiovasculaires que de toute autre cause. Nous allons nous intéresser à deux facteurs principaux impliqués dans la mise en place de cette pathologie : l'altération du métabolisme du cholestérol et l'accumulation de cellules myéloïdes.

a- La description de la pathologie athéromateuse

L'athérosclérose est une pathologie progressive d'origine inflammatoire qui touche majoritairement les artères de moyen et gros calibre. La paroi des artères est composée de 3 tuniques concentriques, avec de l'extérieur vers l'intérieur : l'adventice, la média et l'intima. L'intima est composée d'une couche monocellulaire de cellules endothéliales, et de tissu conjonctif. L'endothélium est une barrière sélective qui gère la perméabilité de la paroi permettant la gestion du transport de métabolites, l'angiogenèse ou encore l'hémostase. Les lésions d'athérosclérose sont classifiées selon six stades, de gravité croissante, selon l'AHA (American Heart Association) depuis 1995 (Stary et al., 1995a) (Stary et al., 1995b) (**Figure 1**). Cette classification tient compte de l'évolution des plaques d'athérosclérose au cours de la vie, qui passent successivement d'un stade lésionnel à un stade complexe. Les lésions de stades I à III sont considérées comme des lésions précoces et qui évoluent de manière silencieuse. Les lésions de stades IV à VI sont des lésions avancées pour lesquelles il y a déjà une réduction de la lumière artérielle due en partie à un épaississement de l'intima. Actuellement, trois stades évolutifs sont retenus : la strie lipidique, la lésion fibro-lipidique et la lésion complexe. Les plaques d'athérosclérose sont préférentiellement localisées au niveau des branches principales de l'aorte ascendante et de la crosse aortique, des branches viscérales de l'aorte abdominale et des branches de division de l'aorte abdominale (Hahn and Schwartz, 2009).

Le stade le plus précoce (stade I à III) peut être retrouvé dès l'enfance et n'est pas associé à des manifestations cliniques, c'est le stade initial de la pathologie. Des macrophages isolés vont tout de même se localiser dans la coche sous-endothéliale (lieu de développement des lésions). Ils sont dérivés des monocytes circulants qui, une fois recrutés, vont se différencier en macrophages. Les macrophages vont alors pouvoir phagocyter les lipides afin de les éliminer. Cependant, dès ce stade, les macrophages gorgés de lipides se transforment en macrophages spumeux isolés.

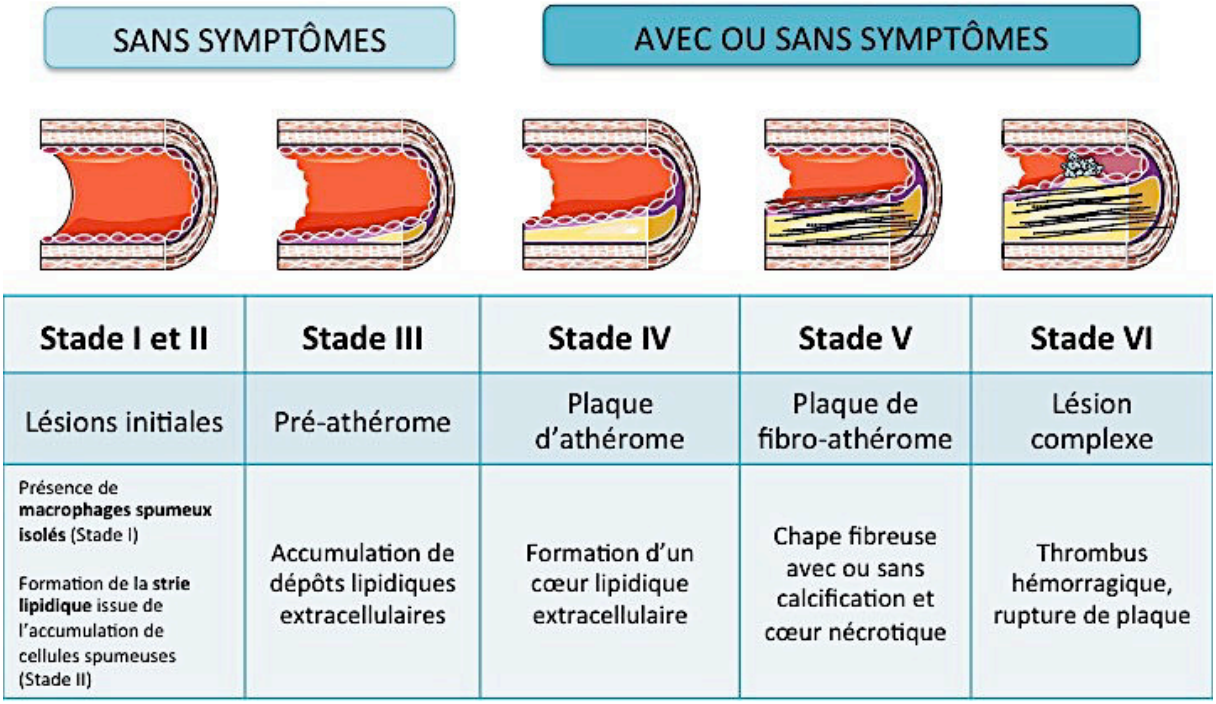


Figure 1: **Récapitulatif de l'évolution de la plaque d'athérosclérose selon la classification de Stary établie en 1995,** (Stary C. et al., Circulation, 1995)

Dans un second temps, les macrophages spumeux forment des amas, qui se localisent dans le sous-endothélium de l'intima et se traduit par la formation de stries lipidiques. A ce stade, les stries lipidiques peuvent se résorber ou bien évoluer vers des stades plus pathologiques.

Les lésions de stade IV ou lésions d'athérome sont définies par une accumulation importante de lipides extracellulaires qui forment un noyau lipidique. Le noyau lipidique est aussi riche en cristaux de cholestérol. A ce stade, la chape fibreuse n'est pas encore complètement formée.

Les lésions de stade V ou plaques d'athérosclérose sont aussi appelées plaque fibrolipidique ou plaque fibroathéromateuse. Elles sont caractérisées par la formation d'une chape fibreuse riche en collagènes, de cellules musculaires lisses et de protéines de structure. La chape fibreuse entoure le noyau lipidique qui est alors constitué de cellules spumeuses, de débris cellulaires, de cristaux de cholestérol et de lipides extracellulaires. Ces lésions sont également infiltrées de cellules immunitaires comme les cellules dendritiques et les monocytes, qui vont ensuite de différencier en macrophages.

Les lésions de type VI ou lésions compliquées sont des lésions qui présentent des modifications ou des remaniements délétères de leur structure, comme des phénomènes d'hémorragie, d'ulcération, de thrombose ou de dépôts calcaires. Ce type de lésions se sous classifie en trois types. Premièrement, la lésion VIa ou ulcération de la plaque correspond à une rupture de plaque avec perte de l'endothélium vasculaire et exposition du sous-endothélium. La lésion de type VIb est une plaque hémorragique, c'est le type qui est le plus souvent responsable des symptômes cliniques. La lésion de type VIc ou thrombose est la complication majeure de l'athérosclérose, elle fait suite à une ulcération ou une rupture de plaque. Elle peut être occlusive ou non. Elle présente aussi le plus souvent un cœur nécrotique.

b- Le métabolisme systémique du cholestérol

Une altération du métabolisme du cholestérol est un facteur clé dans la mise en place des maladies cardiovasculaires. Dans cette partie, nous allons définir les nombreux acteurs qui entrent en jeu afin de maintenir l'homéostasie du cholestérol et détailler le métabolisme systémique du cholestérol (**Figure 2**).

Le cholestérol, joue un rôle central dans de nombreuses fonctions cellulaires et tissulaires. Il y participe notamment en tant que composant majeur des membranes cellulaires (plasmique et intracellulaires). Le cholestérol est aussi un précurseur d'un grand nombre de dérivés, comme les hormones stéroïdiennes, la vitamine D, les acides biliaires et les oxystérols. D'un point de vue physique, le cholestérol est hydrophobe, même si selon la forme dans laquelle il se trouve (estérifié ou non), le cholestérol peut moduler son hydrophobicité. De ce fait, le transport du cholestérol dans des phases aqueuses telles que la lymphe ou le sang nécessite des « adaptateurs », appelés lipoprotéines. Les lipoprotéines sont des édifices macromoléculaires complexes, le cœur hydrophobe contient des esters de cholestérol et des triglycérides, alors que le manteau est composé de lipides hydrophiles comme les phospholipides, de cholestérol libre et de protéines, les apolipoprotéines (Apo). Dans la circulation sanguine, le cholestérol est généralement retrouvé sous forme estérifiée, au cœur des lipoprotéines et seule une petite fraction reste sous forme libre, à la surface des lipoprotéines (Tall et al., 2012).

Les complexes entre lipoprotéines et les lipides sont classifiés selon leur taille et leur densité. On retrouve les chylomicrons (CM), les lipoprotéines de très faible densité (VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines de faible densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL) (Daniels et al., 2009a) (**Figure 3**).

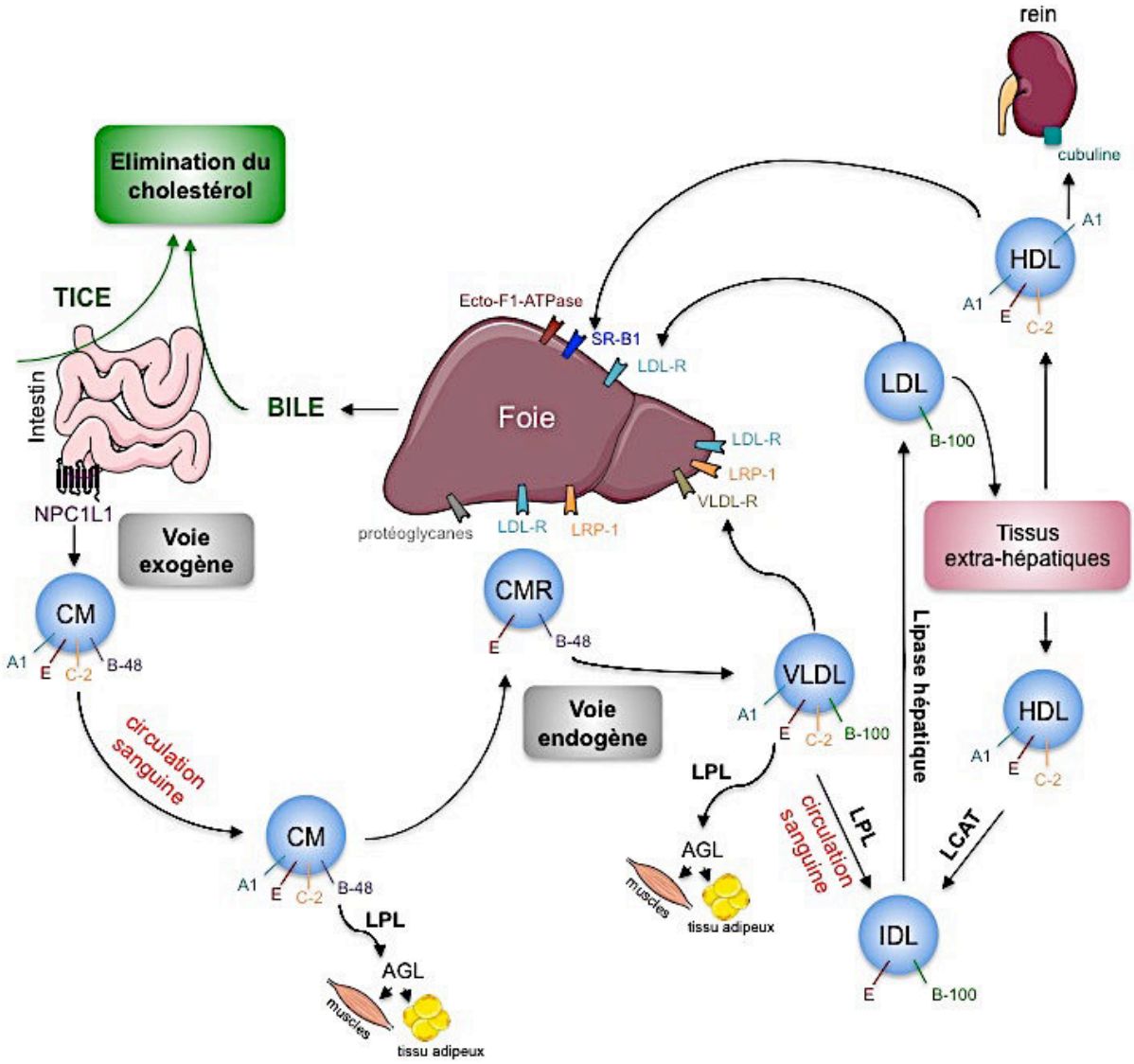


Figure 2 : **Le métabolisme systémique des lipoprotéines.** **CM**: chylomicrons. **CMR**: chylomicrons remnants. **VLDL**: lipoprotéines de très faible densité. **IDL**: lipoprotéines intermédiaires de faible densité. **LDL**: lipoprotéines de faible densité. **HDL**: lipoprotéines de haute densité. **LPL**: LipoProtéine Lipase. **LCAT**: Lécithine-cholestérol acyltransférase. **AGL**: Acides Gras Libres. **LDL-R**: récepteur aux LDLs. **LRP-1**: LDL receptor-related protein 1. **VLDL-R**: Récepteur aux VLDLs. **SR-B1**: Scavenger Récepteur B1. **NPC1L1**: Niemann-Pick C1-Like-1. **TICE**: Trans-Intestinal Cholesterol Excretion.
Dans ce schéma les apolipoprotéines, par exemple notées A1 pour apolipoprotéine A1, présentes au sein des différentes classes de lipoprotéines sont les principales portées par les lipoprotéines.

Classe	Densité (g/mol)	Principales apolipoprotéines	Principaux lipides
CM	<0,95	B-48, B-100, C-III, A-1	TG
VLDL	<1,006	B-100, C, E, A-1	TG
IDL	1,006-1,019	B-100, C, E	TG,EC
LDL	1,019-1,063	B-100	EC
HDL	1,063-1,210	A-I, C, E	PL

Figure 3 : **Classification des différentes classes de lipoprotéines circulantes selon leur densité, leur composition en apolipoprotéines et en lipides.** TG= triglycérides, EC= esters de cholestérol et PL= phospholipides

b-1- Les chylomicrons (CM) ou l'absorption intestinale du cholestérol.

Les chylomicrons assurent le transport des lipides alimentaires, principalement les triglycérides, le cholestérol et les phospholipides, via la lymphe et le plasma, jusqu'aux tissus pour utilisation ou stockage.

Le cholestérol alimentaire va être capté par l'entérocyte, via la protéine membranaire NPC1L1 (Niemann-Pick C1-Like 1) qui va permettre l'entrée de cholestérol dans la cellule (Davis and Altmann, 2009). Toutefois, l'absorption intestinale du cholestérol est aussi négativement régulée grâce à l'action des transporteurs ABCG5 et ABCG8 (ATP binding cassette G5 et G8) qui permettent d'augmenter la sécrétion de cholestérol dans la lumière du tube digestif (Berge et al., 2000). Une fois dans l'entérocyte, le cholestérol va être métabolisé et la formation des CMs va avoir lieu en assemblant des esters de cholestérol, des phospholipides et des triglycérides grâce à l'action de la MTP (Microsomal Triglycérides Transfert Protein) dans le réticulum endoplasmique. Parmi les apolipoprotéines présentes à la surface de ces particules l'apoA1, l'apoC2 et l'apoB-48 sont les protéines caractéristiques du chylomicron naissant. L'apoB-48 est synthétisée uniquement par les entérocytes et est incorporée dans les CMs par la MTP.

Ces particules nouvellement synthétisées sont sécrétées dans les vaisseaux lymphatiques et rejoignent la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière gauche. Dans la circulation sanguine, les chylomicrons vont faire l'acquisition de l'apoE et de l'apoC2. L'apoC2 va permette d'activer la LPL (LipoProtéine Lipase), enzyme lipolytique ancrée à la surface des cellules endothéliales des tissus périphériques (autres que le foie), les chylomicrons vont se décharger des triglycérides, et vont devenir des chylomicrons « remnants » (CMR) (Goldberg, 1996). Les CMR vont perdre les apoA et les apoC2, et vont être enrichis en apoE, ce qui va les diriger vers le foie où ces particules seront éliminées par les hépatocytes. Les CMR sont captés par les hépatocytes par l'intermédiaire d'une interaction de l'apoE avec des protéoglycanes de surface comme les héparanes sulfates ou d'une endocytose récepteur-dépendante, notamment via le LDL-R (récepteur aux LDL ou LDL-Receptor) et LRP1 (low density lipoprotein related 1 protein) (Kowal et al., 1989). Après internalisation, les CMR peuvent alors fusionner avec des lysosomes qui induisent une lipolyse et une protéolyse quasi complète de ses constituants. Le cholestérol va alors être principalement intégré dans de nouvelles lipoprotéines synthétisées par le foie, les VLDL, ou excrétées dans les canalicules biliaires. Au niveau de l'intestin, une excrétion (élimination) du cholestérol peut aussi avoir lieu.

b-2- L'excrétion trans-intestinale du cholestérol, le TICE

Plus récemment, une nouvelle voie d'élimination du cholestérol nommée TICE (TransIntestinal Cholesterol Excretion) a été mise en évidence chez la souris (van der Velde et al., 2007) (van der Veen et al., 2009). Il est maintenant acquis que cette voie permet une élimination directe du cholestérol circulant via l'intestin sans passer par la bile (Paalvast et al., 2017). Chez la souris, cette voie est non négligeable dans l'élimination du cholestérol. Chez l'Homme, cette voie a aussi été mise en évidence (Cohen, 2016) mais son impact reste controversé. En effet, il a été démontré que le TICE était présent, en analysant des biopsies d'intestin obtenues au cours d'une chirurgie de l'obésité. Il a également été mis en évidence que les LDL autant que les HDL peuvent délivrer du cholestérol au TICE chez l'Homme et chez la souris (Le May et al., 2013). Très récemment, il a été prouvé que le TICE intervenait à hauteur de 35% dans l'excrétion fécale du cholestérol chez l'Homme, de manière dépendante des transporteurs ABCG5 et ABCG8 (Jakulj et al., 2016). De plus, un traitement par l'Ezetimibe (un inhibiteur du transporteur NPC1L1, impliqué dans la capture du cholestérol depuis la lumière du tube digestif) permet d'augmenter le TICE qui semble être une cible thérapeutique de choix dans le traitement des patients atteints d'hypercholestérolémie (Jakulj et al., 2016).

b-3- Les lipoprotéines de très faible densité (VLDL) ou le transport des lipides endogènes

Synthétisées et sécrétées par le foie, les VLDL initient une nouvelle voie de transport des lipides, dite voie endogène, permettant le transport des triglycérides et du cholestérol synthétisés par le foie vers les tissus périphériques. Les VLDL sont riches en triglycérides et possèdent une fraction protéique relativement faible, essentiellement de l'apoE (nécessaire à leur sécrétion), de l'apoB-100 et de l'apoC2. Durant leur transit dans la circulation sanguine, les VLDL vont subir un remodelage lipidique très important, sous l'action de la LPL, les triglycérides vont être hydrolysés et les VLDL vont perdre l'apoC2 et l'apoE. Chez l'Homme, la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) va permettre le transfert réciproque des triglycérides, des VLDL vers les HDL, et des esters de cholestérol, des HDL vers les VLDL (Daniels et al., 2009).

b-4- Les lipoprotéines intermédiaires de faible densité (IDL)

Les IDL sont issues des VLDL, suite à l'action de la LPL (déplétion en triglycérides) combinée à celle de la CETP (enrichissement en esters de cholestérol). Les IDL conservent l'apoE et l'apoB-100 qui leur permettent d'être métabolisées par les tissus, ou éventuellement recaptées par le foie. Au niveau hépatique, l'endocytose des IDL nécessite le LDLR (récepteur aux LDL), LRP1 (LDL receptor-related protein 1) et le VLDLR (récepteur au VLDL). La majorité des triglycérides restants sont dégradés par l'action de la lipase hépatique (LH), conduisant ainsi à la formation de LDL (Daniels et al., 2009). La production de LDL à partir des IDL est en partie déterminée par l'activité du LDL-R hépatique. En effet, une activité augmentée de ce récepteur induit une diminution de la production de LDL car les IDL sont recaptées par le foie. Au contraire, une baisse de l'activité du LDL-R permet une augmentation de la concentration circulante des LDL.

b-5- Les lipoprotéines de faible densité (LDL) ou le transport du cholestérol endogène et l'apport du cholestérol aux cellules périphériques.

Le cœur hydrophobe des LDL est essentiellement constitué d'esters de cholestérol et d'une faible quantité de triglycérides. Dans la circulation sanguine, sous l'action de la CETP, les LDL sont enrichies en esters de cholestérol et en triglycérides, et perdent leur teneur en apoE. Elles conservent toutefois l'apoB-100 qui est nécessaire à leur interaction avec leurs

récepteurs (LDL-R). Les LDL vont être captées pour être utilisées dans les organes extra-hépatiques ou bien éliminées par le foie. Les LDL peuvent également subir des modifications chimiques et enzymatiques. En effet, le cholestérol contenu dans les LDL subit des modifications telles que l'oxydation (oxLDL). Les LDL peuvent aussi subir des phénomènes de glycation, d'agrégation ou de carbamylation (Alique et al., 2015).

La biogénèse des LDL permet un apport de cholestérol dans les tissus périphériques. En effet, les LDL vont être captées par leur récepteur, le LDL-R. Après avoir subi des modifications telles que l'oxydation, les LDL vont aussi être captées par d'autres récepteurs comme le SR-A ou CD36. Il est aussi possible pour certains types cellulaires (comme les macrophages) que les LDL soient directement phagocytées (par pinocytose).

b-6- Les lipoprotéines de haute densité (HDL) et le retour inverse du cholestérol

La fonction majeure des HDL est le transport inverse du cholestérol (Reverse Cholesterol Transport ou RCT). En effet, les HDL vont capter l'excès de cholestérol intracellulaire contenu dans les cellules périphériques pour le ramener vers le foie afin qu'il soit éliminé dans les fèces. Le foie est le seul organe pouvant ainsi cataboliser l'excès de cholestérol de l'organisme *via* les HDL. Les HDL sont synthétisées par le foie sous forme de particules pauvres en lipides et riches en apoA1, les préβHDL (Zannis et al., 2004). La première étape de biogénèse des HDL implique la sécrétion de l'apoA1, principalement par le foie et par l'intestin (Zannis and Breslow, 1985).

Le RCT démarre au niveau des cellules périphériques où l'excès de cholestérol cellulaire va quitter la cellule par deux mécanismes, l'un actif via des transporteurs et l'autre passif, pas diffusion passive. Le mécanisme actif est dépendant des transporteurs membranaires du cholestérol, en particulier ABCA1 et ABCG1 (pour ATP Binding Cassette A1 et G1, respectivement) ou encore SR-BI (Scavenger Receptor class B type I).

b-6-A- Le rôle d'ABCA1 dans le retour inverse du cholestérol

ABCA1 est un transporteur ubiquitaire, abondamment exprimé dans le foie, l'intestin, le cerveau, le rein, les monocytes et les macrophages ainsi que d'autres tissus (Langmann et al., 1999) (Kielar et al., 2001) (Wellington et al., 2002). ABCA1 est localisé à la surface baso-latérale des hépatocytes (Neufeld et al., 2002). Il est aussi retrouvé dans les vésicules

endocytiques, qui permettent une répartition du transporteur entre les vésicules d'endocytose tardive et la surface de la cellule (Fitzgerald, 2002) (Neufeld et al., 2001) (Denis et al., 2008) (Singaraja et al., 2009). Le transporteur ABCA1 possède une architecture symétrique avec un domaine transmembranaire (TMD pour TransMembrane Domain), lui-même constitué de six segments transmembranaires (TMS pour TransMembrane Segment) et un domaine de liaison aux nucléotides (NBD pour Nucleotide-Binding Domain), répétées en tandem. ABCA1 est aussi constitué de deux grandes boucles extracellulaires localisées entre les TMS1/2 et TMS7/8 (Hamon et al., 2000) (**Figure 4**). Des variations génétiques d'ABCA1 contribuent à l'hétérogénéité des niveaux d'HDL dans la population générale (Frikke-Schmidt et al., 2004). Lorsque les mutations ont un impact trop important sur la fonction du transporteur, il devient non fonctionnel. Une dysfonction du transporteur ABCA1 induit une pathologie appelée maladie de Tangier. Elle se caractérise par un taux très faible d'HDL plasmatiques et d'apoA1, qui induit un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires, une hépatosplénomégalie, une atteinte des ganglions et une hypertrophie des amygdales (Tietjen et al., 2012) (Singaraja et al., 2006). Les mutations induisant la pathologie provoquent une réduction de l'efflux des phospholipides et du cholestérol libre (Tang et al., 2006). Les mutations perturbent notamment la glycosylation du transporteur, ce qui altère le trafic intracellulaire et sa capacité à lier l'apoA1 au niveau de la membrane plasmique, réduisant drastiquement la production d'HDL. Au contraire, certaines mutations n'altèrent pas la localisation du transporteur, mais sa conformation ce qui empêche une liaison correcte de l'apoA1 sur ABCA1. Par exemple, le mutant C1477R (Rigot et al., 2002) qui semble présenter une altération de la mise en place de ponts disulfures dans le domaine ECD2 ou encore le mutant W590S, qui est localisé à la membrane plasmique mais qui est dysfonctionnel (Rigot et al., 2002) (Fitzgerald, 2002) (Tanaka et al., 2003) (Nagao et al., 2009). De manière intéressante, le mutant W590S, qui est très étudié, semble montrer que cela est due à un défaut de liaison de l'apoA1 sur le transporteur (Vaughan and Oram, 2003) ou bien un défaut de translocation des lipides (Tanaka et al., 2003). Plus récemment, d'autres mutants ont été caractérisés (Phillips, 2018) et des études de mutagenèse ont été réalisées afin de mieux comprendre quels sont l'impact que peuvent avoir les mutations du gène *abca1* tant sur le plan structurel que fonctionnel (Itoh et al., 2015).

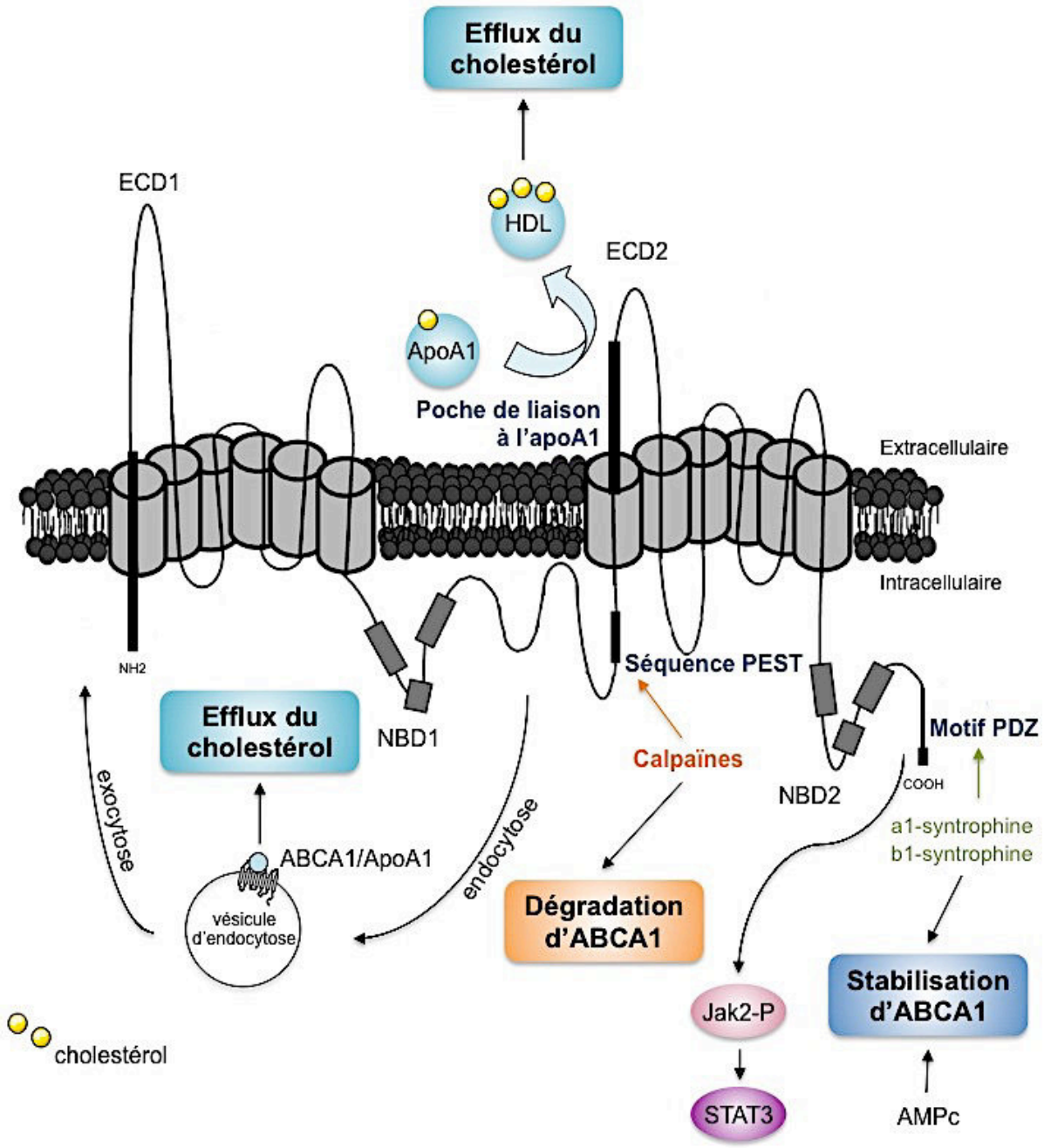


Figure 4: **Le transporteur ABCA1 (ATP-Binding Cassette A1), ses différents domaines, son rôle dans l'efflux de cholestérol et sa régulation.** Le transporteur ABCA1 est un acteur clé dans l'efflux du cholestérol.
NBD: Nuclear Binding Domain, ECD: Extracellular Domain.
Adapté de Kang MH. et al., TCM, 2010

L'expression d'*abca1* est finement régulée par 3 classes principales d'acteurs : l'AMPc, les récepteurs nucléaires et les cytokines.

- La régulation par l'AMPc : En présence d'AMPc, la transcription et la traduction d'*abca1* va être augmentée. En effet, le traitement de macrophages murins (lignées RAW264.7 et J774) *in vitro* par un analogue de l'AMPc induit une augmentation de l'expression de l'ARNm d'*abca1* ainsi que du niveau protéique (Denis et al., 2003) (Haidar et al., 2002) (Oram et al., 2000). De plus, il a été mis en évidence que la stabilité de l'ARNm d'*abca1* est augmentée en présence d'AMPc. Ceci est expliqué par la présence d'un domaine de réponse à l'AMPc, domaine CRE (cAMP Responsive Element) dans le premier intron du gène *abca1*. Brièvement, la présence d'AMPc augmente l'activité de la PKA (Proteine Kinase A), qui va activer CREB1, l'élément de liaison à CRE. De plus, il est prouvé que les protéines STAT3/4 lient CREB1 et sont nécessaires à la transcription du gène *abca1,* grâce à leur liaison sur leur élément de réponse. De manière intéressante, le domaine CRE n'est pas conservé chez l'Homme, pouvant ainsi expliquer l'absence d'effet de l'AMPc sur la régulation d'*abca1* dans les cellules humaines (Le Goff, 2005).

- La régulation par les stérols : *abca1* est positivement régulé lorsque les macrophages sont incubés en présence de LDL acétylées, soit quand les macrophages sont chargés en cholestérol. A l'inverse, en présence d'HDL (soit quand les macrophages peuvent se décharger en cholestérol), *abca1* va être négativement régulé (Klucken et al., 2000) (Langmann et al., 1999). De plus, il a été démontré que l'efflux de cholestérol en présence d'ApoA1 induit une réduction de l'expression d'*abca1* dans des fibroblastes humains (Lawn et al., 1999). *abca1* est un gène qui est régulé par les stérols, chez l'Homme ou la souris (Costet et al., 2000) (Schmitz et al., 2001) (Tall and Wang, 2000). Les LXR (Liver X Receptor) alpha et béta sont codés par deux gènes différents. LXRα a une expression spécifique dans le foie, dans les macrophages, dans l'instestin, le tissu adipeux et le rein (Willy et al., 1995). En revanche, le LXRβ est exprimé ubiquitairement (Repa and Mangelsdorf, 1999). Ce sont des régulateurs clés de l'homéostasie lipidique. Ils forment des hétérodimères avec le recepteur nucléaire à l'acide rétinoïque (RXR) (Song et al., 1994). Le complexe LXR/RXR va être activé et reconnaître un élément de réponse spécifique, qui est constitué par deux hexanucléotides répétées séparées par 4 nucléotides (élément DR4) (Fitzgerald et al., 2002). Cela aboutit à la transcription d'*abca1* et permet une augmentation de l'efflux de cholestérol (Venkateswaran et al., 2000). La régulation d'*abca1* par les LXR peut s'expliquer par le fait que dans le premier intron du gène, l'élément de réponse aux stérols SREBP-2 (sterol regulatory element binding protein 2) est présent (Tamehiro et al., 2007). En ce sens, il a récemment été démontré que le miRNA-33, un microRNA localisé

dans un intron du gène SREBP-2, qui module l'expression des gènes impliqués dans le transport cellulaire du cholestérol dont *abca1* (Rayner et al., 2010). De plus des métabolites du cholestérol, comme les oxystérols, et le cholestérol lui-même sont capables de réguler *abca1* (Ory, 2004). En effet, les oxystérols sont des agonistes des LXR. Les premières études montrent que des macrophages de souris traités par du 22-(R)-hydroxycholestérol augmentent leur expression d'*abca1* de trois fois (Repa et al., 2000).

- La régulation par les PPARs : Les PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) sont aussi capables d'augmenter l'expression d'*abca1*. En réalité, cela se fait de manière indirecte car les PPARs sont capables d'augmenter la transcription des LXRs (Chawla et al., 2001) (Chinetti-Gbaguidi et al., 2005) (Chinetti et al., 2001). De plus, *in vivo*, le traitement par des agonistes des PPARs permet une réduction de la production des cytokines proinflammatoires connues pour réduire l'expression d'*abca1* (Li et al., 2004).

- Autres régulations : Les cytokines proinflammatoires (LPS, IL1-β, INFγ, TNFα) sont capables de négativement réguler l'expression d'*abca1* (Baranova et al., 2002) (Khovidhunkit et al., 2003) (Panousis and Zuckerman, 2000) (Mei et al., 2007). A l'inverse, la cytokine anti-inflammatoire IL-10 est capable d'augmenter l'expression d'*abca1* (Mei et al., 2007). La protéine ZNF202 permet aussi l'inhibition de l'expression d'*abca1* (Schmitz et al., 2004) (Porsch-Özcürümez et al., 2001). Il semble que toutes ces voies de régulation de l'expression d'*abca1* passent par l'élément DR4 (Schmitz and Langmann, 2005). De plus, ABCA12 est impliqué dans la stabilisation d'ABCA1. En effet, il est démontré que la sur-expression d'ABCA12 permet une stabilisation de la protéine ABCA1. A l'inverse, la déficience en ABCA12, conduit à une interaction entre ABCA1 et LXRβ, provoquant la dégradation d'ABCA1 (Fu et al., 2013).

b-6-B- Le rôle d'ABCG1 dans le retour inverse du cholestérol

ABCG1 est un transporteur membranaire, qui est exprimé au niveau de la membrane plasmique mais aussi des endosomes. Son expression est ubiquitaire mais il est majoritairement exprimé au niveau du cerveau, des glandes surrénales, des poumons, de la rate et des macrophages (Klucken et al., 2000). Il est structurellement composé de 6 domaines transmembranaires, d'une boucle extracellulaire et d'un domaine N-terminal cytosolique de liaison à l'ATP (domaine NBD) (**Figure 5**). Il existe un seul gène codant pour *abcg1*, localisé sur le chromosome 21 (21q22.3), constitué de 23 exons (98kb) codant pour une protéine de 203 acides aminés (Croop et al., 1997). Un épissage alternatif du gène

permet de produire plusieurs isoformes de la protéine (Langmann et al., 2000) (Lorkowski et al., 2001) (Kennedy et al., 2001). Le transporteur ABCG1 est qualifié d'hémi-transporteur, cela veut dire qu'il doit se dimériser pour être fonctionnel, il a été démontré qu'ABCG1 est capable de s'homodimériser (Gelissen et al., 2006) ou de s'hétérodimériser avec d'autres transporteurs comme ABCG4 (Wang et al., 2004) (Cserepes et al., 2004) (Hegyi and Homolya, 2016). Brièvement, le gène *abcg1* est régulé par les facteurs de transcription NFκB, PPAR, RXR et LXR (Langmann et al., 2000) (Lorkowski et al., 2001). Comme pour *abca1*, *abcg1* est fortement régulé par les oxystérols, via l'activation du complexe LXR/RXR. La protéines ZNF202 est aussi capable d'activer la transcription du gène *abcg1* (Porsch-Özcürümez et al., 2001). Comme souligné plus haut, le contenu en lipides intracellulaires régule l'activité d'*abcg1*. A ce titre, la différenciation des monocytes en macrophages puis des macrophages en cellules spumeuses est corrélée à une augmentation de l'expression d'*abcg1* (Klucken et al., 2000). *abcg1* peut aussi être négativement régulé par les cytokines pro-inflammatoires telles que TNFα ou IL-1β (Gerbod-Giannone et al., 2006).

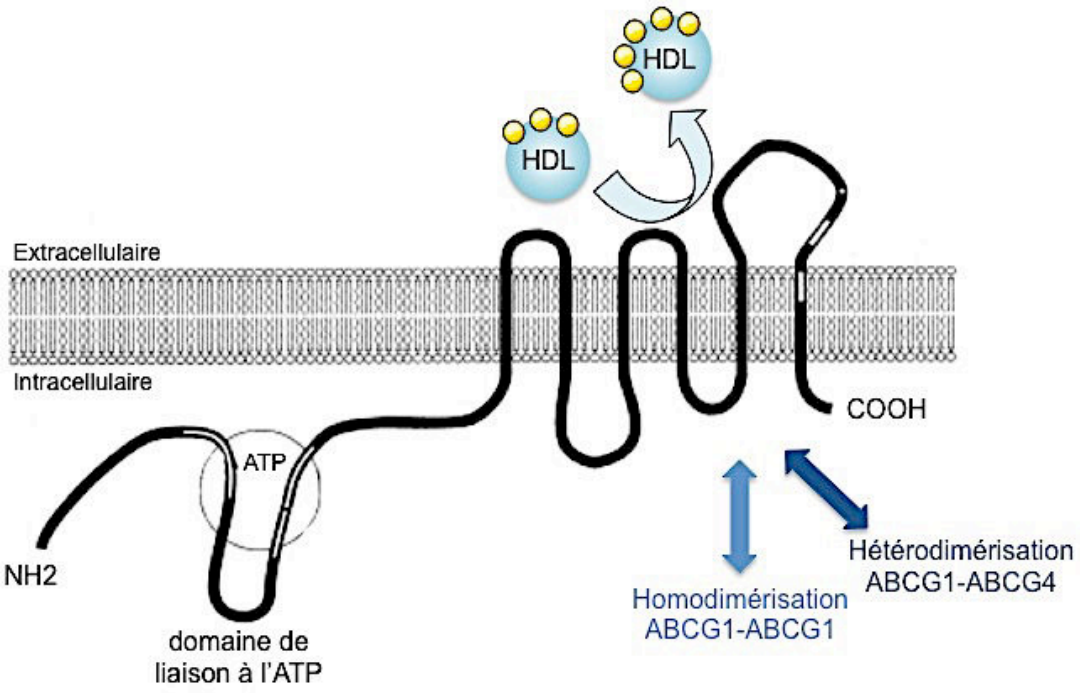


Figure 5: Le transporteur ABCG1 (ATP-Binding Cassette G1), représentation de sa structure schématique et son rôle dans l'efflux de cholestérol vers les HDL.
Adapté de Langmann T. et al., BBA, 2000

b-6-C- Le rôle de SR-B1 dans le retour inverse du cholestérol

Le récepteur SR-B1 (chez la souris) ou CLA-1 (chez l'Homme) est un membre de la famille des « scavenger » récepteurs (SR ou récepteurs éboueurs) de classe B1. SR-B1 et CLA-1 sont des gènes homologues, hautement conservés au cours de l'évolution. Le nom de récepteurs « scavenger » vient du fait qu'il est capable de lier une grande variété de substrats comme les HDL, les LDL, et un grand nombre d'apolipoprotéines circulantes.

Le gène *sr-b1* est composé de 13 exons, pour 75kb et est localisé sur le chromosome 12 (12q24) chez l'Homme et le rat. Le gène *sr-b1* est régulé par de nombreux facteurs de transcription comme SF-1 (Sterodogenic Factor-1) et SREBP-1 (Sterol Regulatory Element Binding Protein-1). Le gène *sr-b1* serait donc positivement régulé par les oxystérols et le cholestérol intracellulaire (Cao et al., 1999) (Malerød et al., 2002). De plus, l'activation des PPARs permet une augmentation de l'expression de *sr-b1*. SR-B1 est fortement exprimé par les macrophages après différenciation, ce transporteur est donc utilisé comme marqueur de différenciation des monocytes en macrophages (Chinetti et al., 2000).

Le récepteur SR-BI est exprimé dans le foie, les tissus stéroïdogènes et les macrophages. D'un point de vue structurel, il est composé d'une large boucle extracellulaire, de deux domaines transmembranaires et de deux extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques. Il est préférentiellement retrouvé au niveau des domaines riches en cholestérol de la membrane plasmique (Krieger, 1994). La boucle extracellulaire est responsable de l'échange bidirectionnel de cholestérol libre entre la membrane plasmique et les lipoprotéines. Il est important de souligner que SR-B1 n'est pas capable d'exporter du cholestérol sur des lipoprotéines dépourvues de phospholipides (de la Llera-Moya et al., 1999). Plus précisément, dans le foie, SR-B1 participe à la recapture du cholestérol contenu dans les HDL, participant ainsi au RCT. SR-B1 est majoritairement localisé au niveau des cavéoles, au niveau de la membrane plasmique (Graf et al., 1999). SR-B1 a un rôle dans l'organisation du cholestérol dans la membrane plasmique (Kellner-Weibel et al., 2000).

Ces mécanismes d'efflux du cholestérol sont dépendants du contenu en cholestérol de la cellule, de l'activité des transporteurs, et de la nature des accepteurs extracellulaires du cholestérol (Zanotti et al., 2012). Brièvement, la diffusion passive semble impliquée majoritairement du cholestérol libre et des HDL. Cependant, ce processus reste à débattre, car même s'il semble important sous certaines conditions, comme dans les cellules spumeuses (Adorni et al., 2007), il n'est pas impossible que la diffusion passive implique des transporteurs non-identifiés permettant la diffusion passive du cholestérol.

b-6-D- Le remodelage des particules d'HDL durant le RCT

Les particules d'HDL subissent divers remodelages enzymatiques aux différents stades du RCT. Le remodelage des HDL affecte leur structure et leur renouvellement, et génère un mélange d'HDL qui diffère selon leur taille, leur forme, leur contenu en apolipoprotéines et en lipides. L'ensemble de ces facteurs joue évidemment un rôle important dans leurs fonctions.

- **L'action des lipases hépatique et endothéliale** :

Les HDL sont tout d'abord remodelées dans la circulation par la lipase hépatique (LH) et la lipase endothéliale (LE). Ces lipases agissent principalement sur les particules possédant l'apoB-100, comme les LDL et les CM. Leurs actions permettent une hydrolyse des triglycérides et phospholipides contenus dans ces particules, et conduit à la conversion des HDL2 en HDL3 et préβ-HDL (Maugeais et al., 2003) (Santamarina-Fojo et al., 2004).

- **L'action de la LCAT (Lécithine-cholestérol acyltransférase)**:

La première enzyme à entrer en jeu est la LCAT (Lécithine-cholestérol acyltransférase) qui est une glycoprotéine synthétisée par le foie qui va permettre le transfert d'un acide gras (siégeant en position sn-2) d'un phospholipide sur une molécule de cholestérol afin de former un ester de cholestérol (Fielding et al., 1972). Elle est majoritairement localisée dans les HDL et nécessite la présence d'apoA1, qui est le cofacteur nécessaire à son activité. Ainsi, la LCAT va transformer des particules d'HDL de petites tailles en de plus grosses particules contenant des esters de cholestérol (Jonas, 2000) (Chroni et al., 2005).

- L'action de la CETP (Cholesteryl Ester transfer protein):

Deuxièmement, et uniquement chez l'Homme, les particules d'HDL vont subir l'action de la CETP (Cholesteryl Ester transfer protein) qui va transférer des esters de cholestérol et des triglycérides des HDL vers d'autres lipoprotéines et inversement (Hopkins and Barter, 1980) (Barter, 2003).

- L'action de la PLTP (Phospholipid Transfer Protein):

La PLTP (Phospholipid Transfer Protein) assure l'échange rapide et spécifique des phospholipides des lipoprotéines contenant l'apoB (comme les VLDL, les IDL et les LDL) vers les HDL. L'activité de la PLTP permet la formation de HDL de grandes tailles conduisant à la libération d'apoA1 pauvres en lipides (Tall et al., 1983) (Lusa et al., 1996). Enfin, les HDL vont arriver au foie.

b-6-E- La capture des HDL par le foie ou l'élimination du cholestérol

Au niveau du foie, les HDL se lient aux récepteurs SR-B1 présents à la surface des hépatocytes. Le SR-B1 va alors sélectivement capter les esters de cholestérol, les triglycérides et les phospholipides (Krieger, 1999) (Röhrl and Stangl, 2013) (Pagler et al., 2006). Le cholestérol peut aussi être directement éliminé dans la bile (sous forme libre ou transformé en acides biliaires). De plus, les HDL sont aussi captées par l'ecto-F1-ATPase au niveau des hépatocytes. Cette protéine reconnait l'apoA1 présente sur les HDL (Martinez et al., 2003). Il a été récemment montré que la liaison de l'apoA1 sur l'ecto-F1-ATPase permet d'augmenter la liaison des HDL et la production du recepteur P2Y13 (Lichtenstein et al., 2015). Il semble possible que l'induction hépatique de la voie de l'ecto-F1-ATPase/P2Y13 augmente l'endocytose des HDL par les hépatocytes, et donc un turnover plus important, ce qui conduirait à une augmentation de l'excrétion du cholestérol des tissus.

Par ailleurs, bien qu'il ne soit pas considéré comme un organe central dans le catabolisme des HDL, le rein dégrade des particules contenant l'apoA1 via la cubiline. Brièvement, cette protéine est capable de se lier à l'apoA1 (Kozyraki et al., 1999), qui est capable de passer la barrière de filtration glomérulaire si elle est peu ou pas lipidée. Il apparaît donc que la dégradation de l'apoA1 par la cubiline intervient dans la régulation générale du métabolisme des HDL (Moestrup and Nielsen, 2005) notamment par son impact sur le turnover de l'apoA1. Cela participe notamment à la régulation de la durée de vie de l'apoA1 dans le sang qui est d'environ 10 heures (Tape and Kisilevsky, 1990).

c- Le métabolisme intracellulaire du cholestérol

c-1- Les esters de cholestérol et le cholestérol libre

Après endocytose des LDLs, le cholestérol libre est donc retrouvé au niveau des endosomes tardifs et/ou des lysosomes. Les mécanismes mis en jeu dans le transport à partir de ces deux organites ne sont pas complètement caractérisés. Cependant, la littérature montrent l'existence de deux destinations du cholestérol libre à partir des endosomes tardifs et des lysosomes : la membrane plasmique ou le réticulum endoplasmique. Cependant, des travaux récents montrent aussi un lien possible entre les lysosomes et la mitochondrie, ainsi qu'entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (Dang et al., 2017) (Mills et al., 2016) (**Figure 6**).

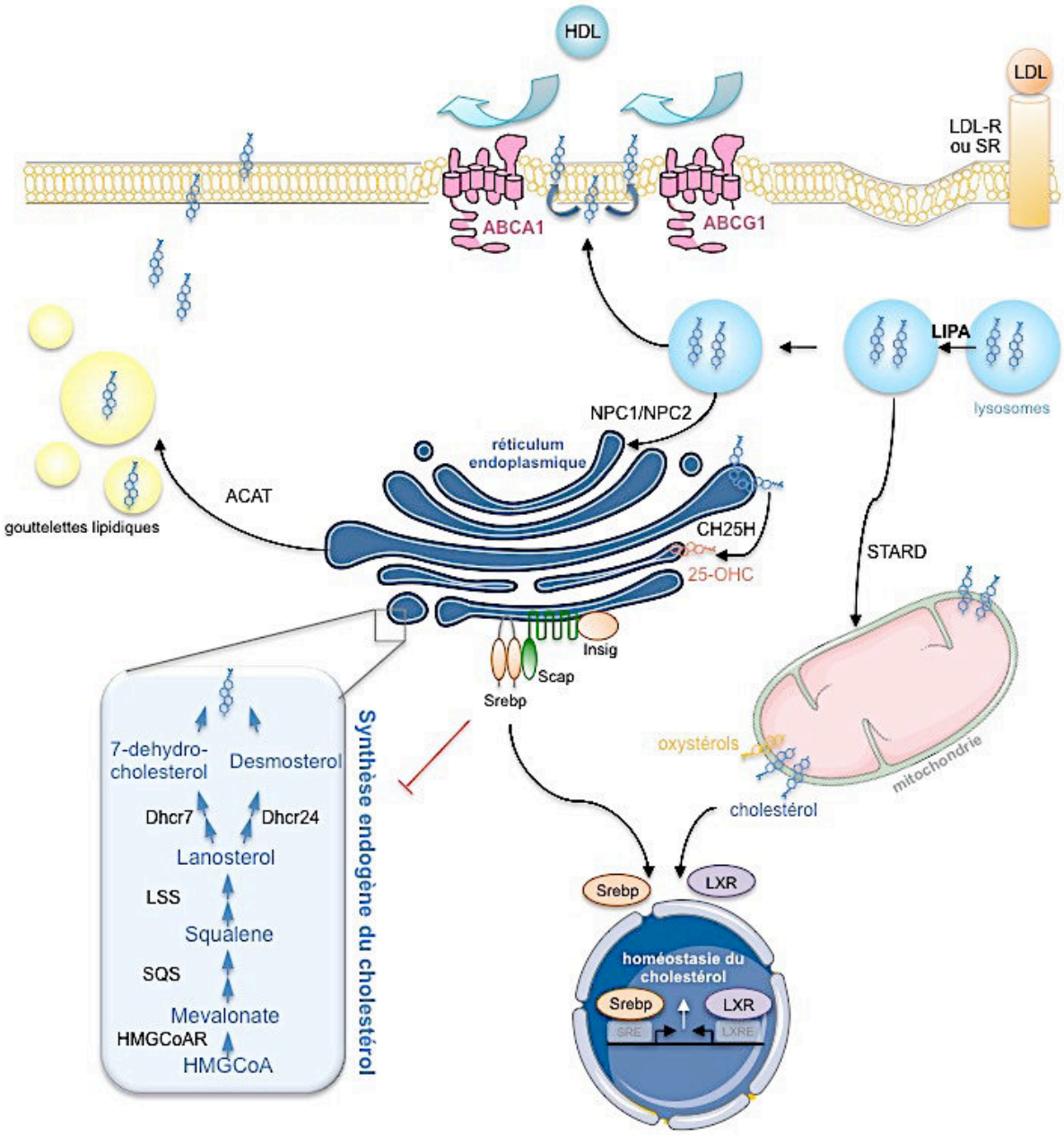


Figure 6: Le métabolisme intracellulaire du cholestérol

Une grande part du cholestérol libre des endosomes tardifs/lysosomes est rapidement transporté à la membrane plasmique pour y enrichir le pool de cholestérol. Il apparaît que plus de 70% du cholestérol endocyté est transporté au niveau des rafts ou radeaux lipidiques de la membrane plasmique, selon le statut en cholestérol de la cellule. Ce sont des régions spécialisées, caractérisées par leur richesse en cholestérol et sphingolipides.

Le cholestérol libre intracellulaire est cytotoxique car son accumulation est délétère pour les membranes cellulaires. La cellule a donc mis en place un système de voies de signalisation pour gérer la quantité de cholestérol libre intracellulaire, en modulant son entrée et sa sortie. L'internalisation et l'efflux de cholestérol sont finement régulés par le taux de cholestérol lui-même, afin de maintenir une concentration constante dans la cellule (Maxfield and Tabas, 2005). Lorsque la cellule présente un excès de cholestérol intracellulaire, et afin d'éviter un enrichissement excessif des membranes en cholestérol et donc de préserver leur fonction, le cholestérol libre va être estérifié au niveau du réticulum endoplasmique par l'ACAT-1 (acyl-coenzyme A cholesterol acyl transferase 1). Les esters de cholestérol ainsi produits sont stockés dans des gouttelettes lipidiques, organelles intracellulaires dédiés au stockage des lipides. Les gouttelettes lipidiques ont un cœur hydrophobe de lipides neutres entouré d'une monocouche de phospholipides et de protéines spécifiques comme la périlipine ou l'adipophiline. La forme de stockage du cholestérol varie selon le type cellulaire étudié. Il est mis en évidence que les macrophages accumulent bien des esters de cholestérol dans les gouttelettes lipidiques lors d'une exposition à des lipoprotéines modifiées comme les LDL oxydées ou agrégées. Ainsi, l'estérification du cholestérol par l'ACAT-1 apparaît comme étant physiologiquement nécessaire au maintien de l'homéostasie lipidique intracellulaire (**Figure 6**).

c-2- L'hydrolyse neutre des esters de cholestérol

Une fois stocké dans les gouttelettes lipidiques sous forme d'esters de cholestérol, le cholestérol ne peut plus être mobilisé dans la cellule s'il n'est pas transformé en cholestérol libre, notamment pour être exporté (sortie du cholestérol de la cellule). En effet, seul le cholestérol libre (non estérifié) est mobilisable. Les esters de cholestérol subissent donc un cycle permanent d'estérification/hydrolyse, permettant à la cellule de disposer d'une quantité de cholestérol libre toujours disponible. A ce niveau, la nCEH (neutral Cholesterol Ester Hydrolase) permet l'hydrolyse des esters de cholestérol en cholestérol libre. Cette enzyme cytoplasmique catalyse l'hydrolyse des esters de cholestérol en cholestérol libre (Igarashi et al., 2010). Dans les macrophages, une voie récemment étudiée, indépendante de la nCEH, permet l'hydrolyse des esters de cholestérol, l'autophagie.

c-3- Mobilisation du cholestérol, le rôle de l'autophagie et de la lipase acide lysosomale

- Définition générale de l'autophagie

L'autophagie est un processus par lequel la cellule va se dégrader elle-même. De manière générale, l'autophagie consiste à la délivrance de compartiments intracellulaires aux lysosomes, qui sont des organelles acides spécialisés dans la dégradation. Ce processus est appelé macroautophagie car il permet d'éliminer des protéines agrégées ou mal conformées, des organelles endommagées (comme les mitochondries, les ribosomes, le RE ou les peroxysomes) ou encore des pathogènes. Ce mécanisme assure ainsi un rôle de contrôle qualité et de recyclage subcellulaire, indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire et probablement de l'homéostasie lipidique.

On distingue l'autophagie, de la microautophagie, permettant la dégradation du matériel cytoplasmique directement dans le lysosome, et de l'autophagie médiée par l'action de chaperonnes permettant la dégradation sélective de protéines cytosoliques.

Historiquement, ce sont les travaux de Christian de Duve qui ont grandement participé à la découverte du lysosome et qui ont introduit la notion d'autophagie (Deter and De Duve, 1967). L'autophagie est alors impliquée dans le recyclage des différents éléments cellulaires et dans la gestion énergétique en situation de déprivation énergétique. Plus tardivement, suite à des travaux réalisés chez la levure, des gènes codant pour des protéines ATG (Autophagy related gene) ont été mis en évidence. Ces gènes sont conservés chez les eucaryotes (Mizushima et al., 2011), et ces travaux ont été récompensés par le Prix Nobel de Médecine 2016. De plus, il avait également été suggéré que l'autophagie pouvait être sélective, permettant la dégradation spécifique de certains composés cellulaires. Ainsi, outre l'autophagie médiée par des chaperonnes et la microautophagie, la peroxyautophagie, la ribophagie, la mitophagie, la glycophagie ou encore la lipophagie ont été mises en évidence.

- L'hydrolyse acide des esters de cholestérol, le rôle de la lipase acide lysosomale

L'hydrolyse acide des esters de cholestérol se produit dans ce contexte précis de lipophagie. Brièvement, la fusion d'un autophagosome contenant des gouttelettes lipides avec la membrane du lysosome va induire la dégradation de ces gouttelettes par les lipases contenues dans le lysosome (Singh et al., 2009). De façon importante, la seule lipase catabolisant les lipides neutres comme les esters de cholestérol présente dans le lysosome est la lipase acide lysosomale (LIPA ou LAL) (Reiner et al., 2014). Ainsi, le cholestérol libre ainsi produit peut être exporté (Ouimet et al., 2011) (Ouimet and Marcel, 2012). Cette enzyme est activée par la charge en cholestérol libre lui-même et prévient d'une

estérification massive de ce dernier (Mei et al., 2012). LIPA est une enzyme qui est aussi appelée lipase A, cholesteryl ester hydrolase acide, cholesterol esterase acide, cholestryl esterase acide. C'est une glycoprotéine de 46kDa (372 acides aminés), codée par le gène *lipa* porté par le chromosome 10 (10q23.2-23.3) (Anderson et al., 1993) (Ameis et al., 1994). La protéine LIPA est glycosylée au niveau du réticulum endoplasmique et un groupement mannose-6-phosphate est ajouté dans l'appareil de Golgi. Cela permet de diriger cette enzyme dans le compartiment lysosomal des cellules (Sando and Henke, 1982) (Sheriff et al., 1995). Des mutations du gène *lipa* induisent une déficience totale ou partielle de l'activité de l'enzyme. Dans le cas d'une déficience totale, les patients sont atteints de la maladie de Wolman, dont le pronostic est fatal durant la première année de vie sans complémentation de l'enzyme.. Actuellement, la complémentation se fait par des injections intra-veineuses de sébélipase alpha, enzyme recombinante humaine. Dans le cadre d'une déficience partielle, les patients sont atteints de CESD (pour Cholesteryl Ester Storage Disease). Ces patients présentent un dépôt ectopique de graisses dans le foie, une splénomégalie, une augmentation de la concentration plasmatique en LDL et une réduction de celle des HDL. Ainsi, ces patients présentent un risque accru de développer des maladies cardiovasculaires

Ainsi, deux mécanismes très différents ont été définis, l'hydrolyse neutre par la nCEH, et l'hydrolyse acide par autophagie et l'action de l'enzyme LIPA. Chacun semble avoir une part équivalente dans la mobilisation du cholestérol pour l'efflux, et est essentiel à la régulation de la quantité de cholestérol libre intracellulaire. Cependant, un bon nombre de question concernant les différences entre ces deux systèmes restent en suspend. Il est important de souligner que la sortie du cholestérol depuis les lysosomes est un point critique du métabolisme intracellulaire du cholestérol.

c-4- Le trafic intracellulaire du cholestérol libre

Une fois le cholestérol libéré des LDLs ou néosynthétisé, il est retrouvé à la membrane des endosomes/lysosomes grâce à l'action séquentielle de deux protéines. Les protéines NPC-1 et NPC-2 (Niemann-Pick C-1 et C-2, respectivement) agissent ensemble dans l'efflux de cholestérol depuis le compartiment endosomal/lysosomal (**Figure 6**). Ensemble, ces deux protéines catalysent la mobilisation du cholestérol depuis les endosomes tardifs. NPC-2 va lier du cholestérol libre dans la lumière des endosomes/lysosomes et va ainsi le transférer sur NPC-1. Il semble que NPC-1 et NPC-2 soient capables de lier les oxystérols avec une affinité plus forte que pour le cholestérol (Infante et al., 2008). Une mutation du gène NPC-1 (95%) ou NPC-2 (5%) provoque la maladie de Niemann-Pick type C, un désordre rare du stockage lipidique neuroviscéral

(Schuchman and Wasserstein, 2015). Le transport lipidique intracellulaire est interrompu, conduisant à l'accumulation de cholestérol et de sphingolipides dans les endosomes et les lysosomes. Le cholestérol libre va se retrouver à la surface de ces organites et il va alors être exporté vers le réticulum endoplasmique ou la membrane plasmique via deux mécanismes principaux détaillés ci-dessous, soit le trafic vésiculaire et le trafic non vésiculaire.

Le cholestérol ne peut pas circuler librement dans la cellule, et nécessite des transporteurs pour être acheminé à la membrane plasmique où il sera exporté. Dans la cellule, la composition en lipides des membranes est différente et spécifique selon les organelles. En particulier, il existe un gradient de cholestérol, qui est très peu abondant dans le réticulum endoplasmique (environ 5%) mais la membrane plasmique en est très riche (30%). Le cholestérol est une molécule qui permet, entre autre, d'augmenter la rigidité et l'imperméabilité des membranes, empêchant le flip-flop des autres lipides d'un feuillet à l'autre de la bicouche lipidique des membranes. Le cholestérol possède de nombreuses fonctions. En effet, d'un point de vue structurel, le cholestérol intervient aussi dans la création de nouvelles membranes lors de la prolifération cellulaire. De même, il intervient aussi dans de nombreuses voies de signalisation. Le gradient de concentration en cholestérol entre les organelles permet le maintien de leur hétérogénéité structurale et fonctionnelle (Maxfield and Menon, 2006). Le maintien de ce gradient nécessite le transport intracellulaire du cholestérol. Pour cela, la cellule utilise deux voies principales, celle du trafic vésiculaire ou celle liée aux LTPs (Lipid Transfert Proteins).

Premièrement, le trafic vésiculaire est finement régulé et emprunte des voies bien définies. Il est coordonné par les protéines Rab, grande famille de protéines GTPases. Ces protéines contrôlent chacune des étapes de ce trafic comme la formation de la vésicule à partir de la membrane de l'organelle, son transport via le cytosquelette et sa fusion avec la membrane de l'organelle auquel la vésicule est destinée. Les Rabs lient le GTP, elles sont alors sous forme active, puis elles l'hydrolysent en GDP et deviennent alors inactives. Sous forme active, les Rabs vont reconnaître la vésicule, de manière spécifique, ainsi que des co-facteurs (protéines membranaires des vésicules) qui vont permettre la fusion ou le transport de ces vésicules. Une fois la vésicule créée, elle doit être acheminée vers son organite de destination. Les cavéolines jouent un rôle direct dans la biogénèse des vésicules mais elles semblent aussi lier le cholestérol (Ikonen and Parton, 2000), comme décrit plus bas. Pour cela, la famille des protéines SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion attachment protein (SNAP) receptors) entre en jeu. Elles sont présentes sur la membrane des vésicules (vesicular-SNAREs ou v-SNAREs) et de l'organelle cible (target-SNAREs ou t-SNAREs).

L'ensemble de ces protéines va alors interagir et médier la liaison des membranes entre la vésicule et la cible permettant ainsi la fusion entre les deux.

Ainsi, deux trajets vésiculaires sont majoritairement possibles et sont déterminés par la spécificité moléculaire des protéines effectrices. Premièrement, la voie de l'endocytose qui passe successivement par les endosomes primaires, les endosomes de recyclage, les endosomes tardifs et enfin le lysosome (Maxfield and Wüstner, 2002). Deuxièmement, la voie de synthèse des protéines qui emprunte successivement le noyau, le réticulum endoplasmique, le Cis-Golgi et le Trans-Golgi, pour terminer par une vésicule d'exocytose. Ces deux voies sont connectées par le compartiment de recyclage endosomal. Le trafic vésiculaire apparaît donc comme un mécanisme clé dans le métabolisme intracellulaire du cholestérol, notamment dans sa biodisponibilité et son efflux (Ouimet and Marcel, 2012). En parallèle, un trafic non-vésiculaire est nécessaire afin d'assurer le transport du cholestérol.

C'est dans ce cadre que les STPs (Sterols Transfer Proteins) et les LTPs (Lipids Transfer Proteins) interviennent. Elles assurent le transport du cholestérol de manière non-vésiculaire et permettent l'équilibration des concentrations en cholestérol dans les diverses membranes intracellulaires (Lev, 2010). Les STPs interagissent directement avec la membrane d'un compartiment donneur et le délivre à un autre compartiment, particulièrement entre la membrane plasmique et le réticulum endoplasmique. C'est à ce niveau que se fait la régulation de l'homéostasie du cholestérol libre dans les cellules. Comme expliqué plus haut, lorsque la concentration en cholestérol est faible, l'activation du facteur de transcription SREBP2 va aussi permettre la transcription des protéines STARD (Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR)-related lipid-transfer (START) domain). Ces protéines sont impliquées dans la régulation du trafic lipidique intracellulaire. Notamment, STARD4 est impliquée dans le transport des stérols et donc joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol (Horton et al., 2003) (Soccio et al., 2005) (Mesmin et al., 2011). Cette protéine va transporter le cholestérol de la membrane plasmique au réticulum endoplasmique, où elle pourra alors activer l'ACAT (Rodriguez-Agudo et al., 2008) (Rodriguez-Agudo et al., 2011).

Une autre famille de protéine, les OSBP (Oxysterol binding protein) et les ORP (OSBP Related Protein), peuvent également être activées par des variations plus fines de la composition des membranes subcellulaires, notamment les phosphoinositides, et vont transporter des stérols particuliers, comme les stérols oxydés ou oxystérols. Elles sont engagées dans de nombreux processus cellulaires comme la coordination du métabolisme des stérols et des sphingolipides et des signaux mitogéniques, le contrôle des contacts entre le réticulum endoplasmique et les endosomes tardifs ainsi que la mobilité des endosomes

tardifs (ORP1L). Ces protéines sont aussi impliquées dans le métabolisme des lipides neutres (ORP1 et ORP2), l'adhésion cellulaire (ORP3), l'efflux du cholestérol des endosomes tardifs (ORP5), l'homéostasie lipidique des macrophages, la migration des HDL ainsi que leur métabolisme (ORP8), la sécrétion de l'ApoB100 (ORP10) et l'adipogenèse (ORP11) (Olkkonen and Li, 2013). Si elles sont hétérogènes fonctionnellement, des études proposent une fonction commune et partagée : transférer les stérols nouvellement synthétisés du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique (Sullivan et al., 2006) (Beh et al., 2009). Cependant, cette fonction reste controversée et les OSBP/ORP sont aussi proposées comme étant des senseurs lipidiques plutôt que des transporteurs.

Dans le cadre du transport intracellulaire non-vésiculaire du cholestérol, LAMP1 et LAMP2 (lysosomal-associated membrane protein-1 et -2) jouent un rôle important. Elles sont des protéines abondantes, exprimées ubiquitairement et situées à la membrane des lysosomes. Récemment, il a été mis en évidence qu'elles lient le cholestérol via leur domaine luminal et qu'elles pourraient accepter le cholestérol depuis NPC-2 et ainsi faciliter l'efflux de cholestérol d'une manière dépendante de la voie NPC-1 et NPC-2 (Li and Pfeffer, 2016).

c-5- Le cholestérol à la membrane plasmique

Dans ce paragraphe, nous allons nous intéresser aux mécanismes généraux qui régissent l'homéostasie du cholestérol dans la membrane plasmique. Le cholestérol est un composant majeur de la membrane plasmique. Il intervient autant sur le plan structurel que fonctionnel. Ainsi, la répartition de cholestérol dans la membrane plasmique permet la création de domaines riches en cholestérol (et en glycosphingolipides) qui sont appelés des radeaux lipidiques. Ce sont des zones rigides et structurées qui sont contenues dans une membrane plasmique plus fluide. Les radeaux lipidiques contiennent un ensemble de protéines spécifiques. Ces domaines comprennent ainsi deux types de structures. Premièrement, les cavéoles, invaginations de la membrane plasmique contenant notamment la protéine de structure cavéoline-1 et deuxièmement, les radeaux lipidiques « non cavéolaires ».

Les cavéolines sont de petites protéines possédant une structure en « épingle à cheveux », avec les parties N-terminales et C-terminales en regard du cytoplasme (Krajewska and Masłowska, 2004). Ces protéines sont capables de lier du cholestérol et permettent ainsi le transport du cholestérol du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique (Murata et al., 1995) (Smart et al., 1996). Par exemple, la sur-expression de cavéolines dans des hépatocytes permet une augmentation de l'efflux de cholestérol sans

modification de l'expression du transporteur ABCA1 ou de sa quantité à la membrane plasmique (Fu et al., 2004). Ceci suggère que les cavéolines sont capables d'augmenter le transfert de cholestérol dans les domaines riches en cholestérol.

La membrane plasmique est le lieu où le cholestérol va pouvoir être exporté de la cellule. Il existe deux grandes voies générale d'efflux du cholestérol : la diffusion passive et l'efflux actif du cholestérol. L'efflux actif du cholestérol est dépendant de transporteurs tels ABCA1 et ABCG1, et nécessite la présence d'ATP. Nous allons rapidement définir la diffusion passive du cholestérol. En effet, le cholestérol peut diffuser de manière passive à travers la membrane plasmique, de manière dépendante d'un gradient de concentration du cholestérol et de molécules acceptrices (Karlin et al., 1987). Dans ce processus, l'étape de désorption du cholestérol est limitante. En effet, le transfert d'une molécule de cholestérol hydrophobe depuis l'environnement apolaire de la membrane plasmique vers un environnement aqueux extracellulaire est un processus couteux en énergie (Phillips et al., 1987). Mécanistiquement, la diffusion passive est le résultat d'une collision entre les molécules de cholestérol libre présentes à la membrane plasmique (après désorption) et des particules acceptrices de l'espace extracellulaire, indépendamment de leur taille, de leur structure et de leur composition (Davidson et al., 1995). Ce mécanisme est également bidirectionnel, il est aussi impliqué dans la captation de cholestérol. L'importance de l'activité de cette voie semble dépendre du type cellulaire et reste largement discuté (Ohashi et al., 2005) (Phillips, 2014). Dans le macrophage, cette voie ne semble pas impliquée (Adorni et al., 2007). De plus, il a été démontré qu'en absence des transporteurs ABCA1 et ABCG1, transporteurs impliqués dans l'efflux actif du cholestérol, il reste un efflux résiduel non négligeable de 30%, suggérant le rôle d'autres transporteurs ou le rôle de la diffusion passive (Yvan-Charvet et al., 2007a).

d- Les thérapies anti-athérosclérose actuelles et futures

Comme nous venons de le décrire, l'athérosclérose est une pathologie complexe, mettant en jeu de nombreux acteurs. Cela offre une large palette pour apporter des traitements à cette pathologie. L'un des premiers acteurs à avoir été mis en exergue est le cholestérol. En effet, dans un premier temps, il a été mis en évidence que les patients atteints d'athérosclérose possédaient une concentration accrue de cholestérol dans les LDL (LDL-C) (Gotto, 2009). En effet, le LDL-C est un facteur de risque indépendant pour les maladies cardio-vasculaires (Fredrickson and Lees, 1965) (Dawber et al., 1957). La découverte du récepteur aux LDL (le LDL-R) a permis une meilleure compréhension dans le métabolisme des lipoprotéines et de comprendre plus aisément le lien entre LDL-C et

maladies cardiovasculaires. De même, la découverte des statines, qui sont une classe de molécule inhibant la HMG-CoA réductase, une enzyme clé dans la synthèse endogène du cholestérol, a révolutionné l'approche du traitement des maladies cardiovasculaires en permettant de diminuer la concentration plasmatique en cholestérol. Au vue des essais cliniques menés avec cette classe de molécules, les statines apparaissent comme la première classe de médicament ayant un effet protecteur dans l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires en général (Ference, 2015) (Ference et al., 2017). Cependant, malgré les effets bénéfiques des statines, la prise en compte des autres facteurs impliqués dans l'athérosclérose reste importante.

d-1- Les modulateurs lipidiques, autres que les statines.

Une concentration trop importante en cholestérol dans le sang ou hypercholestérolémie peut être causée par des mutations génétiques, notamment celle du LDL-R. Plus récemment, d'autres protéines ont été impliquées dans l'hypercholestérolémie, comme la lipoprotéine majeur des LDL, l'apoplipoprotéine B ou la proprotéine converstase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9). Ces découvertes offrent alors de nouvelles pistes thérapeutiques afin d'abaisser la concentration en cholestérol dans le sang, les inhibiteurs de l'apolipoprotéine B et de la PCSK9. Récemment, deux anticorps monoclonaux anti-PCSK9 ont été approuvés dans le traitement de l'hypercholestérolémie (Sabatine et al., 2017).

L'hypocholestérolémie peut aussi être causée par un défaut de synthèse du cholestérol endogène (Porter and Herman, 2011). Ainsi, ces défauts génétiques offrent des pistes thérapeutiques. Brièvement, deux inhibiteurs de la 24-déhydrocholestérol réductase (DHCR24) ont été testés en clinique, mais ils présentent beaucoup d'effets secondaires délétères (Porter and Herman, 2011). Aussi, un inhibiteur de la squalène synthase a été étudié mais n'a pas pu être utilisé en clinique au vue de son hépatotoxicité (Stein et al., 2011). Plus récemment, un inhibiteur de l'ATP citrate lyase, enzyme importante dans la biogénèse de l'acétyl-CoA à partir du citrate et impliquée dans la biogénèse du cholestérol et des lipides, pourrait être une nouvelle piste thérapeutique dans le traitement des maladies cardiovasculaires (Bilen and Ballantyne, 2016). De plus, l'étude de cas d'hypocholestérolémie due à des mutations des protéines de transfert microsomal (les MTP) ou de l'angiopoïétine like-3 (ANGPTL3) a permis de proposer des inhibiteurs de la MTP ou de l'ANGPTL3 dans le traitement des maladies cardiovasculaires (Hooper et al., 2005) (Gaudet et al., 2017).

En parallèle, les études GWAS (Genome-Wide Association Studies) ont mis en lumière plusieurs gènes pouvant être impliqués dans le métabolisme des LDL en lien avec les maladies cardiovasculaires (Khera and Kathiresan, 2017). Ces gènes inclus celui codant pour la protéine NPC1L1 (Cannon et al., 2015), des transporteurs ABCG5/ABCG8 (Rader et al., 2003), de la SORT1 (sortiline 1) et de TRIB1 (tribbles homolog 1) (Nurnberg et al., 2016). De manière intéressante, une augmentation des risques cardiovasculaires a été associée avec une diminution de l'activité de l'enzyme LIPA (Lysosomal Acid Lipase ou LAL) (Morris et al., 2017). Rapidement, la déficience partielle en LIPA induit de nombreuses complications, telles que des complications métaboliques, notamment une hyperlipidémie, mais aussi une hépato-splénomégalie, et une apparition rapide de lésions d'athérosclérose. Actuellement, les patients déficients sont traités par une thérapie de remplacement, la sébélipase alpha (Burton et al., 2015). Cette thérapie pourrait donc être appliquée aux patients atteints d'athérosclérose.

d-2- L'augmentation du HDL-cholestérol

Les lipoprotéines de haute densité ou HDL sont impliquées dans l'efflux de cholestérol depuis les cellules périphériques vers le foie où le cholestérol sera éliminé. Nous reviendrons de manière plus détaillée sur le rôle des HDL dans la pathologie athéromateuse ultérieurement. Une déficience en HDL aussi appelée hypoalphalipoprotéinémie provoque un risque accru de maladies cardio-vasculaires (Weissglas-Volkov and Pajukanta, 2010). Malgré la non-identification de l'ensemble des mutations à l'origine de cette pathologie, trois gènes sont impliqués : celui de la LCAT (Lecithin AcylTransferase), enzyme impliquée dans l'estérification du cholestérol des HDL, celui du transporteur ABCA1, impliqué dans la biogénèse des HDL et celui de l'apolipoprotéine A1 (apoA1), lipoprotéine majeure des HDL. Ces patients développent rapidement des lésions d'athérosclérose et une hépato-splénomégalie. Les capacités d'efflux du cholestérol des macrophages, fortement corrélées à la fonction des HDL, sont en corrélation inverse avec les risques de maladies cardiovasculaires (Khera et al., 2011). Plusieurs essais cliniques utilisant un inhibiteur de la CETP (Cholesteryl Ester Transfer Protein) ont été menés. Cette enzyme impliquée dans le transfert des esters de cholestérol et des triglycérides entre les HDL et LDL, ce qui permet de contrôler la taille et la composition des lipoprotéines. Malgré l'échec de nombreux essais cliniques, il a été démontré que l'inhibition de cette enzyme permet une augmentation de la concentration plasmatique en HDL et réduit ainsi le risque de maladies cardiovasculaires. De plus, certaines études suggèrent que les effets observés seraient aussi dus à une diminution de la concentration en LDL (Nicholls et al., 2011).

d-3- La modulation du métabolisme du glucose

Même si de nombreuses évidences lient le diabète aux maladies cardiovasculaires, le mécanisme exact n'est pas complètement élucidé. De manière intéressante, le contrôle de la glycémie et du niveau d'hémoglobine glyquée (HbA1c) sont des paramètres importants dans la réduction du risque de maladies cardiovasculaires (Roussel et al., 2018). En effet, il a été démontré par des études mendéliennes randomisées que l'hyperglycémie jouait un rôle direct dans les maladies cardiovasculaires (Ross et al., 2015) (Ahmad et al., 2015). Récemment, les inhibiteurs du cotransporteur sodium-glucose 2 (SGTL2) qui permet une diminution de la glycémie en augmentant la glycosurie ont démontré leur efficacité sur les maladies cardiovasculaires (Zinman et al., 2015) (Neal et al., 2017) (Zaccardi et al., 2016). D'autres classes de médicaments, comme ceux agissant sur les incrétines, sont en cours d'études. Ces résultats apportent de nouvelles pistes de recherche afin d'apporter un traitement aux patients diabétiques atteints de maladies cardiovasculaires.

Pour conclure sur cette partie, l'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique, à l'origine des maladies cardiovasculaires. Nous avons vu que plusieurs facteurs entraient en jeu, notamment l'importance du rôle du métabolisme du cholestérol. Le métabolisme du cholestérol est notamment crucial dans les cellules myéloïdes, que ce soit les monocytes ou les macrophages. Nous allons maintenant détailler le rôle des cellules myéloïdes dans l'athérosclérose ainsi que le rôle du métabolisme du cholestérol dans ces cellules.

II- Le rôle des cellules myéloïdes dans la pathologie athéromateuse

L'évidence que les cellules immunes jouent un rôle majeur dans la mise en place et le développement de l'athérosclérose est depuis longtemps connue. Cette hypothèse est depuis confortée par de nombreuses études qui lient la formation et le développement de la plaque d'athérosclérose à des processus immuno-inflammatoires.

L'athérosclérose se caractérise par une inflammation chronique, avec une accumulation de LDL (Low Density Lipoprotein ou Lipoprotéine de faible densité) et de cellules apoptotiques, ce qui est fortement inflammatoire et immunogène. Cela permet un recrutement des cellules immunitaires innées telles que les cellules NK (pour Natural Killer), les neutrophiles, les granulocytes, les cellules dendritiques et les monocytes (qui se différencieront en macrophages) (Moore and Tabas, 2011).

Ici, nous allons nous concentrer sur le rôle des cellules myéloïdes : les monocytes et les macrophages. En effet, il est démontré que ces cellules sont essentielles au maintien de l'homéostasie tissulaire en agissant sur la réponse inflammatoire, immunitaire et phagocytaire. Nous décrirons la biogénèse des cellules myéloïdes plus tard, dans une troisième partie. Brièvement, afin de faciliter la compréhension de la partie suivante, il existe deux sous-types majoritaires de monocytes. Premièrement, les monocytes Ly6C^{high} sont capables de transmigrer au travers de l'endothélium afin de rejoindre les tissus en fonction des divers signaux (Jakubzick et al., 2013) (Auffray et al., 2007). Dans le cadre de l'athérosclérose, ce sont les monocytes Ly6C^{high} qui vont être recrutés au sein de la plaque (Swirski et al., 2007) (Tacke et al., 2007). Deuxièmement, les monocytes Ly6C^{low} servent de « patrouilleur » dans les vaisseaux sanguins et aide aux fonctions des cellules endothéliales (Auffray et al., 2007). De manière intéressante, que le nombre de monocytes circulants est un facteur de risque indépendant dans le développement et la pathogénicité des maladies cardiovasculaires. De plus, il est important de souligner que le rôle des cellules myéloïdes au sein de plaque d'athérosclérose est dépendant de l'état de la plaque d'athérosclérose.

a- Le recrutement des monocytes au niveau de la plaque d'athérosclérose

Durant la formation de la plaque d'athérosclérose, les monocytes sont rapidement recrutés au niveau de l'intima et du sous-endothélium (Imhof and Aurrand-Lions, 2004) (Ley et al., 2007) (**Figure 7**). Les monocytes sont recrutés afin de phagocyter notamment les LDL

oxydées. En effet, au sein des plaques d'athérosclérose, une inflammation non négligeable est observée. Cette inflammation impacte de nombreux processus et notamment le métabolisme des lipoprotéines. Les LDL subissent alors des modifications, comme l'oxydation. Leurs fonctions se retrouvent ainsi modifiées. Après phagocytose des LDL oxydées, les monocytes se différencient alors en macrophages spumeux qui vont par la suite participer à la formation de la plaque. Dans un premier temps, le dépôt de lipides au niveau de l'intima induit une accumulation de cellules immunitaires et de lipides extracellulaires qui vont former le cœur de la plaque, lui-même est entouré de cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire. La sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance par les cellules de la plaque permet une augmentation du recrutement des cellules immunitaires au niveau de la plaque. Ce phénomène contribue à la progression de la plaque. Le cœur lipidique peut alors se nécroser. Au fil du temps, la sécrétion de protéases et de cytokines par les macrophages va fragiliser la chape fibreuse et provoquer une rupture de la plaque. Cela induit la mise en contact du contenu pro-thrombosant de la plaque et du sang circulant, provoquant un thrombus à l'origine de l'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires. Il existe donc une corrélation positive entre la rupture de plaque et le nombre de cellules immunitaires présentes dans la plaque (Shah, 2007). Les monocytes et les macrophages ont été les premières cellules immunitaires à être associées avec l'athérosclérose. Il faut noter que, dès la fin des années 90, en utilisant un modèle murin d'athérosclérose déficient pour le M-CSF (macrophages-colony stimulating factor), les souris op/op, les cellules myéloïdes ont été mises en cause dans le développement de l'athérosclérose (Rajavashisth et al., 1998). Elles semblent y jouer un rôle délétère. Parmi les exemples à citer, la déplétion des monocytes circulants par l'utilisation de chlodronate est associée à une diminution de la formation de plaque d'athérosclérose chez le lapin (Ylitalo et al., 1994). Dans un modèle d'athérosclérose murin (ApoE$^{-/-}$), il est démontré que les monocytes Ly6C^{high} sont préférentiellement recrutés au niveau de la plaque (Swirski et al., 2007) (Tacke et al., 2007). L'hyperlipidémie est un facteur de risque connu de l'athérosclérose. En effet, cela augmente le nombre de monocytes Ly-6C^{high} circulants. Dans la plaque, les monocytes patrouilleurs (Ly6C^{low}) sont aussi recrutés dans une moindre mesure. Cependant, à défaut d'être préférentiellement recrutés, il a été démontré que les monocytes Ly6C^{low} expriment plus de CD36, de PPARγ et d'ABCA1 suggérant un rôle dans la détection et la régulation du métabolisme du cholestérol systémique (Ingersoll et al., 2010).

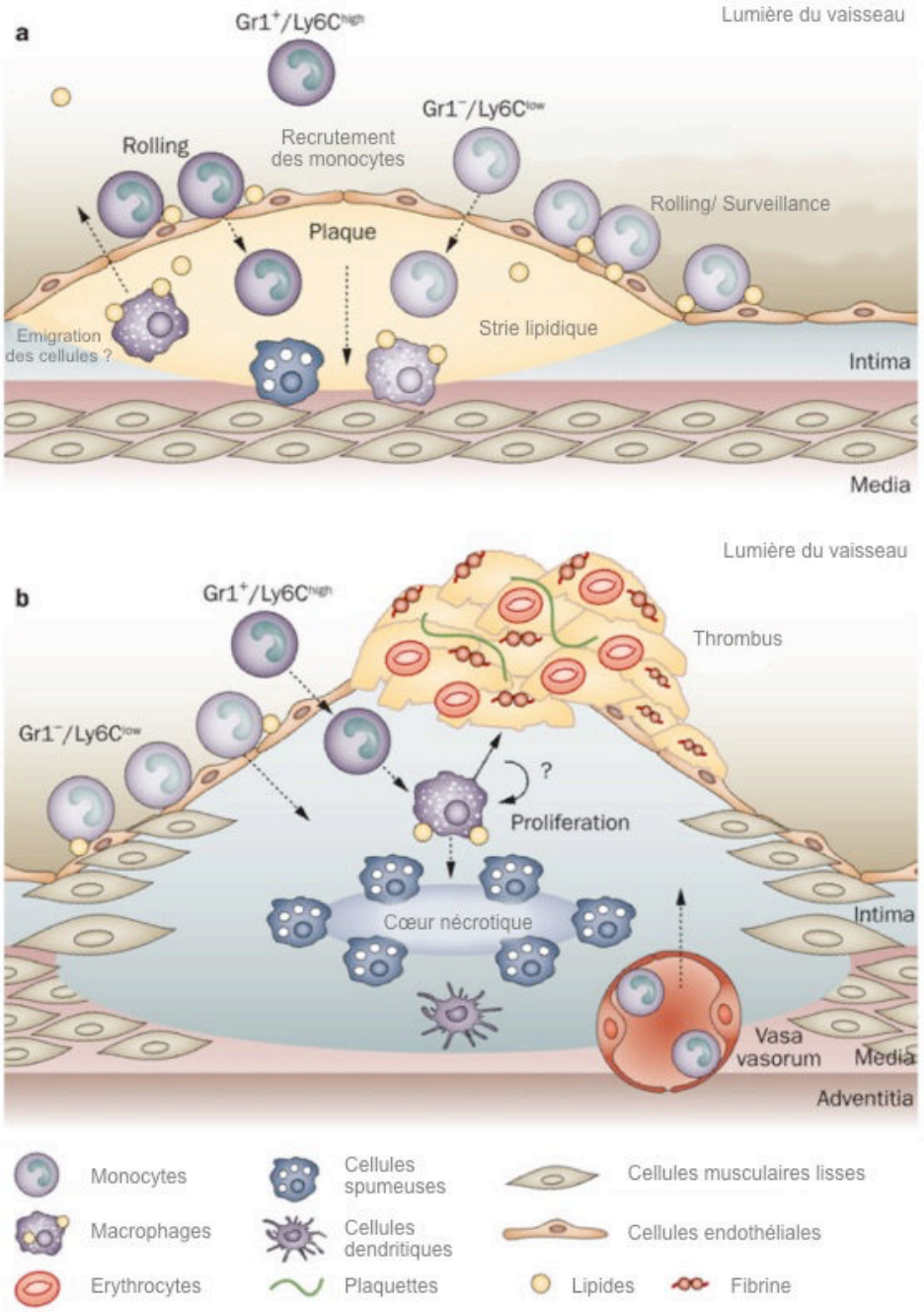


Figure 7: **Le rôle des cellules myéloïdes (monocytes Ly6C^{high} et Ly6C^{low} / macrophages) dans les plaques d'athérosclérose.** **a**- La formation de la plaque d'athérosclérose: le recrutement des monocytes dans les stries lipidiques. **b**- La maturation de la plaque d'athérosclérose: l'apparition d'un cœur nécrotique et d'une rupture de plaque
Adapté d'après Woolard K.J. et Geissman F., Nat Rev Cardio, 2010

De manière générale, le recrutement des leucocytes au niveau des sites inflammatoires nécessite la présence de multitudes de facteurs tels que les sélectines, des molécules d'adhésion cellulaire et des chemokines. A ce niveau, l'endothélium est activé, ce

qui permet le recrutement des monocytes circulants. Les monocytes circulants proviennent de la moelle osseuse mais aussi de la myélopoïèse extra-médullaire qui permet une mobilisation rapide des monocytes lors d'une inflammation. Nous reviendrons sur la production des monocytes, soit la myélopoïèse plus tardivement, dans une quatrième partie. En effet, il a été démontré que, dans un modèle murin d'athérosclérose (ApoE$^{-/-}$), les cellules souches hématopoïétiques (CSH) se relocalisent progressivement au niveau de la rate (en particulier au niveau de la pulpe rouge). Sous la stimulation de cytokines, les CSH vont produire des monocytes Ly6C^{high} qui vont alors entrer dans la circulation sanguine (Murphy et al., 2011) (Robbins et al., 2012).

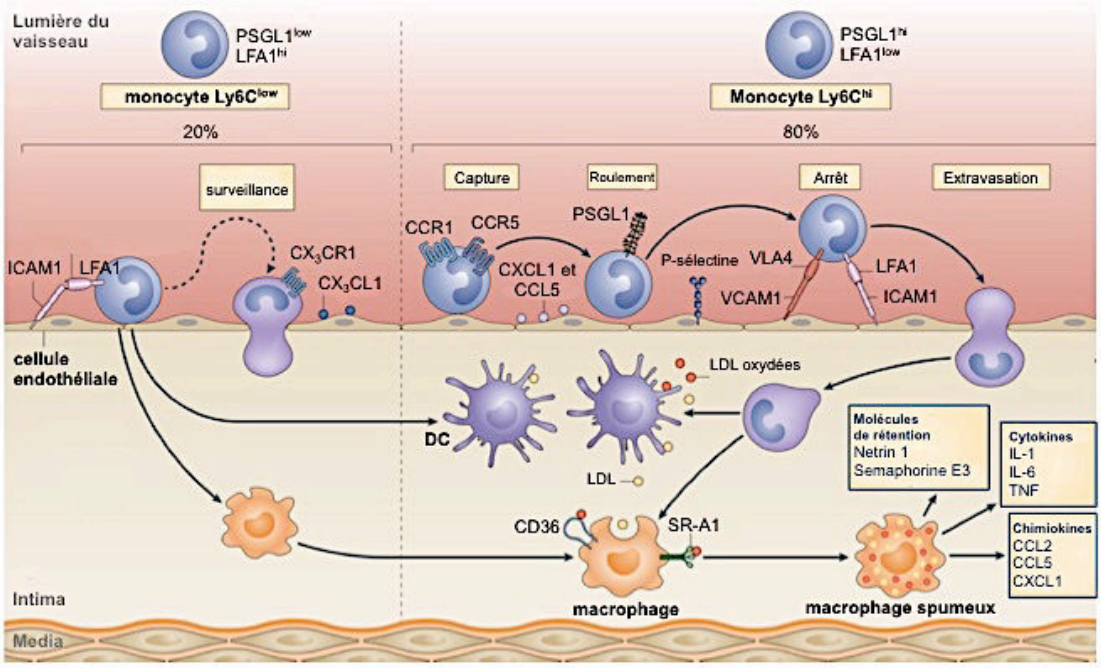


Figure 8: Les mécanismes de recrutement des monocytes dans les plaques d'athérosclérose. En conditions inflammatoires, le nombre de monocytes Ly6C^{hi} augmente dans le sang. Les monocytes Ly6C^{low} jouent un rôle de patrouilleur dans les vaisseaux. Ces deux sous-classes de monocytes sont recrutés au niveau de l'intima des vaisseaux par différentes classes de protéines. Le recrutement est facilité par l'expression de molécules d'adhésion endothéliale, comme la sélectine, ICAM1 (Intercellular adhesion molecule) et VCAM1 (Vascular adhesion molecule). Les monocytes recrutés se différencient alors en macrophages, qui captent les lipoprotéines via des récepteurs scavengers tels que CD36 ou SR-A1, et se transforment en macrophages spumeux. Ces cellules spumeuses sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1, IL-6 et le TNF, des chimiokines (CCL2, CCL5 et CXCL1) ainsi que des facteurs de rétention qui amplifient la réponse inflammatoire.
CX_3CR1: CX_3C receptor 1, CX_3CL1: CX_3C ligand 1, LFA1: lyphocyte function-associated antigen 1, PSGL1: P-Selectin glycoprotein ligand 1.
Adapté de Moore KJ., Sheedy FJ. et Fisher EA., Nature Rev Imm, 2013.

- *Le rôle des récepteurs aux chimiokines* : Les chimiokines et leurs récepteurs jouent un rôle primordial dans la circulation des monocytes et dans leur migration vers la plaque d'athérosclérose (Zernecke et al., 2008) (Charo, 2004). Les récepteurs CX3CR1 (CX3C chemokine receptor 1), CCR2 (C-C chemokine receptor type 2) et CCR5 (C-C chemokine receptor type 5), présents sur les monocytes, permettent le recrutement des monocytes Ly6C^{high} au sein de la plaque. En effet, l'endothélium activé va exprimer les ligands de ces récepteurs, en particulier CX3CL1 et CCL5 (**Figure 8**). Cela va induire une interaction entre le récepteur et son ligand. Les monocytes vont alors adhérer à la surface de l'endothélium et s'arrêter à ce niveau. Il est important de noter que le CCR5 et le CX3CR1 semblent aussi important dans le recrutement des monocytes Ly6C^{low} (Combadière et al., 2008) (Tacke et al., 2007) (Landsman et al., 2009). Le CCR2 est lui plus important pour la sortie de la moelle des monocytes mais il est aussi un acteur clé du recrutement des monocytes au sein de la plaque (Saederup et al., 2008).

- *Le rôle des sélectines* : Les sélectines sont des molécules d'adhésion intervenant dans de nombreux processus et notamment dans l'adhésion des monocytes à la plaque d'athérosclérose. Le récepteur de la P-sélectine (PSGL-1 pour P-selectin glycoprotein ligand-1) est largement exprimé par les monocytes Ly6C^{high}, ce qui leur permet d'être préférentiellement recrutés. La P-sélectine présente sur l'endothélium va être reconnue (Woollard and Chin-Dusting, 2007). La E-sélectine semble aussi jouer un rôle important dans le roulement et l'arrêt des monocytes sur l'endothélium car elle est aussi capable de reconnaître le PSGL-1 (**Figure 8**). De plus, en 2008, il a été démontré que l'expression de PSGL-1 corrèle avec celle du Ly6C, permettant aux monocytes Ly6C^{high} d'être préférentiellement recrutés au niveau de la plaque (An et al., 2008). La L-sélectine entre aussi en jeu dans l'étape de roulement ou « rolling » des monocytes sur l'endothélium. Il est important de souligner que, les monocytes Ly6C^{low} n'expriment pas la L-sélectine contrairement aux monocytes Ly6C^{high}.

- *Le rôle des intégrines* : Les intégrines présentes à la surface des monocytes sont importantes dans le recrutement des monocytes à la plaque (Woollard and Geissmann, 2010). En effet, VLA4 (ou intégrine α_4) et LFA1 (ou intégrine β_2) présentes à la surface des monocytes reconnaissent des molécules d'adhésion présentent sur l'endothélium, comme VCAM-1 (Vascular Cell-Adhesion Molecule-1) et ICAM-1 (Intercellular Cell-Adhesion Molecule-1). Ces deux intégrines sont largement exprimées par les monocytes circulants (**Figure 8**). En revanche, les monocytes Ly6C^{low} expriment plus fortement LFA1 que les monocytes Ly6C^{high} (Geissmann et al., 2003). Cela permet aux monocytes Ly6C^{low} d'être recrutés au niveau de l'endothélium.

- *Autres facteurs* : Les molécules du guidage axonal semblent jouer un rôle dans le recrutement des monocytes au cours de l'athérosclérose. En effet, des protéines de la famille des nétrines, des sémaphorines et des éphrines sont exprimées par les cellules endothéliales et leur expression est modulée dans des conditions pro- ou anti-athérogènes. Il semblerait que ces molécules soient capables de moduler l'infiltration des monocytes via des mécanismes de chémoattraction (Moore et al., 2013).

b- Le rôle de l'émigration et de la prolifération des cellules myéloïdes dans les lésions d'athérosclérose

Le nombre de macrophages dans la plaque est déterminé par le nombre de monocytes recrutés mais est aussi contrebalancé négativement par leur émigration et la mort des macrophages, mais aussi positivement par leur prolifération au sein de la plaque.

De manière intéressante, et malgré leur rôle délétère au sein de la plaque, les monocytes sont aussi capables d'émigrer de la plaque, même si cela reste controversé. Quelques études démontrent ainsi que la sortie des monocytes de la plaque permet une diminution de la taille des lésions, et une régression de l'athérosclérose (Llodra et al., 2004) (Feig et al., 2009). De manière contradictoire, dans un modèle murin de régression d'athérosclérose, il a été démontré que la diminution du nombre de macrophages était due à une baisse de l'entrée des monocytes et non à leur sortie de la plaque. Ainsi, la diminution du nombre de macrophages au sein de la plaque serait due à une apoptose accrue (Potteaux et al., 2011). Plus récemment, dans un modèle de régression utilisant la transplantation de segments aortiques athérosclérotiques dans des souris saines, il a été démontré que le recrutement des monocytes Ly6C^{hi} inflammatoires est nécessaire à la résolution de l'inflammation locale dans les plaques et à la régression des lésions d'athérosclérose (Rahman et al., 2017). Ce mécanisme est dépendant de la différenciation des monocytes Ly6C^{hi} inflammatoires en macrophages anti-inflammatoires de type M2, *via* la voie de signalisation STAT6.

Il a été démontré par l'étude de marqueurs de prolifération au sein de la plaque que les macrophages étaient capables d'y proliférer (Zhu et al., 2009). En effet, dans des modèles murins, il a été démontré que dans des lésions précoces, les monocytes sont recrutés et se différencient en macrophages. En revanche, dans des lésions avancées, la prolifération des macrophages est prédominante. Les auteurs démontrent aussi que 92% des macrophages de la plaque prolifèrent. De plus, la délétion des monocytes circulants n'altère pas la prolifération des macrophages dans les lésions avancées. Ce résultat suggère

que le recrutement des monocytes dans les plaques n'est pas essentiel à la constitution d'une réserve de macrophages prolifératifs. En revanche, ils confirment que les monocytes recrutés dans la plaque sont la source des macrophages, eux-mêmes capables de proliférer. Plus précisément, cette étude souligne aussi le rôle du récepteur SR-A1 (Macrophage Scavenger Receptor 1) dans la prolifération des macrophages intra-plaques. En effet, les macrophages issus d'une moelle osseuse déficiente pour le récepteur SR-A1 prolifèrent moins que ceux issus d'une moelle osseuse exprimant le récepteur SR-A1 (Robbins et al., 2013). L'ensemble de ces résultats suggère que la prolifération des macrophages au sein des plaques d'athérosclérose peut être un mécanisme important dans la progression de la pathologie, même si des précisions doivent être apportées. Ce mécanisme semble être particulièrement important dans la régulation de l'inflammation chronique présente dans les lésions athérosclérotiques tardives.

L'émigration des macrophages de la plaque a été prouvée dans des plaques précoces. De plus, il a été démontré que le niveau de sortie des macrophages de la plaque se réduit au cours de la progression de la pathologie. Les macrophages de la plaque sont soumis à la fois à des stimuli de rétention et d'émigration, et l'équilibre entre ces stimuli impactent le nombre de macrophages présents au sein de la plaque. Les signaux qui permettent la sortie des macrophages de la plaque, que ce soit par transmigration de l'endothélium ou par migration à travers la média afin de rejoindre la circulation lymphatique, sont peu définis. La quantité de cholestérol intracellulaire a été démontrée pour augmenter l'expression de la nétrine 1 et de la sémaphorine E3, protéines impliquées dans le chimiotactisme des macrophages et la rétention des macrophages *in vitro* (van Gils et al., 2013) (Wanschel et al., 2013). *In vivo*, en utilisant un modèle murin d'athérosclérose ($LDLr^{-/-}$), la déficience en nétrine 1 induit une réduction de la progression des plaques d'athérosclérose, et une augmentation de l'émigration des macrophages en dehors de la plaque, suggérant ainsi un rôle de la nétrine 1 dans la séquestration des macrophages dans la plaque (van Gils et al., 2013). De plus, il a été démontré chez la souris dans un modèle de régression, que les cellules qui sortaient de la plaque présentaient un profil proche des macrophages et/ou des cellules dendritiques (Trogan et al., 2002). Par exemple, les macrophages qui sortent de la plaque expriment fortement le CCR7, connu pour être le récepteur des chimiokines CCL19 et CCL21, impliquées dans le recrutement des cellules dendritiques dans les ganglions. Ces résultats suggèrent que l'expression de CCR7 est un facteur impliqué dans la sortie des macrophages de la plaque. Plus récemment, il a été démontré que l'expression du CCR7 était elle-même régulée par l'expression des LXRs (Feig et al., 2010). Cependant, ces résultats restent controversés.

Le rôle de l'apoptose des cellules myéloïdes dans la physiopathologie de la plaque d'athérosclérose sera détaillé ultérieurement.

c- Le rôle des macrophages dans la plaque d'athérosclérose et leurs différentes polarisations.

Même si de nombreux types de cellules immunitaires sont impliqués dans le développement et la progression des plaques d'athérosclérose, les macrophages jouent un rôle prédominant. Le phénotype et la plasticité des macrophages sont des domaines largement étudiés. Dans les lésions d'athérosclérose, les macrophages sont soumis à de nombreux signaux, comme la production accrue de cytokines ou la présence de lipides oxydés. Ces signaux modifient la polarisation et le phénotype des macrophages de la plaque. Brièvement, les macrophages peuvent adopter un spectre de phénotypes extrêmement différents (Mosser and Edwards, 2008). Aux extrêmes du spectre, il y a les macrophages dits macrophages M1 et macrophages M2. Le phénotype M1 est induit par la production de cytokines par les lymphocytes T-helper (LT) de type 1, et au contraire, le phénotype M2 est induit par les LT de type 2. Les macrophages M2 se classifient en sous-populations. Plus spécifiquement, dans la plaque d'athérosclérose, les macrophages peuvent aussi adopter des phénotypes dits Mox, Mhem, MHb et M4. C'est ce à quoi nous allons nous intéresser maintenant. Même si cette nomenclature permet une visualisation simple des phénotypes des macrophages, elle est à prendre avec précaution (Nahrendorf and Swirski, 2016) (**Figure 9**).

c-1- Les macrophages M1, classiquement activés.

Les macrophages M1 sont issus de la stimulation de macrophages non polarisés (M0) par la production de cytokines, tels que l'INFγ ou le TNF, produites par les LT de type 1 (Colin et al., 2014). La polarisation en M1 peut aussi être faite par la production de LPS, notamment lors d'une infection bactérienne (Westerterp et al., 2007) ou lors de la perte de la perméabilité intestinale (König et al., 2016). La polarisation M1 des macrophages contribue à l'augmentation de la réponse inflammatoire, notamment, via la sécrétion de cytokines comme IL-6, l'IL-1β, le TNF, l'IL-12 et l'IL-23 (Mosser, 2003) (Verreck et al., 2004) (**Figure 9**). Les macrophages M1 sont aussi impliqués dans la production de ROS, initialement prévus pour détruire les pathogènes mais qui participent aussi au processus d'oxydation et d'inflammation au sein de la plaque. Dans le cadre d'une inflammation stérile, comme c'est le cas dans l'athérosclérose, l'activation des macrophages M1 est délétère, notamment à cause de leur participation à une inflammation chronique.

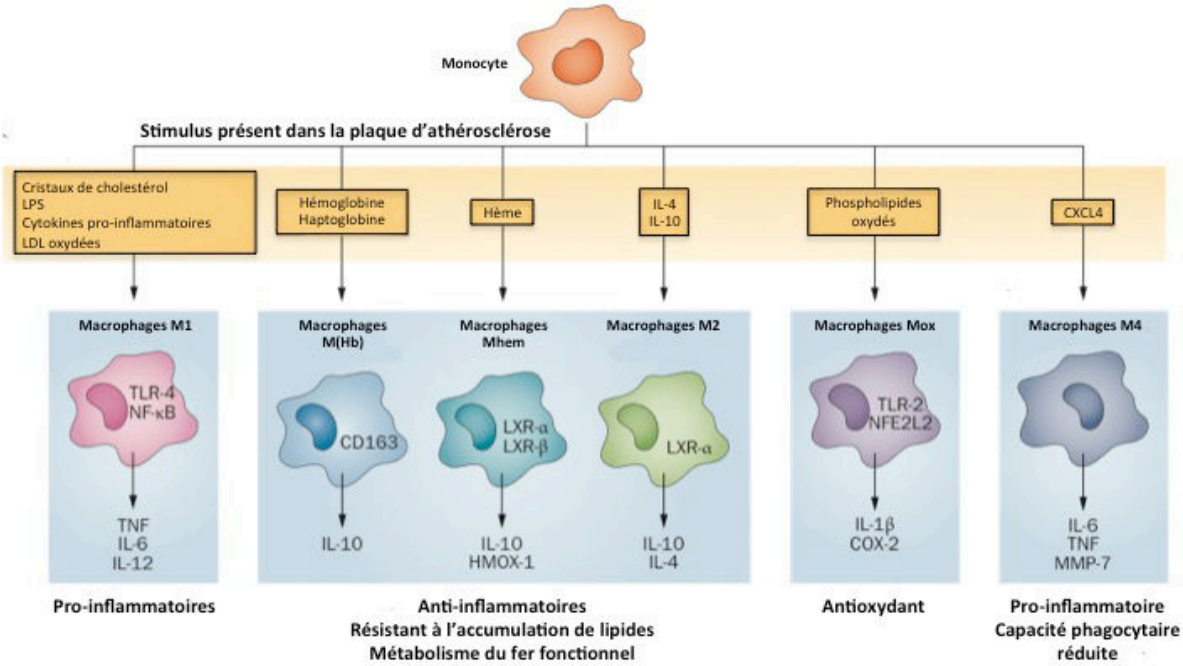


Figure 9: **Tableau récapitulatif des polarisations possibles des macrophages au sein des lésions d'athérosclérose.** Les macrophages se polarisent dans la plaque en fonction des stimuli auxquels ils sont soumis. Leurs fonctions se retrouvent ainsi modifiées et leurs propriétés varient en conséquence.

Adapté de Chinetti-Gbaguidi G. et al., Nat Rev Cardiol, 2015

c-2- Les macrophages M2, alternativement activés.

A l'inverse, l'autre extrémité du spectre de polarisation des macrophages, les macrophages M2 sont considérés comme des macrophages anti-inflammatoires. En effet, ils produisent de l'IL-10 et peu l'IL-12. Les macrophages M2 sont issus de la stimulation par les LT de type 2, notamment via la sécrétion d'IL-4 et IL-13 (Stein et al., 1992) (Gordon, 2003). *In vitro*, plusieurs études ont permis de démontrer qu'il y avait des sous-groupes de macrophages M2 : les M2a, M2b, M2C et M2d. En revanche, la pertinence *in vivo* des ces populations reste à être déterminée (**Figure 9**).

Les macrophages M2a répondent à la stimulation de l'IL-4 et de l'IL-13, expriment le récepteur au mannose (CD206) et sécrètent des facteurs impliqués dans la réparation tissulaire comme le TGFβ (Transforming Growth Factor β) ou l'IGF (Insulin-like Growth Factor) (Mosser and Edwards, 2008). Ces macrophages sont parfois appelés les « macrophages de la cicatrisation » (ou wound healing macrophages) au vue de leurs propriétés. Les macrophages M2b sont induits par la stimulation par des complexes immuns, notamment via l'activation des TLR ou l'IL-1β (Mosser and Edwards, 2008). Les macrophages M2c sont induits par la présence d'IL-10 et des glucocorticoïdes. Ces deux sous-classes de macrophages M2 sont considérées comme des macrophages de la régulation. En effet, ils expriment fortement le récepteur MerTK, récepteur impliqué dans la reconnaissance des cellules apoptotiques, ce qui leur confère une capacité d'efferocytose (Zizzo et al., 2012) (Zizzo and Cohen, 2013). Cependant le phénotype des macrophages M2b et M2c semble plus complexe. En effet, les macrophages M2b sont aussi capables de produire des cytokines pro-inflammatoires. Enfin, la sous-classe de macrophages M2d est induite par une co-stimulation par des agonistes des TLR et des récepteurs à l'adénosine de type A2. Ils produisent alors de l'IL-10 et du VEGF et expriment aussi fortement le CD36.

La classification *in vitro* qui vient d'être décrite semble être transférable *in vivo* au niveau de la plaque d'athérosclérose (Bouhlel et al., 2007). Les macrophages M1 et M2 y sont présents, et représentent respectivement 40% et 20% des macrophages présents dans ces lésions (Roma-Lavisse et al., 2015). Il est important de souligner que de nombreux types de macrophages ayant des phénotypes très différents coexistent au sein des plaques d'athérosclérose. Au sein des plaques d'athérosclérose, les macrophages sont soumis à divers stimuli, notamment à la présence de lipides et de lipides oxydés. Nous allons détailler le rôle du métabolisme des lipides et en particulier du cholestérol dans les parties suivantes. Cependant, avant d'aborder ce point, nous allons nous intéresser brièvement à la réponse des macrophages lors d'une hémorragie ou lorsqu'ils sont stimulés par des cytokines.

c-3- Les macrophages en condition hémorragique : M(Hb) et M(Heme)

Dans les plaques d'athérosclérose humaines, il est fréquent d'observer une hémorragie intra-plaque. Dans ces zones particulières, les macrophages se retrouvent au contact d'une quantité importante de sang. Ainsi ils se polarisent en macrophage M(Hb) ou macrophage stimulés par l'hémoglobine (Hb) (Finn et al., 2012) (Bories et al., 2013). Ces macrophages se caractérisent par une expression importante du CD36 et du CD163. Le CD163 est un récepteur « scavenger » qui reconnaît l'hémoglobine et l'haptoglobine, ainsi il est impliqué dans la clairance de l'hémoglobine lors d'une hémorragie de la plaque (Nielsen et al., 2010). La liaison de l'hémoglobine sur ces récepteurs induit la voie de signalisation PI3K/phospho-Akt aboutissant à la production d'IL-10 (Philippidis et al., 2004) (Landis et al., 2013). De manière intéressante, les macrophages M(Hb) présentent une augmentation de leur capacité d'efflux de cholestérol via une augmentation de l'activité des LXR, ce qui participe à la prévention de la formation de macrophages spumeux (Boyle et al., 2012). L'activité accrue du LXR permet aussi une augmentation de l'expression d'un transporteur permettant la sortie du fer de la cellule, la ferroportine. Cela limite ainsi l'accumulation de fer dans les macrophages et permet de limiter la production de ROS . Après la dégradation de l'hémoglobine par les macrophages, les macrophages sont stimulés par la présence d'hème. Ils se polarisent alors en macrophages M(Heme), ce qui active l'expression d'ATF-1 (Activating Transcription Factor-1), du LXR et de HMOX1 (heme oxygenase 1) (Wan et al., 2013) (Boyle et al., 2011) (**Figure 9**). Ces macrophages ont aussi une capacité plus importante à phagocyter les érythrocytes en apoptose, ce qui participe au maintien de l'homéostasie au sein de la plaque (Bories et al., 2013).

c-4- Les macrophages en réponse au facteur PF4 : M4

Contrairement aux macrophages M1 et M2 dont la polarisation est réversible, certains sous-types de macrophages ne semblent pas capables de modifier leur phénotype. En effet, au sein de la plaque d'athérosclérose, les macrophages sont polarisés en macrophages M4 suite à une stimulation par le facteur PF4 (Platelet Factor 4) ou CXCL4 (Gleissner et al., 2010a) (**Figure 9**). Ce facteur est produit par les plaquettes sanguines, mais aussi les cellules endothéliales, les monocytes et les macrophages eux-même (Gleissner et al., 2008). Ces macrophages M4 expriment la métalloprotéinase 7 (MMP7) et une protéine de liaison au calcium appelée S100A8 (Erbel et al., 2015). Ces macrophages perdent aussi l'expression du CD163, ce qui ne permet pas une expression de HMOX1 (Gleissner et al., 2010b) Ainsi, ces macrophages semblent délétères au sein de la plaque d'athérosclérose (Colin et al., 2014).

c-5- Les macrophages en réponse aux lipides oxydés : Mox

Les macrophages exposés aux lipides oxydés vont alors acquérir un phénotype Mox. Ce phénotype est notamment caractérisé par l'expression du facteur de transcription NFE2L2 (Kadl et al., 2010) (**Figure 9**). En comparaison avec les macrophages M1 ou M2, les macrophages Mox présentent une capacité de phagocytose et de chimiotactisme réduite. Chez la souris, il a été démontré que ces macrophages exprimaient des gènes impliqués dans la régulation du système REDOX, tels que *Hmox1*, *Srxn1*, *Txnrd1* et *Gsr* (Kadl et al., 2010). En parallèle, et en présence de lipides oxydés, les macrophages Mox sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires comme IL-1β ou la cyclooxygénase 2, de manière dépendante de l'activation de la voie TLR2 (Kadl et al., 2011). Dans des modèles murins présentant des plaques d'athérosclérose avancées, il semble que les Mox représentent jusqu'à 30% des macrophages présents dans la plaque (Kadl et al., 2010). Cependant, la relevance humaine de cette sous-classe de macrophages reste à être déterminée.

Pour conclure cette partie, les macrophages présents dans les lésions d'athérosclérose sont soumis à divers stimuli qui modulent leur polarisation et leur fonction au sein de la plaque. L'importance de ces différents signaux varie au cours de l'évolution de la pathologie soulignant le fait que la polarisation des macrophages est globalement un processus dynamique qui varie au cours du temps (Gosselin et al., 2014) (Lavin et al., 2014). Nous allons maintenant nous intéresser à un facteur majeur au sein de la plaque d'athérosclérose : les lipides et leur dérivés, et en particulier, le cholestérol.

d- Le rôle de l'immuno-métabolisme des cellules myéloïdes au sein de la plaque d'athérosclérose

Une fois recrutés dans la plaque, les monocytes vont se différencier en macrophages au sein de la plaque d'athérosclérose. Dans cet environnement, les macrophages phagocytent des lipides, souvent contenus dans des lipoprotéines. Ils se retrouvent alors face à une quantité de matériel lipidique qu'ils doivent métaboliser. Dans le contexte de l'athérosclérose, la machinerie de métabolisation et d'élimination contenue dans les macrophages s'enlise et les cellules accumulent une quantité importante de lipides. Cela aboutit à la formation de macrophages spumeux. Les macrophages spumeux sont caractérisés par une charge en lipides importante qui se localisent dans des gouttelettes lipidiques intracellulaires. Cela est dépendant de plusieurs étapes que nous allons décrire dans cette partie : la capture des lipoprotéines, l'altération du métabolisme intracellulaire du cholestérol et le rôle de l'efflux de cholestérol. Notamment, les plaques d'athérosclérose sont

visualisables par PET-Scan, via l'utilisation du 18-fluoro-déoxyglucose, suggérant une altération du métabolisme glucidique. Ainsi, le métabolisme du cholestérol semble être un acteur central dans la re-programmation métabolique des cellules immunitaires au sein des lésions d'athérosclérose.

d-1- La capture des lipoprotéines par les macrophages

La capture des lipoprotéines par les macrophages est une des premières étapes dans les plaques naissantes et aboutit à la formation de macrophages spumeux. Les macrophages reconnaissent préférentiellement des lipoprotéines porteuses de l'apolipoprotéine B, comme les LDLs. Les macrophages expriment le LDL-R mais cette expression tend à être diminuée lors de la formation de la cellule spumeuse. Cela suggère que les lipoprotéines modifiées présentent au sein de la plaque sont reconnues par des mécanismes n'impliquant pas le LDL-R, mais aussi par l'intermédiaire d'autres récepteurs (**Figure 10**).

En effet, le stress oxydatif généré au sein de la plaque induit une modification des lipoprotéines présentes et notamment des LDL oxydées. Cela induit un « signal de dommage » qui va être reconnu par les PRRs (Pattern Recognition Receptors) présents à la surface des cellules du système immunitaire, dont les macrophages. Les récepteurs « scavengers » présents à la surface des macrophages jouent un grand rôle dans l'athérosclérose et sont initialement décrits pour reconnaître et prendre en charge les LDL modifiées (Moore and Freeman, 2006). Un grand nombre de ces récepteurs, tels que SRA, MARCO, CD36, SR-B1 ou LOX1, sont capables de reconnaître les lipoprotéines modifiées et participent à la formation des cellules spumeuses (Kzhyshkowska et al., 2012). Le récepteur SRA (Scavenger Receptor A) et le récepteur CD36 sont capables de dégrader de 75 à 90% des LDL modifiées *in vitro* (Kunjathoor et al., 2002). Cependant, *in vivo*, en utilisant des souris athérogéniques déficientes pour SRA et CD36, il a été observé une diminution partielle du nombre de cellules spumeuses. Cela souligne le fait que d'autres mécanismes indépendants de ces récepteurs peuvent être mis en jeu (Moore et al., 2005) (Kuchibhotla et al., 2008) (Manning-Tobin et al., 2009). Il est important de souligner que ces études montrent une réduction de l'inflammation, de l'apoptose des macrophages et de la nécrose au sein de la plaque suggérant d'autres rôles pour ces récepteurs que la capture des lipoprotéines.

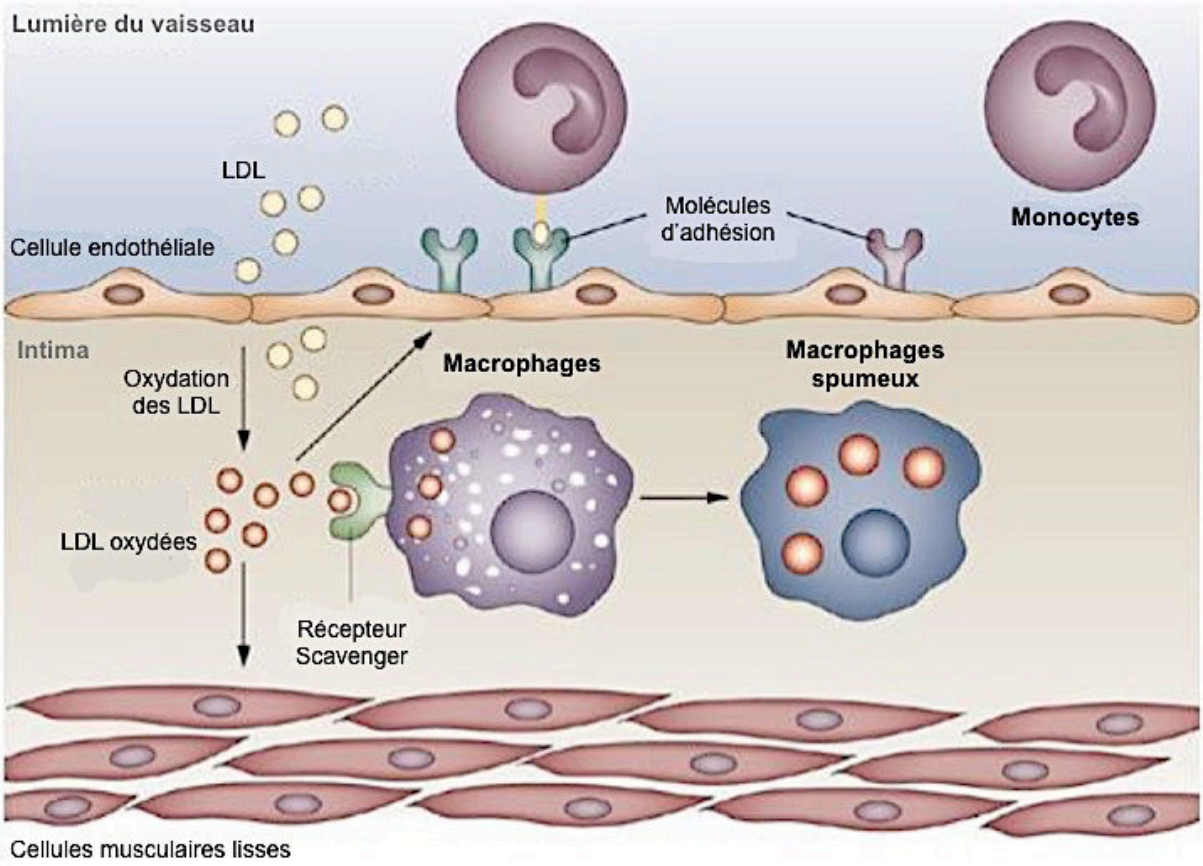


Figure 10: **Le rôle des LDL et des LDL oxydées dans la formation des cellules spumeuses et dans le développement de la plaque d'athérosclérose.** Les macrophages de la plaque d'athérosclérose vont reconnaître les LDL oxydées par l'intermédiaire des récepteurs scavengers, ils deviennent alors des macrophages spumeux.
Adapté de Rocha ZV. et Libby P., Nat Rev Cardiol, 2009

Les lipoprotéines peuvent aussi subir d'autres modifications que l'oxydation, elles peuvent notamment subir l'action de diverses lipases qui pourrait induire la capture de ces lipoprotéines par d'autres récepteurs (Boyanovsky et al., 2005). Dans des modèles murins, il a été mis en évidence les PLA2 (Phospholipase A2) sécrétées permettraient une accélération du développement des plaques d'athérosclérose (Öörni and Kovanen, 2009). De plus, il a été démontré que les LDLs pouvaient être captées par pinocytose et que cela induisait la formation de cellules spumeuses (Kruth, 2011). Ce processus n'est pas dépendant de récepteurs et envoie directement le cholestérol capté dans le compartiment endosomal, ce qui favorise la formation des esters de cholestérol et donc la formation de cellules spumeuses.

d-1-A- La capture des LDL via le SR-A1

Le récepteur SR-A1 est majoritairement impliqué dans la reconnaissance des LDL oxydées. Il existe trois isoformes, mais seuls deux sont fonctionnels. Brièvement, ce récepteur est composé de trois domaines principaux : un domaine extracellulaire, un domaine intracellulaire et un segment transmembranaire. Le domaine extracellulaire est composé d'une structure en « super-hélice », d'un domaine type collagène et d'une région riche en cystéines (Ben et al., 2015). Dans des modèles murins d'athérosclérose, la déficience en SR-A1 réduit le développement des plaques d'athérosclérose en inhibant la formation de macrophages spumeux (Mäkinen et al., 2010) (Dai et al., 2012). L'expression de SR-A1 est régulée par la voie de signalisation NF-κB, qui est elle-même stimulée par des cytokines pro-inflammatoires (Hashizume and Mihara, 2012). L'expression du récepteur SR-A1 est aussi positivement régulée par le canal K^+ voltage-dépendant Kv1.3 (Yang et al., 2013). Cela suggère un rôle important du SR-A1 dans des conditions inflammatoires ainsi que par le flux de potassium.

d-1-B- La capture des LDL via le CD36

CD36 fait partie de la famille des « clusters » de différenciation (CD). C'est une glycoprotéine de 88kDa qui fait partie de la famille des SR (Scavenger Receptor) B (comme SR-B1). Le gène humain est porté par le chromosome 7 (7q11.2). Ce récepteur est composé de deux domaines extracellulaire et de deux domaines transmembranaires. CD36 lient les LDL oxydées avec une grande affinité. En effet, il a été démontré que ce récepteur possédait deux domaines de liaisons de fortes affinités pour les LDL oxydées (des acides aminés 127 à 279 et des acides aminés 28 à 93) (Tarhda and Ibrahimi, 2015). Les LDL oxydées sont alors internalisées de manière dépendante des rafts lipidiques. Ce récepteur est aussi capable de lier des cellules apoptotiques, du collagène et de la thrombospondine. CD36 est exprimé par de nombreux types cellulaires comme les adipocytes, les cellules musculaires, les cellules cardiaques, les cellules endothéliales, les cellules dendritiques, et bien sur les monocytes et les macrophages (Choromańska et al., 2017). CD36 est majoritairement régulé par PPARγ (Han et al., 1999) (Han and Sidell, 2002), LXR (Silverstein and Febbraio, 2009), PXR (Sui et al., 2011) et le TR4 (Xie et al., 2009). L'expression de CD36 est aussi augmentée en conditions inflammatoires, notamment par IL-1β, IL-4, IL-18. Au contraire, le TGFβ- et l'INF-γ sont capables de diminuer l'expression du CD36. De plus, le CD36 est capable de se dimériser avec les TLR, notamment le TLR 2, 4 et 6. Cela intervient notamment dans la régulation de l'inflammation (Stewart et al., 2010) (Ip et al., 2008).

d-1-C- La capture des LDL via le récepteur LOX-1

Structurellement, le récepteur LOX-1 possède un court domaine N-terminal, un domaine transmembranaire, un domaine extracellulaire, composé d'une super-hélice et d'un domaine « lectine-like » de type C (Ogura et al., 2009). Le domaine « lectine-like » de type C permet la reconnaissance des LDL oxydées (Chen et al., 2001a). Le récepteur LOX-1 semble être strictement pro-athérogénique. En effet, son expression est très modérée dans des conditions physiologiques mais elle est augmentée de manière importante dans des conditions athérogéniques. De manière intéressante, ce récepteur n'est pas exprimé par les monocytes mais est largement exprimé par les macrophages (Kume and Kita, 2001). Dans les cellules endothéliales, LOX-1 est le récepteur majoritairement et peu aussi être exprimé dans les cellules musculaires lisses (Kume et al., 2000). Il est important de souligner que ce récepteur reconnaît préférentiellement les LDL peu oxydées, ce qui suggère un rôle de ce récepteur préférentiellement durant les phases précoces de l'athérosclérose Dans des modèles murins d'athérosclérose, la délétion du récepteur LOX-1 permet une diminution de la pathologie, avec une progression plus lente et une réduction de l'inflammation associée (Kataoka et al., 1999). Au contraire, une sur-expression de LOX-1 provoque une augmentation de l'apoptose des cellules vasculaires, corrélée à une instabilité de plaque accrue et un processus d'athérothrombose (Inoue et al., 2005) (Ishino et al., 2007).

d-1-D- La capture des LDL via le récepteur MARCO

Enfin, le récepteur MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) est aussi impliqué par la capture des LDL. Comme le récepteur SR-A1, MARCO présente un domaine extracellulaire « collagen like » qui lui permet de reconnaître les LDL. Il est exprimé par les macrophages et les cellules endothéliales (Ohtani et al., 2001). Cependant, des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux caractériser le rôle de MARCO dans la capture du cholestérol et des lipides.

En conclusion, la capture des lipoprotéines par les macrophages au sein de la plaque d'athérosclérose passe par différentes voies qui contribuent de manière synergique à la formation de cellules spumeuses.

d-2- Le défaut du métabolisme intracellulaire du cholestérol.

Dans une cellule spumeuse, le métabolisme du cholestérol est vite saturé en raison de la quantité de cholestérol présente dans la cellule. Lorsque le cholestérol est sous forme

d'esters de cholestérol alors il n'y a peu de conséquences toxiques pour la cellule. En revanche, une accumulation excessive de cholestérol libre peut devenir rapidement toxique pour la cellule. Dans des conditions physiologiques, une accumulation de cholestérol libre dans le réticulum endoplasmique induit une stimulation de l'estérification du cholestérol libre par l'ACAT1. Cependant, dans les macrophages lésionnels, il semblerait qu'un défaut d'estérification du cholestérol par l'ACAT1 ait lieu, favorisant alors l'accumulation de cholestérol libre. Dans ces conditions, il est suggéré que le flux de cholestérol libre soit trop important pour que l'ACAT1 puisse en estérifié la totalité. Il faut souligner que l'inhibition pharmacologique de l'ACAT induit une mort des macrophages par un stress du réticulum endoplasmique trop important (Tabas, 2002). Au niveau de la membrane plasmique, une accumulation de cholestérol libre augmente la signalisation depuis les rafts lipidiques, en particulier via les TLRs (Toll Like Receptors) et la voie NFκB, qui est pro-inflammatoire (Zhu et al., 2010) (Mogilenko et al., 2012) (Yvan-Charvet et al., 2008). De plus, la sortie du cholestérol libre des lysosomes est aussi réduite dans les macrophages spumeux, ce qui ralenti considérablement le flux de cholestérol et donc son métabolisme au sein du macrophage. Cela conduit à une augmentation de l'inflammation, notamment via la formation de cristaux de cholestérol qui activent le NLRP3 (Duewell et al., 2010) (Sheedy et al., 2013). Le NLRP3 est largement connu pour initier la voie de signalisation à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1β. Par ailleurs, il a été démontré qu'une dérégulation du métabolisme intracellulaire du cholestérol induit une augmentation du stress du réticulum endoplasmique ce qui amplifie la dysfonction générale de la cellule et peut conduire à la mort du macrophage (Feng et al., 2003). Tout récemment, il a été mis en évidence que les voies d'efflux du cholestérol étaient capables de réduire l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Westerterp et al., 2018). Les cellules apoptotiques présentent au sein de la plaque sont phagocytées par les macrophages présents autour, par un processus appelée efferocytose, sur lequel nous reviendrons plus tard.

d-3- Le défaut d'efflux du cholestérol des monocytes et des macrophages de la plaque

Les macrophages remplis de cholestérol et de lipides essayent d'éliminer cette accumulation en augmentant les voies d'efflux du cholestérol. L'efflux de cholestérol va se faire notamment via ABCA1, ABCG1 et SR-B1 ainsi que par diffusion passive (Yvan-Charvet et al., 2010a) (**Figure 11**). Les transporteurs ABCA1 et ABCG1 sont connus pour être les acteurs clés dans l'efflux de cholestérol. Le récepteur SR-BI est impliqué dans un échange bidirectionnel entre la membrane plasmique et les lipoprotéines acceptrices. Les gènes *abca1* et *abcg1* sont positivement régulés par les LXRs (Liver X Receptor), eux-mêmes

stimulés par les dérives du cholestérol comme certains oxystérols et le demostérol (Spann et al., 2012) (Calkin and Tontonoz, 2012). L'autophagie a un rôle critique dans l'efflux de cholestérol dans les macrophages spumeux. En effet, les gouttelettes lipidiques sont adressées aux lysosomes afin qu'elles soient dégradées (ce processus est aussi appelée lipophagie). Plus précisément, la fusion entre l'autophagosome et le lysosome permet la dégradation des esters de cholestérol et permet ainsi qu'augmenter la quantité de cholestérol libre dans la cellule afin qu'il soit exporté de manière dépendante d'ABCA1 (Ouimet et al., 2011). De manière intéressante, le rôle athéro-protecteur de l'autophagie a été démontré dans un modèle murin d'athérosclérose, dans lequel certains composants de la machinerie de l'autophagie avaient été invalidés (Liao et al., 2012) (Razani et al., 2012). L'autophagie intervient aussi dans la régulation de l'immunité innée et adpatative, et en particulier dans l'activation du NLRP3 (Out et al., 2008a).

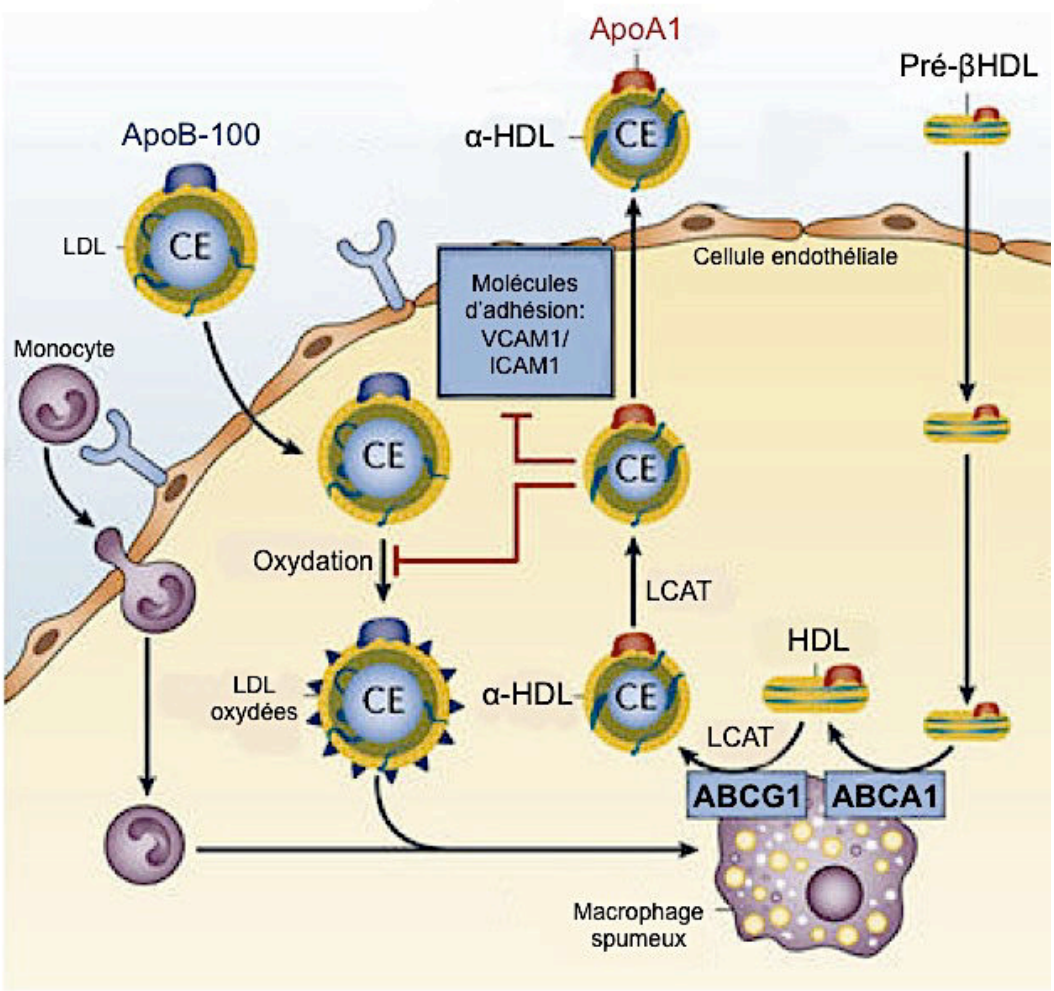


Figure 11: Le rôle bénéfique des HDL dans les lésions d'athérosclérose. Les pré-βHDL se lient sur le transporteur ABCA1 pour former des HDL. Ces particules vont se lier sur le transporteur ABCG1 pour former des α-HDL. La LCAT va permettre l'estérification du cholestérol libre de ces particules.
Adapté de Rosenson R.S. et al., Nature Rev Cardiol, 2015.

d-3-A- Le rôle du transporteur ABCA1 dans l'efflux actif de cholestérol

D'un point de vue fonctionnel, ABCA1 permet l'efflux du cholestérol et des phospholipides intracellulaires vers l'apoA1 libre ou les préβHDL, qui sont respectivement des structures non lipidées ou peu lipidées (Landry et al., 2006) (Wang et al., 2000) (Remaley et al., 2001) (Qian et al., 2017). ABCA1 permet le transfert du cholestérol en excès présent dans les tissus périphériques et notamment les macrophages spumeux. De manière plus précise, l'apoA1 contenue dans un complexe pauvre en cholestérol va se lier à ABCA1 au niveau du site de liaison à l'apoA1 de ce transporteur (**Figure 4**) (**Figure 11**). De plus, bien que le transporteur ABCA1 seul (monomère) soit capable de lier l'apoA1 et d'exporter le cholestérol, il peut aussi de dimériser ou oligomériser. En effet, il a été démontré que le récepteur ABCA1 s'oligomérisait en tétramère (Denis et al., 2004) (Trompier et al., 2006) ou se dimériser (Nagata et al., 2013). Il semble que cette dimérisation ou cette oligomérisation favorise la génération d'HDL à partir de l'apoA1.

La fixation de l'apoA1 sur ABCA1 se fait sur un domaine relativement bien défini (de l'acide aminé 1311 au 1450) (Kang et al., 2010), ce qui permet la fixation du cholestérol et des phospholipides sur l'apoA1. En effet, une fois l'apoA1 liée au transporteur ABCA1, l'activité ''floppase'' va permettre de transférer le cholestérol et les phospholipides depuis la membrane interne vers la surface cellulaire. Il semblerait que le récepteur ABCA1 soit capable de créer une incurvation de la membrane plasmique afin de rapprocher les hélices amphipatiques de l'apoA1 et la membrane plasmique afin de permettre la formation d'HDL naissants (Tall et al., 2008). L'efflux du cholestérol et les phospholipides via ABCA1 a lieu en même temps et le transporteur pourrait aussi transférer du cholestérol sur des particules d'HDL récemment formées. De plus, ABCA1 augmente le trafic vésiculaire intracellulaire du cholestérol, des phospholipides et d'ABCA1 lui-même entre les membranes intracellulaires et la membrane plasmique (Neufeld et al., 2001) (Landry et al., 2006). Il est également observé que la liaison de l'apoA1 sur ABCA1 permet une diminution de la dégradation de ce transporteur (Wang et al., 2003). Nait alors une population hétérogène de particules d'HDL contenant des concentrations variables en cholestérol. De manière intéressante, le traitement des cellules par des anticorps reconnaissant la poche de liaison à l'apoA1 permet aussi la stabilisation d'ABCA1 (Mukhamedova et al., 2007). La localisation membranaire d'ABCA1 est cruciale pour son rôle dans l'efflux de cholestérol. En effet, des mutations affectant la localisation membranaire du transporteur (R587W, G597R, ΔL693, M1091T) induisent une réduction drastique de l'efflux de cholestérol (Singaraja et al., 2006). De plus, de nombreuses études confirment le rôle de l'ABCA1 membranaire dans l'efflux de

cholestérol et de phospholipides (Vaughan and Oram, 2003) (Vedhachalam et al., 2007) (Nandi et al., 2009). ABCA1 semble aussi jouer un rôle dans la structuration de la membrane plasmique. En effet, s'il est sur-exprimé, la membrane plasmique acquiert une morphologie différente (Linder et al., 2009) (Vedhachalam et al., 2007), notamment du point de vue de sa composition lipidique en créant des radeaux lipidiques riches en cholestérol permettant une mobilisation rapide du cholestérol lors de l'efflux (Chambenoit et al., 2001) (Mendez et al., 2001) (Vaughan and Oram, 2003). Cependant, la répartition d'ABCA1 entre des domaines « rafts » ou de domaines « non-raft » de la membrane plasmique reste mal définie (Phillips, 2018). De manière intéressante, le mutant W590S du transporteur ABCA1 qui conserve sa capacité à lier l'apoA1 mais qui n'est plus en mesure de la lipider, montre que la fixation de l'apoA1 sur ABCA1 est nécessaire mais pas suffisante afin d'induire l'efflux de cholestérol (Fitzgerald, 2002).

De plus outre le mécanisme d'efflux via ABCA1 ayant lieu au niveau de la membrane plasmique, il est démontré qu'ABCA1 est capable d'exporter du cholestérol et des phospholipides à partir des endosomes (Takahashi and Smith, 1999) (Chen et al., 2001b) (Neufeld et al., 2001) (Denis et al., 2008). De plus, l'efflux des phospholipides par ABCA1 pourrait précéder l'efflux du cholestérol (Wang et al., 2001). Brièvement, l'apoA1 se lie à l'ABCA1 au niveau de la surface cellulaire, puis ce complexe ApoA1/ABCA1 est internalisé au niveau des endosomes. A ce niveau, l'apoA1 va se lier aux lipides et le complexe lipides/ApoA1/ABCA1 va être resécrété par exocytose. La séquence PEST (riche en proline, acide glutamique, serine, thréonine) est localisée de l'acide aminé 1283 au 1306 chez l'humain. Elle est la cible des protéases calpaïnes qui permettent la dégradation d'ABCA1 (Wang et al., 2003). En effet, la délétion de cette partie du transporteur induit une augmentation de la quantité d'ABCA1 à la membrane plasmique, corrélée à une diminution de la quantité d'ABCA1 endosomal, et donc de la quantité de cholestérol exporté à ce niveau (Chen et al., 2005). En dépit de ce défaut d'efflux de la fraction endosomale d'ABCA1, l'efflux cellulaire de cholestérol est augmenté. De plus, la liaison de l'apoA1 sur ABCA1 permet une stabilisation d'ABCA1 en inhibant sa dégradation (Wang et al., 2003) (Chen et al., 2005). Après internalisation, l'apoA1 joue aussi un rôle stabilisateur d'ABCA1 (Lu et al., 2008). En effet, sa liaison sur le transporteur permet la déphosphorylation des thréonines T1286 et T1305 de la séquence PEST qui sont constitutivement phosphorylées. Cela induit une inhibition de l'action des calpaïnes et donc de la dégradation d'ABCA1 (Martinez et al., 2003). Cependant, la majeure partie de l'apoA1 resécrétée (après un cycle d'endocytose/exocytose) est dégradée (Faulkner et al., 2008). Ce pourcentage d'efflux est évidemment dépendant du type cellulaire et des conditions dans lesquelles il est mesuré. Notamment, il a été mis en évidence que l'efflux de cholestérol depuis les endosomes est

crucial lorsque les cellules sont chargées en cholestérol (Azuma et al., 2009). Par ailleurs, après la formation du complexe ApoA1/ABCA1, la protéine Jak2 va s'autophosphoryler et permettre de stimuler l'efflux de cholestérol mais aussi d'activer la signalisation via STAT3, bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas connus (Tang et al., 2004).

Le domaine PDZ, constitué par les 3 derniers acides aminés en C-terminal est un domaine d'interaction avec les protéines a1-syntrophine et b1-syntrophine alors qu'ABCA1 est localisé à la membrane plasmique. L'interaction avec ces protéines intervient aussi dans la stabilisation du transporteur (Munehira et al., 2004) (Okuhira et al., 2005). Leur rôle reste mal défini car l'interaction avec ces protéines pourrait aussi intervenir dans le recyclage et la signalisation intracellulaire du transporteur.

Chez l'Homme, le gène *abca1* est localisé sur le chromosome 9q31, il est composé de 50 exons pour une taille d'environ 150pb. La protéine ABCA1 est composée de 2261 acides aminés, et pèse 254kDa (Santamarina-Fojo et al., 2000). Le promoteur du gène *abca1* contient une boîte TATA, qui est essentielle à l'activité du promoteur dans les macrophages (Langmann et al., 2002). De plus, il semble que d'autres promoteurs (dit alternatifs) soient capables d'induire la transcription du gène de manière spécifiques dans certains tissus (Huuskonen et al., 2003) (Singaraja et al., 2005). L'ARNm et la protéine ABCA1 sont instables. En effet, leur demi-vie est estimée entre 1 et 2 heures dans des macrophages murins (Wang and Oram, 2002). Il est important de noter que le niveau d'ARNm ne corrèle pas à la quantité protéique. Cela suggère que des mécanismes post-traductionnels sont importants dans la régulation de l'expression et de la fonction d'ABCA1 (Wellington et al., 2002).

Comme cela vient d'être décrit, la liaison de l'apoA1 sur le transporteur ABCA1 permet la production d'HDL qui vont alors interagir avec le transporteur ABCG1 et SR-BI.

d-3-B- Le rôle du transporteur ABCG1 dans l'efflux actif de cholestérol

Le transporteur ABCG1 est impliqué dans l'efflux de cholestérol vers des particules HDL matures, soit déjà porteuses de phospholipides et de cholestérol (Wang et al., 2004) (Gelissen et al., 2006). Il est important que souligner que le transporteur ABCA1 génère des HDL matures qui peuvent servir de substrat pour le transporteur ABCG1, cela sous-entend que les transporteurs ABCA1 et ABCG1 agissent séquentiellement dans l'efflux de cholestérol (Gelissen et al., 2006) (Vaughan and Oram, 2003) (**Figure 5**) (**Figure 11**). Cependant, il semble d'ABCG1 puisse exporter du cholestérol de manière indépendante de sa liaison avec une lipoprotéine extracellulaire (Tarling and Edwards, 2011). L'expression d'ABCG1 accroit la quantité de cholestérol libre au sein de la membrane plasmique et facilite

ainsi son efflux vers des particules comme les HDL, de manière indépendante de la liaison des HDL sur le transporteur ABCG1.

Le rôle majeur d'ABCG1 dans les macrophages est l'efflux de cholestérol. En effet, des macrophages déficients pour ABCG1 présentent une réduction de l'efflux de cholestérol. Cependant, *in vivo*, une déficience en ABCG1 ne provoque pas de modification du profil lipidique plasmatique, et en particulier de la concentration en HDL en conditions physiologiques (Kennedy et al., 2005) (Out et al., 2007) (Burgess et al., 2008). En revanche, lors d'un régime riche en graisses ou après traitement par un agoniste des LXRs (T0901317), les souris déficientes pour ABCG1 présentent une perte de l'augmentation de la production d'HDL en comparaison avec des souris contrôles (Wiersma et al., 2009). De manière intéressante, ABCG1 est aussi capable d'exporter des dérives du cholestérol, tels que les oxystérols. Cette fonction semble être délétère car cela réduit l'apoptose des macrophages dans les lésions d'athérosclérose (Hardy et al., 2017). Le rôle d'ABCG1 semble donc être dépendant du « statut lipidique » de la cellule. Cela est conforté par deux études réalisées chez des modèles murins d'athérosclérose (souris LDLr$^{-/-}$ ou ApoE$^{-/-}$). En effet, dans ces modèles, la délétion (Baldán et al., 2006) ou la surexpression (Burgess et al., 2008) d'ABCG1 dans les cellules myéloïdes n'a pas d'effet drastique sur la taille des plaques d'athérosclérose. De plus, des souris LDLr$^{-/-}$ transplantées avec de la moelle osseuse déficiente pour ABCG1 accumulent des cellules spumeuses dans le péritoine mais ne présentent pas de modification de la taille de leurs lésions d'athérosclérose (Yvan-Charvet et al., 2007a). En effet, ces travaux démontrent que la délétion d'ABCG1 permet l'augmentation de l'expression d'ABCA1. Malgré ces résultats contradictoires, il semble d'ABCG1 soit protecteur dans les phases précoces et tardives de l'athérosclérose. En effet, le groupe de Meurs I. montre que l'impact d'ABCG1 sur la maladie dépend de son stade d'évolution (Meurs et al., 2012).

D'autre part, la double délétion d'ABCA1 et ABCG1 entraîne une hypercholestérolémie importante, avec une accumulation de macrophages spumeux dans les tissus et une diminution importante du RCT (Out et al., 2008a). Si cette délétion a lieu spécifiquement dans les cellules myéloïdes dans un modèle murin d'athérosclérose (souris LDLr$^{-/-}$), une forte réponse inflammatoire corrélée à une accumulation de lipides intracellulaires dans les macrophages est observée (Westerterp et al., 2013), conduisant à une accélération du développement des lésions athéromateuses (Yvan-Charvet et al., 2007a). Cependant, une étude utilisant le même modèle démontre que ces résultats sont similaires à ceux obtenus après transplantation de moelles osseuses déficientes pour ABCA1 seulement (Out et al., 2008b). Cela renforce l'idée qu'ABCA1 et ABCG1 agissent

séquentiellement lors de l'efflux de cholestérol comme suggéré plus haut. ABCG1 semble aussi jouer un rôle dans le transport intracellulaire des lipides (Tarling and Edwards, 2011).

Chez l'Humain, le rôle d'ABCG1 dans le développement des maladies cardiovasculaires est aussi très controversé. En effet, une étude du polymorphisme du gène ABCG1 chez des patients atteints de maladies cardio-vasculaires n'a pas permis de mettre en évidence de corrélation entre l'expression d'ABCG1 et la pathologie (Furuyama et al., 2009). Une autre étude montre qu'au contraire, des patients présentant une altération de l'expression d'ABCG1 ont un risque moindre de développer des maladies cardio-vasculaires (Xu et al., 2011). Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de conclure sur le rôle d'ABCG1 dans la pathologie athéromateuse humaine.

d-3-C- Le rôle du transporteur SR-BI dans l'efflux actif de cholestérol

Lors de la liaison d'une particule d'HDL, le récepteur SR-B1 va transduire un signal par l'intermédiaire de la protéine PDZK1 (PDZ Domain Containing 1) qui est liée au domaine EAKL du récepteur. Cela va engendrer l'activation de la cascade de signalisation PKC/MAPK. Il est important de souligner que SR-B1 est capable de diminuer l'efflux de cholestérol via les transporteurs ABCA1 et ABCG1 (Chen et al., 2001b) (Yvan-Charvet et al., 2007b). En plus de son rôle dans le RCT, SR-B1 est impliqué dans la régulation de l'inflammation, il est montré que ce récepteur joue un rôle anti-inflammatoire. En effet, via sa capacité à générer des HDL, il est impliqué dans la liaison du LPS, qui devient alors inactif. Dans le macrophage, cela entraine une diminution de l'activation de la voie NF-kB, activée via la liaison du LPS sur le TLR4 (Cai et al., 2012). Chez l'humain, le rôle de SR-B1 dans la régulation de l'efflux de cholestérol et du RCT est moins décrit. Cependant, il a été démontré que des patients porteurs d'une mutation perte de fonction de SR-B1 présentaient une augmentation du taux d'HDL plasmatiques corrélée à une diminution de la capacité d'efflux de cholestérol (Vergeer et al., 2011).

Le rôle de SR-B1 dans le RCT et l'efflux de cholestérol, notamment depuis les macrophages, reste discuté (Adorni et al., 2007) (Rader et al., 2009). En effet, ce récepteur est à l'origine de mouvements bidirectionnels, et donc de l'efflux de cholestérol libre entre les cellules et les HDL (ou autres accepteurs).

e- Le rôle du métabolisme du glucose et des lipides dans la polarisation des monocytes et des macrophages

Les cellules myéloïdes que sont les monocytes et les macrophages sont des acteurs majeurs dans la régulation de l'inflammation chronique, comme cela peut-être le cas dans l'athérosclérose. Le métabolisme des cellules myéloïdes apparaît comme déterminant dans la régulation de cette inflammation et de leurs réponses. Ce champ d'investigation s'appelle l'immuno-métabolisme et s'applique à de nombreuses pathologies (O'Neill et al., 2016) (Stienstra et al., 2017) (Van den Bossche et al., 2017). Ici, nous allons nous concentrer sur le rôle de l'immuno-métabolisme dans la pathologie athéromateuse.

e-1- Le rôle du métabolisme du glucose

Les monocytes stimulés par des stimuli pro-inflammatoires, tels que la présence de LPS ou de LDL oxydées ont un métabolisme glycolytique. En effet, en conditions inflammatoires, la voie NF-κB est activée et va contrôler l'expression du facteur HIF-1α. Cela va permettre une augmentation de l'expression du transporteur au glucose GLUT-1, ce qui induit une augmentation de l'entrée du glucose dans la cellule pour survenir aux besoins énergétiques de la cellule. De plus, le facteur HIF-1α est finement régulé par l'hypoxie, or dans les plaques d'athérosclérose, il existe des zones hypoxiques. Dans ce contexte, la présence d'HIF-1α stabilisé induit une augmentation de l'expression de GLUT-1, de l'héxokinase 2 (HK2) et d'autres enzymes impliquées dans la voie de la glycolyse (Tawakol et al., 2015).

De manière intéressante, la délétion du facteur HIF-1α dans les cellules myéloïdes dans un modèle murin d'athérosclérose induit une diminution du développement des plaques d'athérosclérose (Aarup et al., 2016). De plus, l'expression de GLUT-1 est diminuée dans les cellules myéloïdes déficientes pour HIF-1α. Il faut aussi noter que le facteur HIF-1α est impliqué dans l'infiltration des macrophages au sein des tissus. En effet, il a été démontré que HIF-1α induit l'expression de la PDK1 (Pyruvate Déshydrogénase Kinase Isozyme 1), enzyme qui catalyse la conversion du pyruvate en lactacte. L'expression de cette enzyme semble jouer un rôle clé dans l'initiation de l'infiltration des macrophages dans les tissus (Semba et al., 2016).

Récemment, grâce à l'étude de monocytes circulants de patients atteints d'athérosclérose, il a été démontré que ces cellules présentaient une augmentation de l'expression des enzymes clés de la glycolyse et une capacité augmentée à produire des cytokines (Bekkering et al., 2016) (Shirai et al., 2016). Ce phénotype pro-inflammatoire des monocytes est retrouvé *in vitro* avec une augmentation de la production d'IL-1β et d'IL-6 via

l'activation de la pyruvate kinase 2 (PKM2) et de STAT3 (Shirai et al., 2016). De plus, les monocytes et les macrophages, issus de patients atteints d'athérosclérose, présentent une consommation d'oxygène mitochondriale (oxygen consumption rate ou OCR) augmentée, ce qui suggère un activation métabolique générale (Shirai et al., 2016).

e-2- Le rôle du métabolisme des lipides

Le métabolisme des lipides est aussi affecté dans les cellules myéloïdes durant l'inflammation, en particulier le métabolisme du cholestérol et des acides gras. Nous ne reviendrons pas sur le rôle des lipoprotéines dans l'altération du métabolisme du cholestérol des cellules myéloïdes au sein des plaques d'athérosclérose, qui a déjà été décrit.

Le métabolisme du cholestérol est largement altéré suite à l'ingestion de lipoprotéines modifiées telles que les LDL oxydées qui sont à l'origine de la formation des macrophages spumeux. Comme déjà décrit, le métabolisme du cholestérol est largement contrôlé par l'expression des facteurs de transcription tels que les LXR ou les SREBP. Dans les macrophages spumeux, l'accumulation de desmostérol, un dérivé du cholestérol, suite à l'inhibition de l'enzyme DHCR24 est observée (Spann et al., 2012). Cela induit une activation des LXR, et une non-activation des SREBP, résultant en une suppression des processus inflammatoires. Cela suggère que la formation des macrophages spumeux est un processus anti-inflammatoire. Cependant, sous la stimulation de cytokines pro-inflammatoires, ces macrophages vont exprimer des gènes de l'inflammation (Feig et al., 2011). En présence de desmostérol et d'oxystérols, les facteurs SREBP sont retenus dans le réticulum endoplasmique. L'activation des SREBPs est liée a des fonctions inflammatoires. Par exemple, l'expression de SREBP1a dans des macrophages stimule la voie NF-κB, ce qui augmente la lipolyse et l'activation de l'inflammasome (Im et al., 2011). Ainsi le métabolisme du cholestérol joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire innée et la réponse inflammatoire (Tall and Yvan-Charvet, 2015).

Le métabolisme des acides gras est aussi impliqué dans la réponse immunitaire innée et la réponse inflammatoire. En effet, il est maintenant reconnu que les macrophages classiquement alternativement activés ou macrophages M2 présentent une augmentation de la FAO (Huang et al., 2014). Au contraire, les macrophages classiquement activés ou macrophages M1 présentent une augmentation de l'expression de la FAS (Fatty Acid Synthase). Dans un modèle murin d'athérosclérose, la déplétion en FAS réduit la formation des plaques d'athérosclérose et la formation de macrophages spumeux, probablement via l'activation des LXR (Schneider et al., 2010). De plus, plus récemment, il a été démontré que

la protéine FAMIN qui interagit avec la FAS et qui promeut la FAO, est cruciale pour la production d'IL-1β, soit à un phénotype pro-inflammatoire (Cader et al., 2016) (Ménégaut et al., 2017). De plus, il est suggéré que la nécessité de l'activation de la FAO dans la prolrisation en macrophages M2 soit remise en cause. En effet, les macrophages déficients pour la carnitine palmitoyl transférase 2 (CPT2), enzyme essentielle à la FAO, sont capables de se polariser en macrophages M2, après stimulation par l'IL-4 (Nomura et al., 2016). Comme élégament résumé (Ménégaut et al., 2017), l'ensemble de ces résultats suggèrent que le lien entre le métabolisme des acides gras et la polarisation des macrophages est très complexe et nécessite des études complémentaires. Il semble que ce soit aussi l'hypoxie qui soit au centre de la régulation du métabolisme des acides gras. En effet, dans des conditions hypoxiques, les enzymes impliquées dans la FAO sont moins exprimées mais, au contraire, les enzymes impliquées dans la synthèse des lipides sont stimulées. Cela peut expliquer l'augmentation de la formation de cellules spumeuses (Boström et al., 2006). De plus, en conditions diabétiques, le métabolisme des lipides est altéré. Notamment, grâce à l'étude des monocytes issus de patients diabétiques, il a été démontré que l'enzyme ACSL1 (Long-Chain Acyl-CoA Synthetase 1), enzyme impliquée dans l'initiation de la dégradation des acides gras, était plus exprimée. Cela est associé avec une augmentation de la production de prostaglandine et d'IL-6. Chez la souris diabétique, la délétion de cette enzyme permet une réduction de la formation des plaques d'athérosclérose (Kanter et al., 2012).

L'ensemble de ces résultats suggère que la voie de la glycolyse et le métabolisme des lipides jouent un rôle important dans le rôle des cellules myéloïdes au sein des plaques d'athérosclérose. De plus, cela souligne l'intérêt thérapeutique que représentent ces voies métaboliques dans le traitement de l'athérosclérose.

f- Le rôle de l'efferocytose dans la plaque d'athérosclérose

Lorsque les cellules spumeuses deviennent apoptotiques, des systèmes de clairance se mettent en place afin de limiter ce phénomène et réduire la quantité de cellules apoptotiques au niveau de la plaque. Le processus de phagocytose des cellules apoptotiques est appelé efferocytose. Cela nécessite que les différentes voies métaboliques comme la capacité à estérifier et à exporter le cholestérol soient fonctionnelles au sein de la cellule phagocytaire. Malheureusement, le métabolisme des macrophages de la plaque est altéré et un défaut d'efferocytose est observé dans les plaques avancées d'athérosclérose (Thorp and Tabas, 2009) (Kojima et al., 2017). Cela provoque un relargage de débris cellulaire et de lipides, ce qui induit une nécrose secondaire (**Figure 12**). L'apoptose des macrophages de la plaque d'athérosclérose est un processus multifactoriel et diffère au

cours du développement de la pathologie. *In vitro*, de nombreux facteurs ont été reconnus comme pro-apoptotiques pour les macrophages, comme de fortes concentrations de LDL oxydées, d'oxystérols, de TNF-α, de Fas-ligand, NO (monoxide d'azote), ou en conditions d'hypoxie, de déplétion en ATP, ou d'accumulation intracellulaire de cholestérol libre (Tabas,

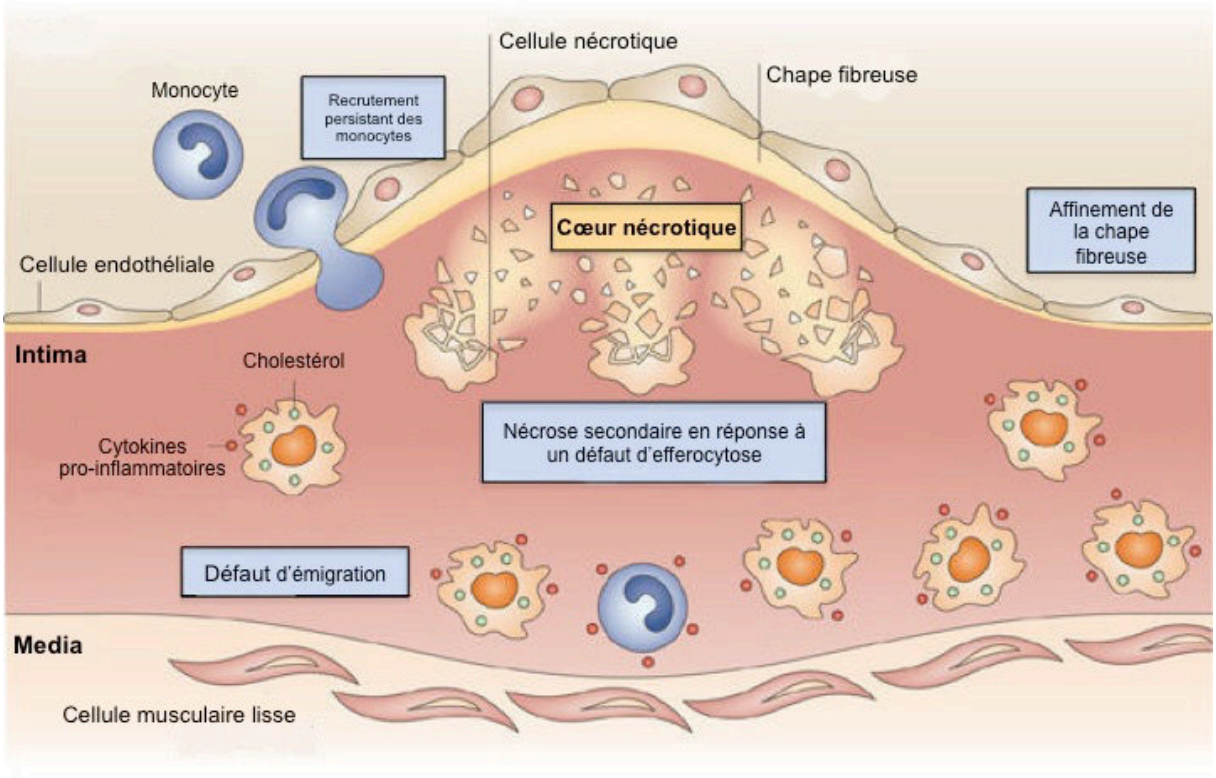


Figure 12: **Le défaut d'efferocytose dans les plaques d'athérosclérose induit une vulnérabilité de la plaque et un défaut de la résolution de l'inflammation.**
Adapté d'après Ira Tabas, Nat Rev Immunol, 2010

2005).

f-1- Principes généraux de l'efferocytose

La maintenance de l'homéostasie tissulaire nécessite le remplacement des cellules endommagées ou âgées par de nouvelles cellules. Le corps humain doit ainsi dégradé 150 milliards de cellules abîmées ou mortes par jour (Bianconi et al., 2013). Le fait d'éliminer spécifiquement les cellules apoptotiques est un processus appelé efferocytose.

Dans des conditions physiologiques, les cellules apoptotiques sont rapidement captées et digérées par des macrophages ou des neutrophiles, mais aussi par des cellules épithéliales (Savill and Fadok, 2000). Ce processus est tellement efficace que le nombre de

cellules apoptotiques dans un tissu sain est très faible. L'interaction entre les phagocytes et les cellules apoptotiques conduit à des processus primordiaux dans l'efferocytose. Il a notamment été démontré que cela avait pour but de réduire les stimuli pro-inflammatoires et aussi d'activer les voies de signalisation anti-inflammatoires (Henson et al., 2001) (Tabas, 2005).

La migration des phagocytes vers les cellules apoptotiques ainsi que la reconnaissance et la phagocytose par les cellules dédiées sont contrôlées par les signaux « find-me » et « eat-me » (**Figure 13**). En effet, les phagocytes vont migrer en direction des cellules apoptotiques grâce à la mise en place d'un gradient du signal « find-me ». Dans un premier temps, les signaux « find-me » sont nécessaires à la reconnaissance de la cellule apoptotique par le phagocyte (**Figure 13**). Les signaux clés sont les nucléotides triphosphate (ATP et UTP) (Elliott et al., 2017) (Qu et al., 2011), la chimiokine CX_3CL1 (Truman et al., 2008), et la présence de lysophosphatidylcholine (LysoPC) et de sphingosine-1-phosphate (S1P) (Lauber et al., 2003) (Weigert et al., 2006) (Gude et al., 2008). Le relargage d'ATP et d'UTP permet le recrutement des phagocytes exprimant les récepteurs purinergiques P2Y et l'augmentation de l'expression des récepteurs phagocytaires impliqués (Elliott et al., 2017) (Koizumi et al., 2007). La cytokine CX3CL1 permet le recrutement de phagocytes exprimant le récepteur à cette cytokine, le CX3CR1. De plus, CX3CL1 permet d'augmenter l'expression de MFG-E8 (signal « eat-me ») (Miksa et al., 2007). Les lipides agissant comme des signaux « find-me », comme la S1P qui interagit avec ses récepteurs S1PR1 à S1PR5 (Weigert et al., 2009), participent à la reconnaissance des cellules apoptotiques par les phagocytes. La LysoPC est aussi connue comme un signal « find-me » mais son rôle est moins décrit (Elliott et al., 2017). La cellule phagocytaire va alors émettre des prolongements cellulaires qui vont permettre le contact entre les deux cellules. A ce moment, la reconnaissance de signaux « eat me » a lieu et le phagocyte va capter la cellule apoptotique (**Figure 13**). L'un des signaux les plus connus est la présence de phosphatidyl-sérine (PS) à la surface cellulaire des cellules apoptotiques. La PS va être reconnue par des récepteurs, comme BAI-1, TIM, la stabiline, et CD300. Le récepteur BAI-1 se lie directement sur la PS, et induit une cascade de signalisation impliquant les protéines Elmo-Dock-Rac (Park et al., 2007). En parallèle, des récepteurs reconnaissent indirectement la PS des cellules apoptotiques grâce à l'intermédiaire des protéines comme MFG-E8, CCN1, GAS6 et la protéine S (ProS1) (Penberthy and Ravichandran, 2016) (Green et al., 2016). Les protéines MFG-E8 et CCN1 reconnaissent les intégrines $\alpha_V\beta_{3/5}$ et la vitronectine présentent sur les phagocytes, ce qui induit une activation de Rac et une internalisation du corps apoptotique (Hanayama et al., 2004). Les protéines GAS6 et ProS1 se lient sur les récepteurs Tyro3, AXL et MerTK, qui sont aussi appelés les récepteurs TAM. Les TAM interviennent dans l'efferocytose des

macrophages et des cellules dendritiques (Scott et al., 2001) (Seitz et al., 2007). D'un point de vue moléculaire, la liaison des protéines Gas6 et ProS1 sur ces récepteurs induit leur dimérisation, ce qui induit une activation de Rac. Plus récemment, il a aussi été mis en évidence que la cellule apoptotique pouvait elle aussi se diriger vers le phagocyte (Elliott and Ravichandran, 2016). Ensuite, la dernière étape est l'émission de signaux envoyés par le phagocyte après l'efferocytose. Après avoir phagocyter la cellule apoptotique, le phagocyte se retrouve avec un excès de matériel biologique à l'intérieur, contenant des lipides, des

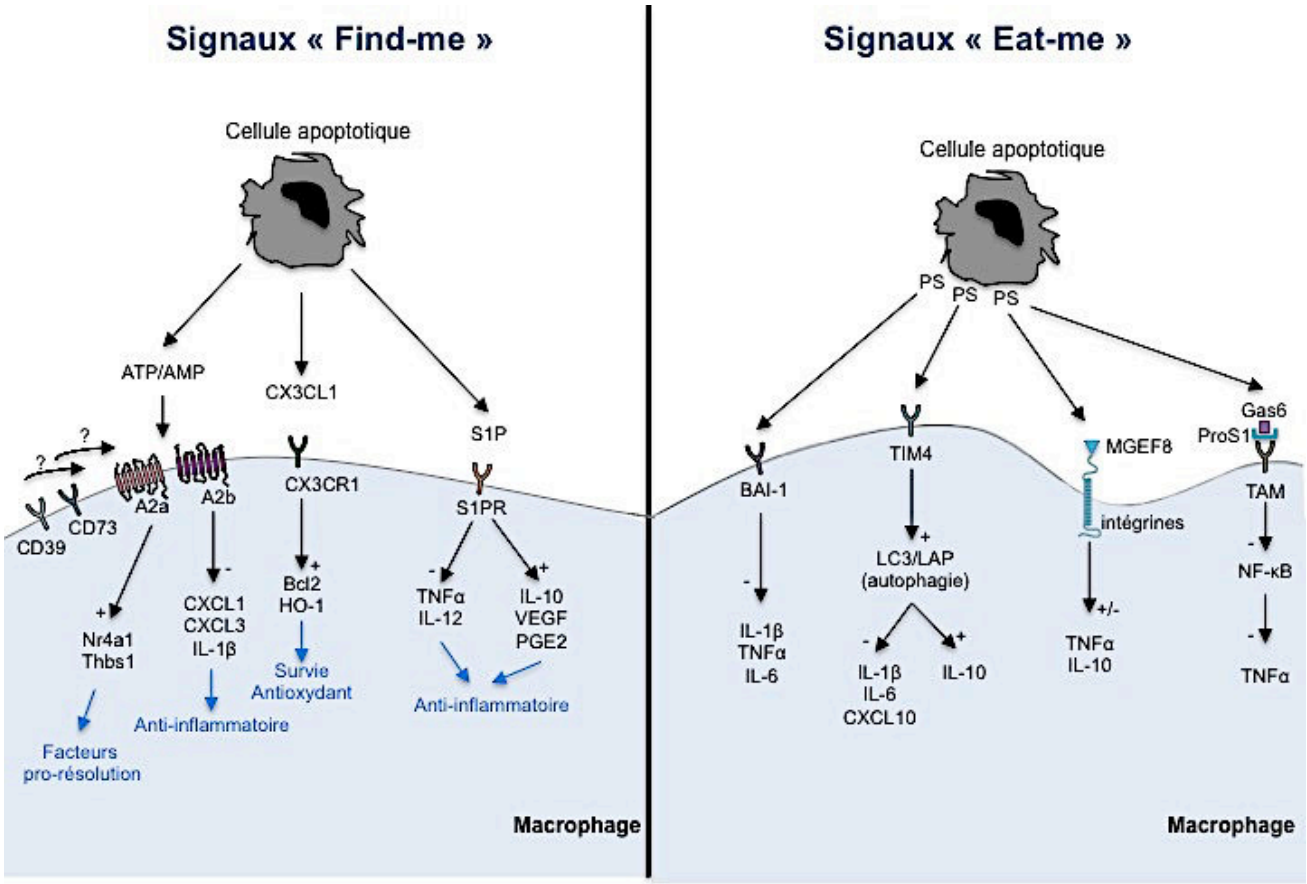


Figure 13: Le rôle des signaux « find-me » et « eat-me » dans la régulation de l'inflammation dans des conditions d'efferocytose.

sucres, des protéines et de l'acide nucléique.

Le phagocyte doit alors mettre en jeu des processus d'efflux et de dégradation de ce matériel. Après efferocytose, des études récentes montrent que de multiples voies qui détectent le contenu intracellulaire sont impliquées (Kiss et al., 2006) (Hsu et al., 2012)

(Fond et al., 2015) (Park et al., 2011). Dans ce contexte, les récepteurs nucléaires jouent un rôle central, LXRα, LXRβ, PPARγ et PPARδ, et RXRα ont été largement impliqués dans la régulation de l'efferocytose. En effet, ils rentrent en jeu dans la régulation de la transcription des gènes impliqués dans l'expression des récepteurs de l'efferocytose, des enzymes permettant la dégradation du matériel ingéré, et autres. Brièvement, les cellules apoptotiques sont capables d'induire l'expression des LXR dans les macrophages et de stimuler leur propre clairance (A-Gonzalez et al., 2009).

f-2- Rôle de l'efferocytose dans les plaques précoces d'athérosclérose

Dans des lésions précoces, il a été démontré que la réduction du nombre de macrophages qui entraient en apoptose induisait une augmentation de la taille des plaques d'athérosclérose (Gautier et al., 2009) (Thorp et al., 2009). Cela suggère que l'apoptose des macrophages, corrélée à une capacité d'efferocytose non altérée, permet de réduire le développement des plaques d'athérosclérose. En effet, dans un modèle murin d'athérosclérose précoce, il a été démontré que plus les macrophages peuvent rapidement entrer en apoptose plus les lésions sont petites (Arai et al., 2005). L'apoptose des macrophages et leur élimination prévient l'expansion de la plaque et permet une meilleure stabilisation de celle-ci. En ce qui concerne l'apoptose des cellules musculaires lisses, à ce stade, cela n'a pas d'effet délétère comme cela a été décrit (Clarke et al., 2006).

f-3- Rôle de l'efferocytose dans les plaques avancées d'athérosclérose

Le nombre de cellules apoptotiques augmente dans les lésions avancées (Kockx, 2000). Ceci est corrélé à un défaut des capacités phagocytiques dans la plaque. Les macrophages apoptotiques se retrouvent majoritairement autour du cœur nécrotique. Des études démontrent que les macrophages apoptotiques non phagocytés se nécrosent. De plus, un défaut d'efferocytose conduit à une augmentation de l'inflammation locale. Il a en effet été démontré qu'un défaut d'efferocytose conduisait à la sécrétion de TNFα, ce qui induit une augmentation de ce défaut (Martinet et al., 2011). L'accumulation de cellules apoptotiques au sein de la plaque augmente donc sa fragilité. En particulier, en ce qui concerne le cholestérol, la présence de PS à la surface des cellules apoptotiques permet une augmentation de l'expression du transporteur ABCA1 chez les macrophages (Kiss et al., 2006) (Kojima et al., 2014). De plus, un défaut d'efferocytose est impliqué dans la diminution des voies d'efflux du cholestérol dans les cellules endothéliales, ce qui permet de faire pencher la balance en faveur de l'efflux de cholestérol. En parallèle, la clairance des cellules apoptotiques par les macrophages permet la sécrétion de cytokines comme IL-10 (anti-inflammatoire) et le TGF-β qui autorise le recrutement de nouvelles cellules immunitaires

(Fadok et al., 1998). Dans le cas contraire, c'est à dire lorsque les cellules apoptotiques ne sont pas phagocytées, alors la production de cytokines pro-inflammatoires augmentent, ce qui peut être assimilé à une inflammation stérile (Kojima et al., 2014) (Ravichandran, 2011). Le défaut d'efferocytose peut être expliqué par plusieurs processus. Premièrement, la présence accrue de macrophages pro-inflammatoires au sein de la plaque, à défaut des macrophages anti-inflammatoires connus pour être de meilleurs phacogytes, suggèrent que les capacités d'efferocytose au sein de la plaque sont réduites (Yamamoto et al., 2011) (Martinez et al., 2009). Deuxièmement, la présence de ROS (Reactive Oxygen Species ou Espèces Réactives de l'Oxygène) est augmentée dans la plaque, et il a été mis en évidence que cela altérait la fonction de macrophages (Schrijvers, 2005). Troisièmement, le rôle de l'inflammation est crucial dans ce processus. Comme dit plus haut, la sécrétion de TNFα est délétère. En effet, elle induit une augmentation de l'expression du CD47 à la surface des cellules musculaires lisses qui entrent en apoptose (Kojima et al., 2016). Le CD47 est connu pour être un signal « don't eat me ». De la même manière, l'inflammation induite par l'activation des TLR (Toll Like Receptor) inhibe l'expression du récepteur MFGE8, connu comme un récepteur pro-efferocytique. En conditions pro-inflammatoires, les récepteurs « eat me » comme MerTK ou LRP1 subissent des modifications post-traductionnelles inactivatrices (Thorp and Tabas, 2009) (Tabas, 2010) (Thorp et al., 2011). Le rôle de l'inflammation dans l'athérosclérose est donc central (Libby, 2002).

f-4- Le rôle de l'efferocytose dans la régulation de l'inflammation

Lors d'une infection ou d'une blessure, une réponse inflammatoire est produite afin d'attirer les cellules immunitaires à ce niveau dans le but d'éliminer les pathogène afin de préserver l'intégrité tissulaire, et à terme une résolution de l'inflammation. Dans le cas où l'inflammation n'est pas correctement régulée, une inflammation chronique se met en place et participe à la mise en place de nombreuses pathologies. Les mécanismes de la résolution de l'inflammation sont donc importants à comprendre. Dans ce contexte, l'efferocytose est un acteur clé. En effet, ce processus est impliqué dans la modulation de la réponse des macrophages dans un contexte inflammatoire. Le premier effet anti-inflammatoire de l'efferocytose est la séquestration physique des cellules apoptotiques, afin de limiter le relargage de molécules pro-inflammatoires (Galluzzi et al., 2015) (Kono and Rock, 2008). Grâce à l'utilisation de modèles murins, il a été largement démontré que la perturbation de l'efferocytose conduisait à une augmentation de la réponse inflammatoire (Elliott and Ravichandran, 2016). De plus, l'efferocytose peut aussi largement altérer la réponse inflammatoire du macrophage lui-même.

Les signaux « find-me » sont aussi des modulateurs clés de la réponse

inflammatoires du macrophages. L'ATP libéré par les cellules apoptotiques va être dégradé en adénosine, qui est un modulateur important de l'inflammation des macrophages (Cekic and Linden, 2016). Durant l'efferocytose, les récepteurs à l'adénosine (A2a et A2b) réduisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (CXCL1 et CXCL2) et augmentent l'expression de facteurs impliqués dans la résolution (tels Nr4a1 et Thbs1) (Köröskényi et al., 2011). Les mécanismes du relargage de l'adénosine sont à ce jour peu connus, mais l'adénosine peut être produite directement par les macrophages ou par la dégradation des nucléotides dans le milieu extracellulaire (par les enzymes CD39 et CD73, notamment). Le binôme CX3CL1-CX3CR1 est impliqué dans la réduction des signaux pro-inflammatoires et dans l'augmentation de la production des signaux de survie (comme BCL-2) et des facteurs antioxydants (HO-1) (Engel et al., 2015). De plus, il a été démontré que la S1P envoyait un message anti-apoptotique et anti-inflammatoire au phagocyte. En effet, dans les macrophages, après interaction entre la S1P et ses récepteurs, une diminution de l'expression du TNFα et de IL-12 et, au contraire, une augmentation de l'expression de l'IL-10, du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et de la PGE2 sont observées (Weigert et al., 2007) (Weis et al., 2009). Le récepteur S1P1R semble aussi être impliqué dans la mise en place d'un phénotype anti-inflammatoire chez les macrophages (phénotype M2-like) via la diminution de la voie NFκB et la voie des PPARγ (Weigert et al., 2009) (Luo et al., 2016).

Les signaux « eat-me » sont aussi impliqués dans la régulation de l'inflammation. En effet, le récepteur BAI-1 a été démontré comme anti-inflammatoire dans un modèle murin de colite. De plus, la délétion de BAI-1 dans les macrophages et dans les cellules épithéliales promeut la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1α, l'IL-6 et le TNFα, dans des conditions d'efferocytose, *in vitro* (Lee et al., 2016). Aussi, la voie de signalisation Elmo-Dock-Rac activée par BAI-1 module directement l'expression de gènes inflammatoires (Park et al., 2011). Cependant, les mécanismes d'action restent mal compris à ce jour. Les récepteurs TIM-1 et TIM-3 sont aussi impliqués dans la reconnaissance de la PS. La déficience en TIM-1 et TIM-3 induit un défaut de la réponse immunitaire dans de nombreux tissus. Dans un modèle ischémie/re-perfusion, TIM-1 est nécessaire à une réponse immunitaire correcte, incluant un processus d'efferocytose efficace (Elliott et al., 2017). TIM-3 est exprimé par les cellules myéloïdes et est impliqué dans la réponse immunitaire mais aussi des processus d'immuno-suppression durant l'efferocytose (Ocaña-Guzman et al., 2016). TIM-4 est aussi impliqué dans l'efferocytose en activant l'autophagie dépendante de LC-3 ou LAP (LC-3 Associated Phagocytosis) (Martinez et al., 2011). En effet, un défaut de LAP dans les cellules myéloïdes induit une inflammation chronique dans un modèle murin. Les macrophages ne pouvant pas activé le LAP produisent plus de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1β, IL-6 ou la CXCL10 et moins de cytokines anti-

inflammatoires, comme l'IL-10 (Martinez et al., 2016). L'implication des différents sous-types du récepteur CD300 reste floue. En effet, selon leurs associations avec d'autres récepteurs ou d'autres molécules de signalisation, ainsi que le contexte dans lequel ils agissent, les récepteurs CD300 A, B ou F peuvent être anti- ou pro-inflammatoires . Les récepteurs à la stabiline (Stab1 et Stab2) reconnaissent aussi la PS et participent à l'efferocytose. Dans un modèle murin de double déficience pour Stab1 et Stab2, il a été démontré que les souris déficientes présentaient un niveau d'inflammation tissulaire important en comparaison avec des souris sauvages. Cependant, ce phénotype ne semble pas impliqué un défaut d'efferocytose dans ces modèles. Les protéines MFG-E8 et CCN1 reconnaissent les PS des cellules apoptotiques et permettent la liaison à des récepteurs présents sur les phagocytes. Cependant, les mécanismes de signalisation par lesquels les intégrines modifient la production du TNFα et de l'IL-10 restent peu connus (Schutters et al., 2013). En ce sens, le blocage des intégrines par des anticorps ou la déficience des sous-unités β_3 ou β_5 ne modifie pas la production des cytokines par les macrophages (Lucas et al., 2006). Il est important de noter que les sous-unités α des intégrines peuvent interagir avec une multitude de sous-unités β, ainsi qu'avec d'autres récepteurs impliqués dans l'efferocytose. Leur rôle reste donc mal défini, au vue de la complexité à l'étudier. *In vivo*, une altération de la signalisation des récepteurs TAM (Tyro3, AXL et MerTK) provoque une accumulation de cellules apoptotiques au sein des tissus et augmente l'inflammation (Scott et al., 2001) (Sharif et al., 2006) (Rothlin et al., 2007). Brièvement, AXL et MerTK peuvent inhiber la signalisation en aval du TLR, et ainsi réduire la voie NFκB impliquée dans la production du TNFα (Sen et al., 2007). Même si les mécanismes d'action sont peu décrits, il est évident que les récepteurs TAM sont impliqués dans la régulation de l'efferocytose et de l'inflammation qui lui est reliée.

Après efferocytose, le phagocyte active normalement des voies afin de gérer l'augmentation de son contenu en matériel biologique, notamment via les récepteurs nucléaires. Plusieurs études démontrent que le manque d'un seul des récepteurs nucléaires impliqués entraine un défaut de clairance des cellules apoptotiques, corrélé à une augmentation de l'inflammation et de l'auto-immunité (Mukundan et al., 2009) (A-Gonzalez et al., 2009) (Roszer et al., 2011). Le détail des acteurs impliqués dans la signalisation intracellulaire reste inconnu. Outre leur rôle dans la régulation de l'expression des récepteurs efferocytiques, les récepteurs nucléaires modulent l'inflammation au sein du macrophage (A-Gonzalez et al., 2009). En effet, la déficience en LXR (α et β) induit une diminution de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (TGF-β et IL-10) et augmente celle des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β et l'IL-12 (A-Gonzalez et al., 2009). Le même profil est retrouvé chez des macrophages déficients pour PPARδ (Mukundan et al., 2009). Plus récemment, le récepteur nucléaire Nr4a1 a été montré comme étant induit en présence de

cellules apoptotiques *in vitro*. Des macrophages déficients pour Nr4a1 présentent une augmentation de la voie de signalisation NF-κB, et une sécrétion accrue d'IL-12 (Ipseiz et al., 2014). De plus, le récepteur Nr4a1 est activé par la liaison de l'adénosine sur son récepteur A2a, suggérant un rôle des signaux « find-me » dans la régulation de l'inflammation du phagocyte (Crean et al., 2015). Pour finir, le métabolisme du cholestérol et en particulier la production de desmostérol a été démontré comme un acteur clé dans la régulation de l'inflammation des macrophages dans la plaque (Spann et al., 2012).

III. Les cellules myéloïdes : les monocytes et les macrophages

Les monocytes sont des cellules effectrices qui émigrent de la moelle osseuse où ils sont produits à partir des cellules souche hématopoïétiques (CSH), vers le sang dans lequel ils circulent. Les monocytes sont ensuite recrutés dans les tissus périphériques en situation physiologique ou pathologique (comme dans le cadre de l'inflammation). Dans les tissus périphériques au sein desquels ils sont recrutés, ils se différencient en macrophages. L'ensemble de ces processus (la sortie de la moelle osseuse, le recrutement dans les tissus, la différenciation en macrophages) sont dépendants du niveau d'expression de récepteurs aux chimiokines et de molécules d'adhésion présents à la surface des monocytes ainsi que de l'environnement dans lequel ils évoluent (Ingersoll et al., 2010). L'ensemble de ces processus va être décrit dans cette partie.

a- L'hématopoïèse et la myélopoïèse

Les monocytes, comme toutes les cellules sanguines, sont produits grâce au processus d'hématopoïèse. L'hématopoïèse est un système finement régulé qui assure le renouvellement continu des cellules sanguines matures à partir de cellules souches. Nous allons plus particulièrement nous focaliser sur la production des cellules myéloïdes, la myélopoïèse (**Figure 14**).

Les monocytes proviennent des cellules souche hématopoïétiques (CSH) qui se différencient en MMP (Multipotent Myeloid Progenitors) puis en CMP (Common Myeloid Progenitors). Les CMP produisent les monocytes, les neutrophiles, les mégacaryocytes, les basophiles et les mastocytes via le progéniteur des granulocytes/macrophages (GMP) (Hettinger et al., 2013). En présence de différentes cytokines, comme le GM-CSF (ou CSF2), de M-CSF (ou CSF1), d'IL-3 ou d'IL-6, les GMP deviendront des monoblastes puis des promonocytes et enfin des monocytes (**Figure 14**).

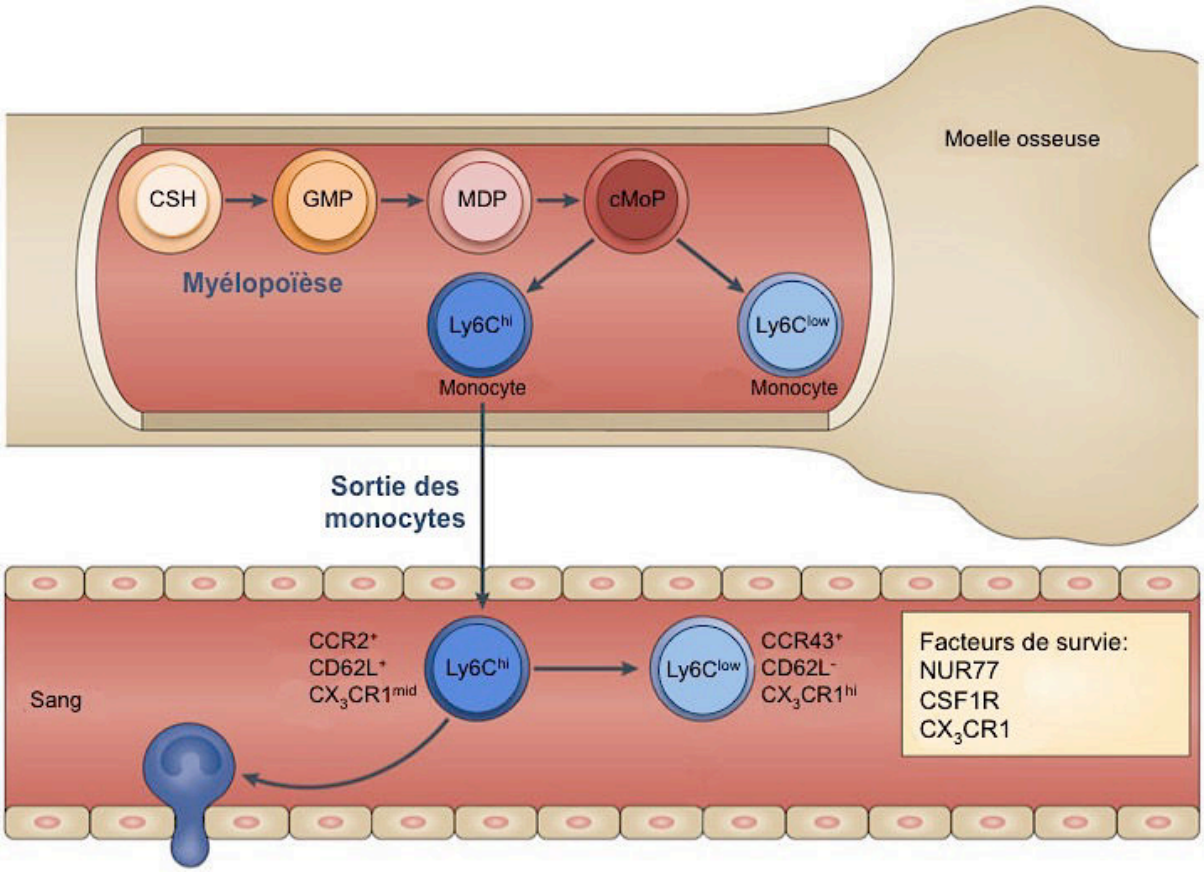


Figure 14: La myélopoïèse et sortie de la moelle des monocytes. Les monocytes sont produits dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH se différencient en GMP (Granucolyte-Monocyte Precusor), qui eux même donnent des MDP (Macrophage and Dendritic cell Precursor). Enfin les cMoP (common monocyte progenitor) permettent la production de monocytes. Les monocytes sortent de la moelle. A l'état basal, les monocytes Ly6C^{hi} et Ly6C^{low} se retrouvent dans le sang.
CCR2: CC-Chemoline Receptor-2, CSF1R: Colony-Stimulating Factor1 Receptor, CX$_3$CR1: CX$_3$C-chemokine receptor 1
Adapté de Ginhoux F. et Jung S., Nature Rev Immunol, 2014

Plus récemment, il a été mis en évidence que les macrophages et les cellules dendritiques dérivent aussi d'un progéniteur plus spécifique appelé MDP (Macrophages/Dendritic cells Progenitor) qui va produire spécifiquement des macrophages et des cellules dendritiques résidents des tissus, ainsi que des macrophages et des cellules dendritiques lors d'une situation d'urgence comme une inflammation (Fogg et al., 2006). Les MDPs sont aussi capables de produire des monocytes qui pourront à leur tour produire des macrophages et des cellules dendritiques. Dans une étude plus récente, il a été démontré que les monocytes pouvaient être issus d'un progéniteur spécifique des cellules myéloïdes, MyRP (Myeloid-Restricted Progenitor). Cette voie de production des monocytes serait particulièrement sollicitée en cas de stress.

Les progéniteurs présents dans la moelle osseuse expriment différents récepteurs aux cytokines à leur surface. Notamment, la présence du récepteur au M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) est nécessaire au développement des monocytes/macrophages *in vivo* et *in vitro*, alors que ce n'est pas le cas pour les cellules dendritiques. En effet, les souris présentant une déficience pour le récepteur au M-CSF ou son ligand n'ont pas de monocytes circulants (Dai et al., 2002). En parallèle, le ligand du récepteur tyrosine-kinase Flt-3 est important pour le développement des cellules dendritiques mais pas pour les monocytes/macrophages (Auffray et al., 2009).

b- La niche hématopoïétique et l'émigration des monocytes de la moelle osseuse

Comme cela vient d'être décrit, les CSH sont à l'origine des monocytes. Les CSH sont localisées au sein de la niche hématopoïétique. La niche hématopoïétique est un microenvironnement localisé au sein de la moelle osseuse qui permet le maintien et la régulation des CSH (Morrison and Spradling, 2008). Même si la caractérisation de cet endroit particulier n'est pas totale, certains acteurs clés dans la structure de la niche vont être détaillés dans cette partie.

b-1- Le rôle des cellules non-hématopoïétiques dans la niche

Les CSH ont besoin d'un contact cellule-cellule avec les cellules qui composent la niche hématopoïétique.

Malgré le fait que les ostéoblastes aient été le premier type cellulaire connu pour avoir une activité sur les CSH (Calvi et al., 2003) (Zhang et al., 2003), leur rôle semble être indirect, notamment via la sécrétion de facteur. La modulation positive ou négative du nombre d'ostéoblastes au sein de la niche ne semble pas avoir d'effet sur l'homéostasie des CSH (Morrison and Scadden, 2014). De plus, les cellules mésenchymateuses et stromales (MSC, Mesenchyma and Stromal Cells) participent à la structure de la niche hématopoïétique. En effet, ces cellules expriment la nestine, se localisent autour des vaisseaux de la niche et participent au maintien des CSH et sécrètent du CXCL12.

Les CSH sont souvent proches des vaisseaux, ce qui suggère que les CSH sont maintenues dans la niche périvasculaire par les cellules endothéliales ou les cellules périvasculaires (Kiel et al., 2005) (Sugiyama et al., 2006). De plus, il est reconnu que les CSH peuvent entrer et sortir de la moelle pour se retrouver dans la circulation (Wright et al., 2001). Il est important de préciser que les CSH se localisent préférentiellement dans des micro-domaines où la E-sélectine et le CXCL12 (ou stromal cell-derived factor 1, SDF-1)

sont abondants. Par exemple, les cellules réticulaires exprimant fortement le CXCL12, appelées les cellules CAR (CXCL12-abundant reticular) sont les premières cellules à avoir été co-localisées avec les CSH. La délétion du CXCL12 dans les cellules de la moelle osseuse induit une déplétion en CSH (Omatsu et al., 2010).

Les cellules endothéliales contribuent à la niche (Kiel et al., 2005). Les cellules endothéliales expriment une large variété de récepteurs. Notamment, la délétion du récepteur gp130 (glycoprotéine 130), considéré comme un récepteur aux cytokines, présent sur les cellules endothéliales induit une déstructuration de la moelle osseuse, avec un nombre réduit de CSH. De la même manière, l'inhibition du VEGFR2, récepteur au VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), altère la fonction de la moelle osseuse (Hooper et al., 2009). De plus, la délétion de la E-sélectine, majoritairement exprimée par les cellules endothéliales induit une augmentation de la quiescence des CSH et les rend plus résistantes à l'irradiation. L'ensemble de ces résultats suggère que les cellules endothéliales participent structurellement et fonctionnellement à la niche hématopoïétique. Cependant, à ce jour, il est difficile de déterminer si la régulation de la niche hématopoïétique par les cellules endothéliales est directe, via un contact cellule-cellule ou indirecte, via la sécrétion de facteurs (Morrison and Scadden, 2014).

Il est important de souligner que les cellules de la niche sont capables de produire des facteurs importants impliqués dans le maintien des CSH *in vivo*. Par exemple, le SCF (Stem Cell Factor) est un facteur important pour la survie des CSH dans la niche. Il a été démontré que le SCF était majoritairement produit par les cellules périvasculaires au sein de la niche, notamment par les cellules stromales et les cellules endothéliales. En effet, la délétion du gène *scf*, codant pour le facteur *SCF,* provoque une déplétion en CSH (Ding et al., 2012). Il faut aussi noter que la délétion du gène *scf,* dans les ostéoblastes et les CSH, n'a pas d'impact sur l'homéostasie de la moelle osseuse. Cela suggère que les cellules endothéliales et les cellules mésenchymateuses permettent aussi le maintien des CSH par la production du SCF.

b-2- La sortie des monocytes de la moelle osseuse ou leur mobilisation

Les monocytes matures quitteront la moelle osseuse pour rejoindre la circulation. La sortie de la moelle osseuse des monocytes est dépendante de l'expression de CCR2 (Shi and Pamer, 2011) (**Figure 14**). En effet, les monocytes qui vont exprimer faiblement le CXCR4 (CXC Chemokine receptor 4) vont pouvoir sortir de la moelle osseuse et circuler dans le sang (Chong et al., 2016). Dans le sang, ils représentent 5 à 10% des leucocytes

chez l'Homme et 2% chez la souris. Après la naissance, ils dérivent des précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse, entrent ensuite dans la circulation sanguine puis sont recrutés dans les tissus. Ils sont présents dans de nombreux tissus tels que la rate, le foie et la moelle osseuse. Dans la circulation sanguine, la demi-vie du monocyte est courte et varie en fonction de la sous-population de monocytes: elle n'est que de trois jours chez l'Homme et d'un jour chez la souris. Les monocytes ont un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie, notamment via leur rôle dans l'immunité innée et adaptative. En effet, les monocytes sont capables de se différencier en macrophage.

c- La circulation des monocytes dans le sang

Chez la souris, de nombreuses études tentent de déterminer le nombre de sous-populations de monocytes. Il a été établi qu'il existait au moins deux types de monocytes qui se différencient pas leur niveau d'expression du récepteur Ly-6C (qui est un épitope de Gr-1 pour glucocorticoid receptor). Les monocytes qui expriment fortement Ly-6C (Ly-6C^{high}) sont CCR2^{high} CX$_3$CR1^{low} et CD62L$^-$, au contraire, les monocytes qui expriment faiblement Ly-6C (Ly-6C^{low}) sont CCR2^{low} CX$_3$CR1^{high} et CD62L$^-$. D'un point de vue morphologique, les monocytes Ly-6C^{high} sont des cellules larges et granuleuses, alors que les monocytes Ly-6C^{low} sont de petites cellules (Geissmann et al., 2003). Il est important de noter que les monocytes Ly-6C^{low} proviennent directement des monocytes Ly-6C^{high}, cela génère aussi une population de monocytes dits monocytes intermédiaires. La conversion des monocytes Ly-6C^{high} en monocytes Ly-6C^{low} est dépendante de l'activation du récepteur nucléaire (NR4A1) (Yona et al., 2013). Il est aussi démontré que la régulation et la survie des monocytes dans le sang passe par l'expression endothéliale de la protéine DLL1.

Chez l'Homme, les deux populations se distinguent par l'expression des deux récepteurs CD14 et CD16 (FcgRIII). En effet, les monocytes classiques qui sont CD14^{++} CD16$^-$ représentent 85% des monocytes circulants. Ils sont analogues aux monocytes Ly-6C^{high} murins. Les monocytes non classiques CD14^{low} CD16^{++} représentent 10% des monocytes circulants et sont comparables aux monocytes Ly-6C^{low} murins (Randolph et al., 1998). Il existe aussi une population de monocytes appelée monocytes intermédiaires qui sont CD14^{++} CD16$^+$ (Ziegler-Heitbrock, 2007). D'un point de vue fonctionnel, il est démontré qu'une population (Ly-6C^{low}) sert de « patrouilleur » dans les vaisseaux sanguins et aide aux fonctions des cellules endothéliales (Auffray et al., 2007). L'autre population (Ly-6C^{high}) est capable de transmigrer au travers de l'endothélium afin de rejoindre les tissus en fonctions des divers signaux (Jakubzick et al., 2013) (Auffray et al., 2007). En effet, les monocytes expriment toute une batterie de récepteurs scavengers qui leur permet de reconnaître certains lipides et mircroorganismes. Cela induit une réponse, les monocytes s'activent et

produisent des agents cytotoxiques (ROS, NO,…) mais aussi de nombreuses cytokines comme le TNFα, l'IL-1β, l'IL-8, l'IL-6 et l'IL-10 ainsi que des prostaglandines. Les monocytes appartiennent au système des phagocytes mononuclés, avec les macrophages et les cellules dendritiques. Ainsi, les monocytes sont capables de phagocyter des débris cellulaires et des pathogènes. Les monocytes ont la capacité de présenter des antigènes à leur surface (APC, Antigene Presentating Cell).

d- Les macrophages

d-1- La différenciation des monocytes en macrophages en conditions physiologiques

En conditions physiologiques, les monocytes Ly-6C^{high} ont une demi-vie d'environ 1 jour dans la circulation. Ils circulent dans le sang, puis infiltrent les tissus ou les ganglions lymphatiques. Dans le sang, ils peuvent aussi se convertir en monocytes Ly-6C^{low}. Les monocytes vont être recrutés dans les tissus de manière dépendante du CCR2 (CC-Chemokine Receptor 2), qui est aussi impliqué dans la sortie des monocytes Ly-6C^{high} de la moelle osseuse (Jakubzick et al., 2013). A l'état basal, après que les monocytes ont interagi et/ou traversé l'endothélium, ils maintiennent généralement leur profil. Ils ont quand même tendance à augmenter l'expression des gènes IL-1β, TNFα, MHCII, CD206, CD11c et CCR7. De plus, ils perdent l'expression du Ly-6C et du CD62L. L'augmentation de l'expression du MHCII et du CCR7 suggère que les monocytes tissulaires jouent un rôle important dans la surveillance immunitaire, notamment dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T au niveau des ganglions lymphatiques (Jakubzick et al., 2017). Les monocytes classiques sont capables de reconstituer les populations tissulaires résidentes de monocytes, et les populations qui en dérivent, dans des conditions physiologiques (Guilliams et al., 2014). Les monocytes non-classiques sont impliqués dans la surveillance de l'intégrité endothéliale de manière dépendante de la protéine LFA-1 (Auffray et al., 2007).

d-2- La différenciation des monocytes en macrophages en conditions inflammatoires

Les monocytes circulants migrent au niveau des sites inflammatoires afin d'éliminer les pathogènes et ainsi contribuer au maintien de l'homéostasie tissulaire. Dans le cadre d'une inflammation, les tissus sécrètent de nombreuses cytokines et chimiokines, ainsi que des débris cellulaires, afin de recruter les effecteurs du système immunitaire et d'induire une réponse adaptée. Les monocytes classiques sont rapidement recrutés sur les sites inflammatoires (Serbina and Pamer, 2006) et de blessure (Zigmond et al., 2014). Les

monocytes peuvent aussi produire eux-mêmes des médiateurs inflammatoires afin d'augmenter la mobilisation des cellules immunitaires sur le site inflammatoire. Ils possèdent une plasticité importante, ce qui leur permet d'avoir un large champ d'action. Notamment, ils sont capables de phagocytose grâce à des modifications de leur métabolisme et de leur taille. Les monocytes deviennent plus gros, avec des modifications des organites intracellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondries et lysosomes).

Le recrutement des monocytes est permis grâce à une attraction par les cytokines MCP-1 (CCL2) et/ou MCP-3 (CCL7) (Monocyte Chemotactic Protein 1 et 3) qui sont des molécules reconnues par le CCR2, largement exprimé par les monocytes classiques. Lorsqu'il y a reconnaissance entre le CCR2 et les protéines MCP, des mécanismes d'adhésion se mettent en place entre les monocytes circulants et les cellules endothéliales. Cela induit une migration ou extravasation des monocytes vers les sites inflammatoires (Moore et al., 2013).

Durant une inflammation, les monocytes recrutés dans les tissus gardent un phénotype pro-inflammatoire et les macrophages qui en sont issus aussi. Cependant, ce terme « pro-inflammatoire » n'est pas représentatif ni de l'état dans lequel se trouvent les monocytes, ni de leur fonction au sein du tissu. En effet, les monocytes et les macrophages jouent un rôle majeur dans la résolution de la phase inflammatoire et aident au maintien de l'homéostasie du tissu (Ginhoux and Jung, 2014). Pour les macrophages, ils se dissocient en deux sous-groupes majoritaires : les macrophages M1 ou pro-inflammatoire et les macrophages M2 ou anti-inflammatoires ou « pro-resolving ». Il est important de souligner que les macrophages non-résidants (dérivant des monocytes) sont très hétérogènes concernant l'expression des différents marqueurs permettant la distinction entre ces deux populations. Durant une réponse immunitaire, les monocytes sont exposés à la fois à des stimuli pro- et anti-inflammatoires, ce qui suggère que les monocytes peuvent acquérir différents morphotypes en fonction de leur environnement. De plus, la différenciation des monocytes en macrophages est un processus complexe où subsistent des zones d'ombre.

d-3- Les macrophages tissulaires résidents d'origine embryonnaire

Depuis longtemps, il est établi qu'un tissu sain possède des macrophages résidents. Selon leur localisation, les macrophages ont différents noms (**Figure 15**). Dans un premier temps, il a été reconnu que ces cellules provenaient des monocytes circulants qui se différenciaient alors en macrophages dans le tissu, comme nous venons de le décrire. Cependant, des études plus récentes démontrent que les macrophages résidents sont aussi établis durant l'embryogénèse.

Ces macrophages dérivent du sac vitellin puis du foie fœtal, et rejoignent enfin leur tissu cible (Ginhoux and Jung, 2014). Ils se maintiennent majoritairement par auto-renouvellement durant la vie adulte (Schulz et al., 2012) (Yona et al., 2013) (Hoeffel et al., 2012). Ces macrophages d'origine embryonnaire possèdent de nombreuses fonctions communes avec les macrophages dérivés des monocytes. Mais, ils possèdent aussi des fonctions et des propriétés qui leur sont spécifiques, de manière dépendante de leur localisation tissulaire (Gautier et al., 2012) (Hooper et al., 2005). Cela remet en perspective le rôle des macrophages classiques, ceux dérivés des monocytes qui sont retrouvés dans le sang et les tissus.

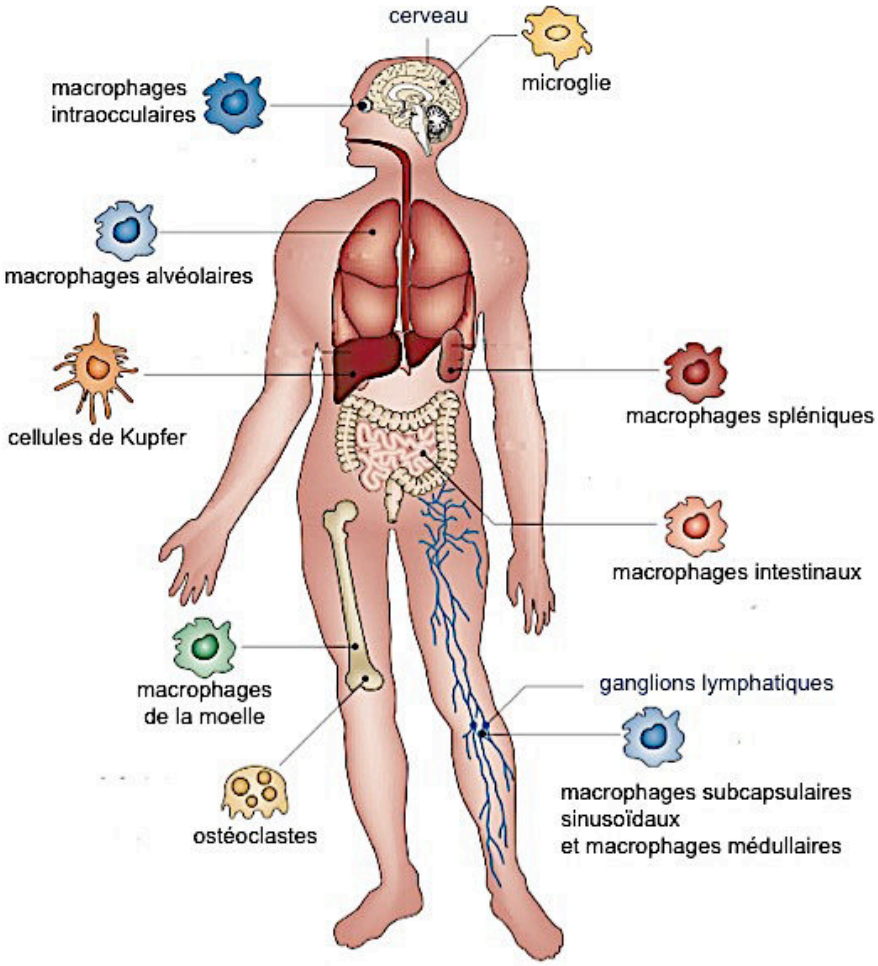


Figure 15: Les macrophages résidents tissulaires et leur localisation.
Les macrophages résidents tissulaires sont générés durant l'embryogénèse à partir des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Les CSH produisent des monocytes qui une fois recrutés dans les tissus se différencient en macrophages matures. Ainsi, plusieurs populations de macrophages résidents tissulaires apparaissent et jouent un rôle dans la surveillance tissulaire, la phagocytose, la présentation des antigènes et l'immuno-suppression.
Adapté de Singh A. et al., JCR, 2014 et Murray PJ. et al., Nat Rev Immunol, 2014

IV. La régulation métabolique des cellules souches hématopoïétiques

Toutes les cellules vivantes ont besoin d'énergie pour survivre, proliférer et se différencier. Pour la plupart des cellules, cela implique la dégradation de trois substrats énergétiques majoritaires : le glucose, les acides aminés et les lipides. Les cellules myéloïdes n'échappent pas à cette règle. Dans cette partie, nous allons détailler certaines voies métaboliques importantes dans la modulation de la production et la régulation de la physiologie des cellules myéloïdes, notamment le métabolisme du glucose et le métabolisme du cholestérol.

a- La régulation métabolique des cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont localisées dans la niche osseuse hématopoïétique où elles sont maintenues dans un état de quiescence. L'environnement au sein de la niche se maintient tout au long de la vie afin de faciliter la maintenance de l'état de quiescence des CSH.

a-1- La régulation des CSH par le métabolisme du glucose

Le glucose est l'une des sources majeures d'énergie pour les cellules, un carburant essentiel. Son entrée dans les cellules est dépendante des transporteurs au glucose. Il existe deux types majeurs de transporteurs au glucose : les GLUT (Glucose Transporter) qui permettent une diffusion passive, et les SGLT (Sodium Glucose co-transporter) qui permettent une diffusion active, nécessitant la présence d'ATP. Les transporteurs SGLT sont des co-transporteurs du glucose d'environ 60kDa, composé de 12 segments transmembranaires, exprimés majoritairement par l'épithélium digestif et le tubule rénal. Ainsi, ces transporteurs sont importants dans le contrôle de l'absorption du glucose au niveau des entérocytes et du néphron. Ils utilisent le gradient transmembranaire du sodium via une pompe ATPase NA^+/K^+. Une molécule de glucose est échangée contre une molécule de sodium. Les transporteurs GLUT sont des transporteurs de 54kDa, composé de 12 segments transmembranaires. Chez l'Homme, 4 (GLUT1 à GLUT4) des 14 membres sont impliqués dans l'entrée du glucose dans les cellules. L'expression de ces 4 membres varie en fonction du type cellulaire. En effet, les transporteurs GLUT-1 et GLUT-3 sont exprimés de manière ubiquitaire, le transporteur GLUT-2 est exprimé dans le foie et les cellules β des ilôts de Langerhans du pancréas et le transporteur GLUT-4 est exprimé dans les cellules

musculaires et les adipocytes. Une fois entré dans la cellule, le glucose peut être dégradé via la voie de la glycolyse (qui sera détaillée plus bas) ou bien être transformé en glycogène via la glycogénèse notamment dans les cellules musculaires et hépatiques.

La glycolyse ou voie d'Embden-Meyeroff-Parnas est l'une des premières voies métaboliques à avoir été décrite. La glycolyse permet la transformation d'une molécule de glucose en 2 molécules de pyruvate, associée à la production nette de 2 molécules d'ATP (**Figure 16**). Cette réaction fait intervenir plusieurs enzymes présentes dans le cytoplasme des cellules. Cette réaction peut avoir lieu en présence d'oxygène, c'est la glycolyse aérobie, ou bien en absence d'oxygène, c'est la glycolyse anaérobie. En réalité, c'est le devenir du produit final de cette réaction, le pyruvate, qui diffère entre les deux conditions. En condition aérobique, le pyruvate est transformé en acétyl-coA afin d'alimenter le cycle de Krebs mitochondrial où il sera complètement oxydé. Le cycle de Krebs permet ainsi la production d'équivalents réducteurs qui initient la phosphorylation oxydative, permettant une production importante d'ATP, grâce à l'ATP synthase. En condition anaérobique, le pyruvate va être transformé en lactate lors de la fermentation lactique, ce qui ralenti le cycle de Krebs puisque le pyruvate n'est plus transformé en acétyl-coA. Cette réaction est catalysée par l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) en présence de NADH. Le lactate est exporté à l'extérieur de la cellule via des transporteurs. Il peut alors être utilisé pour produire du glucose au cours de la néoglucogénèse ou dans le cycle de Cori.

Dans la niche hématopoïétique, la concentration en oxygène est faible, ainsi les CSH sont dans des conditions hypoxiques. A ce titre, l'hypoxie est un critère clé dans la régulation du métabolisme des CSH dans la niche. En effet, dans ces conditions, le facteur de transcription HIF1 (Hypoxia Inducible factor-1) est exprimé. HIF1 est une protéine hétérodimérique composée de deux sous-unités distinctes : HIF-1α et HIF-1β. L'expression d'HIF-1α est stabilisée dans des conditions hypoxiques, contrairement à HIF-1β qui est constitutivement exprimé (Wang and Semenza, 1995). Quand HIF-1α et HIF-1β se dimérisent, ils forment un facteur de transcription qui lie et active les promoteurs de gènes impliqués dans la glycolyse (Wang et al., 1995). Selon des études plus récentes, l'activité de HIF-1α semble être finement régulée par d'autres mécanismes que l'hypoxie et que HIF-1α régule plusieurs voies métaboliques en parallèle (Ito and Suda, 2014).

Dans des conditions normoxiques, le niveau d'expression de HIF-1 diminue car la présence d'oxygène induit la dégradation de HIF-1α. Mécanistiquement, PHD1, PHD2 et PHD3 (Prolyl hydroxylases 1, 2 et 3) sont activées par la présence d'oxygène. Elles transfèrent un groupement hydroxyle sur des résidus proline, situés dans le domaine

impliqué dans la dégradation (domaine ODD) de HIF-1α. Cela permet la reconnaissance de HIF-1α par une ubiquitine ligase, qui va induire la dégradation de HIF-1α. De plus, les PHD sont actives en présence de fer et α-cétoglutarate, ce qui génère du succinate et participe aussi à la dégradation de HIF-1α (**Figure 16**).

Dans des conditions hypoxiques, l'hydroxylation de HIF-1α est inhibée et il n'est plus dégradé. La délétion du gène codant pour HIF-1α dans CSH induit une diminution de la glycolyse et une augmentation du métabolisme mitochondrial. Cela induit une perte du phénotype « souche », ce qui souligne le caractère essentiel de HIF-1α dans la maintenance du phénotype des CSH et du bon fonctionnement de l'hématopoïèse. Il est important de différencier les CSH à long terme (LT-CSH) et les CSH à court terme (ST-CSH). En effet, ces deux sous-populations subissent un niveau d'hypoxie très différent. Cela se traduit notamment par un niveau de division différent. Les LT-CSH semblent se diviser seulement deux fois par an alors que les ST-CSH se divisent une fois par mois (Wilson et al., 2008) (Foudi et al., 2009). Il apparaît évident que l'expression du facteur HIF-1α joue un rôle essentiel dans le maintien du phénotype des CSH mais en particulier pour les LT-CSH. En ce sens, il a été démontré que la délétion de HIF-1α dans les LT-CSH induit une perte importante de la capacité de reconstitution du système hématopoïétique aussi bien chez la souris adulte que chez l'embryon (Takubo et al., 2010) (Imanirad et al., 2014).

Brièvement, d'un point de vue fonctionnel, HIF-1α permet l'expression des enzymes PDK2 et PDK4 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 2 et 4), ce qui inhibe des enzymes PDH et ainsi empêche l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs (**Figure 16**). Cela limite ainsi la respiration mitochondriale. Dans des modèles murins, la délétion des enzymes PDK2 et PDK4 aboutit à un phénotype comparable à la délétion du facteur HIF-1α, soit une augmentation de la respiration mitochondriale aboutissant à une perte du phénotype « souche » (Takubo et al., 2013). Ces résultats suggèrent que la quiescence des CSH dans la niche hypoxique est dépendante d'un programme métabolique dont HIF-1α est l'acteur central. Il limite l'utilisation du pyruvate par le cycle de Krebs et ainsi favorise la glycolyse anaérobie comme source d'énergie par les CSH. Il est important de souligner que les CSH expriment différents membres de la famille des facteurs HIF. Même si HIF-1α est celui qui domine la régulation de l'homéostasie de l'oxygène dans les cellules, HIF-2α y participe aussi (Simon et al., 2008). Outre la régulation du métabolisme de l'oxygène, HIF-2α est impliqué dans la protection des CSH, des progéniteurs hématopoïétiques et des cellules leucémiques contre l'apoptose induite par un stress du réticulum endoplasmique. Par ailleurs, parmi les gènes cibles d'HIF-1α, certains sont impliqués dans le métabolisme des CSH. Par exemple, *meis1* régule aussi bien la glycolyse que la réponse à un stress oxidatif

dans les CSH, de manière dépendante d'HIF-1α (Simsek et al., 2010). Il a aussi été démontré que la protéine CITED2 (CBP/p300 Interacting Transactivator 2) est essentielle dans la maintenance de la quiescence des CSH via la maintenance du métabolisme glycolytique, à la fois en induisant la transcription d'HIF-1α et en augmentant son activité (Du et al., 2014). De plus, il a été établi que des facteurs extracellulaires, autre que la concentration en oxygène, pouvaient réguler l'activité d'HIF-1α (Miharada et al., 2011). En effet, la protéine CRIPTO et son récepteur membranaire GRP78 (78kDa Glucose-Regulated Protein) ont un rôle clé dans la quiescence des CSH (Miharada et al., 2011). Dans des conditions hypoxiques, HIF-1α induit l'expression de CRIPTO, qui se lie ensuite sur son récepteur GPR78 et stimule le métabolisme glycolytique. Ces résultats soulignent la complexité de la régulation du métabolisme du glucose par le facteur HIF-1α dans les CSH.

La glycolyse anaérobie limite ainsi la production de ROS, préservant ainsi l'intégrité génomique des CSH (Jang and Sharkis, 2007). En effet, dans des conditions normoxiques, la respiration mitochondriale produit des ROS qui sont génotoxiques. De manière intéressante, dans les LT-CSH, les mitochondries présentes sont inactives (Mantel et al., 2010) (Norddahl et al., 2011). De plus, une augmentation des dommages à l'ADN est observée dans les CSH âgées (Beerman et al., 2014). Une concentration excessive en ROS dans les CSH aboutit à une mort par apoptose de ces cellules. Ce processus de mort par apoptose permet de limiter la diffusion des dommages à l'ADN induit par les ROS à l'ensemble des cellules issues des CSH. Cependant, la production de ROS dans les CSH n'est pas que délétère. En effet, la production de ROS dans les CSH est un facteur essentiel pour la prolifération des CSH et des progéniteurs (Lewandowski et al., 2010) (Abdel-Wahab and Levine, 2010). Ces résultats suggèrent un rôle important de la fonction mitochondriale et de la production de ROS associée dans le maintien des CSH. En ce sens, il a été démontré que des mécanismes limitant la biogénèse mitochondriale sont mis en place dans les CSH afin de prévenir la toxicité des ROS. Par exemple, l'expression d'ARNs non-codants issus du locus Dlk1-Glt2, du transporteur mitochondrial homologue 2 et l'inhibition de la voie de signalisation dépendante de mTOR (Oburoglu et al., 2014). De plus, la régulation et la coordination du métabolisme mitochondrial des CSH ont été étudiées en inhibant la respiration mitochondriale grâce à la délétion de PTPMT1 (Protein Tyrosine Phosphatase Mitochondrial 1), une phosphatase mitochondriale « PTEN-like ». Les CSH déficientes en PTPMT1 ne sont plus capables de se différencier et provoque une accumulation de CSH dans la moelle osseuse (Yu et al., 2013) (**Figure 16**). A l'inverse, les conditions qui favorisent la biogénèse mitochondriale et la phosphorylation oxidative permettent la différenciation des CSH. Dans ces conditions, les facteurs de transcription FOXO (Forkhead box protein O) sont impliqués dans la protection des CSH contre les ROS. En effet, ces

facteurs de transcription permettent l'expression des gènes codant pour la superoxide dismutase et les catalases, enzymes impliquées dans l'élimination des ROS. Dans des modèles murins, la délétion des facteurs FOXO1, FOXO3 et FOXO4 induit une augmentation de la concentration des ROS dans les CSH, corrélée à une augmentation de leur prolifération conduisant à leur épuisement (Tothova et al., 2007) (Tsuchiya et al., 2013).

Les mitochondries sont des organelles essentielles dans le métabolisme général des cellules. A la vue des données présentées plus haut, il est facile de comprendre que leur rôle dans les CSH est complexe. Bien que les mitochondries des CSH soient inactives, leur activité est essentielle à la différenciation des CSH en progéniteurs. Cela suggère que les CSH ont besoin d'un métabolisme mitochondrial fiable et robuste afin de pouvoir rapidement se différencier quand le besoin s'en fait ressentir. L'ensemble de ces données suggère que le métabolisme du glucose peut être modifié selon les besoins de l'organisme. Le maintien de la quiescence des CSH et leur auto-renouvellement sont dépendants de la glycolyse anaérobie alors que la différenciation de ces mêmes cellules requiert une phosphorylation oxydative (OXPHOS) active.

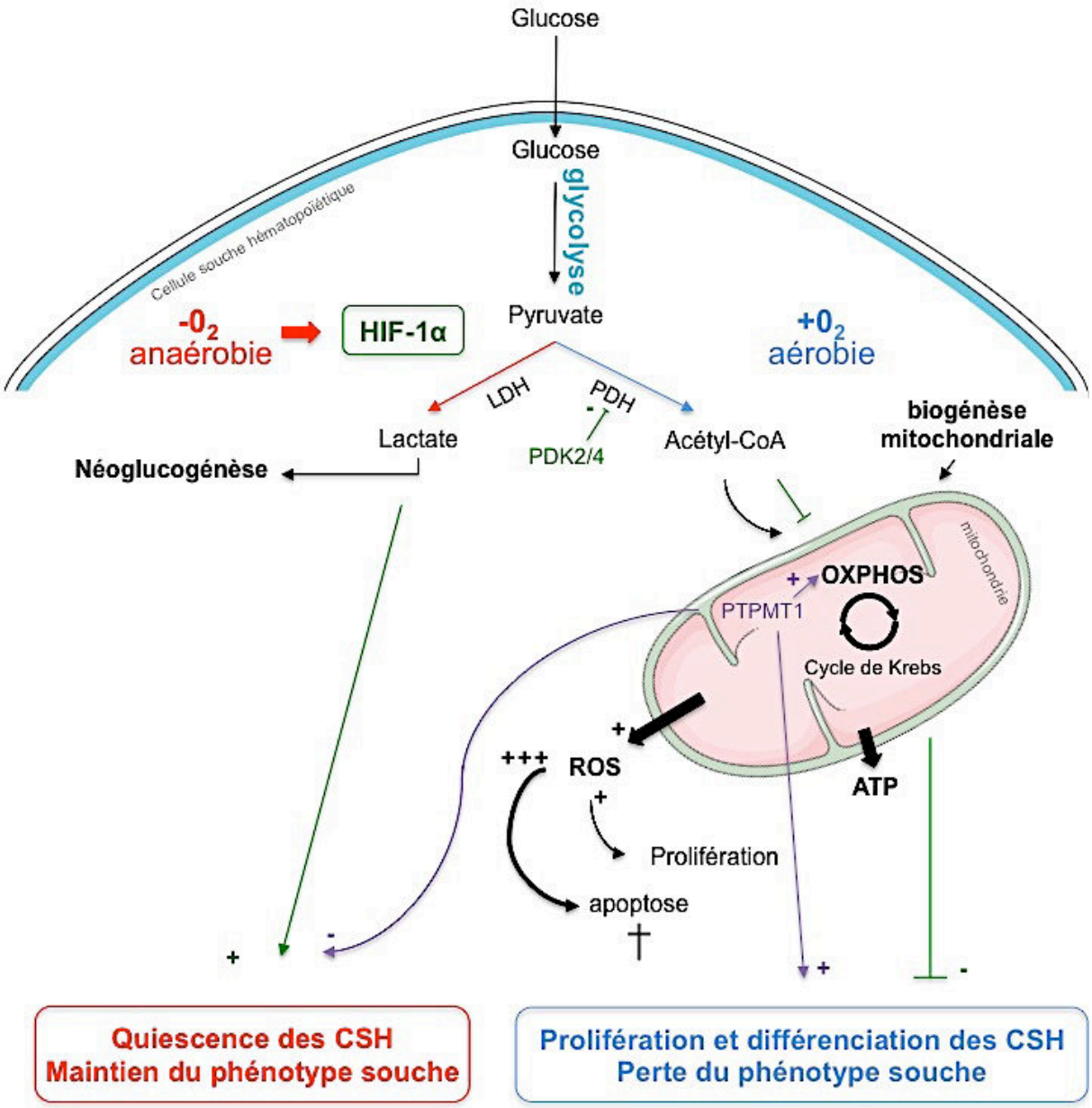


Figure 16 : Régulation des cellules souches hématopoïétiques par le métabolisme du glucose. Le métabolisme du glucose est un acteur clé dans la régulation du phénotype souche. Le facteur HIF-1α est central dans cette régulation. Présent en conditions hypoxiques, il permet le maintien du phénotype souche notamment via l'expression des PDK2/4 (Pyruvate Déshydrogénase Kinase 2 et 4) qui inhibent la PDH (Pyruvate déhydrogénase). Ainsi, cela limite la respiration mitochondriale et permet la dégradation du pyruvate en lactate via l'action de la LDH (Lactate Déshydrogénase). D'autres facteurs jouant sur la fonction de la mitochondrie, tels que la protéine PTPMT1 (Protein Tyrosine Phosphatase Mitochondrial 1) ou la biogénèse mitochondriale, régulent cet équilibre. La respiration mitochondrial ou phosphorylation oxydative (OXPHOS) produit des ROS qui sont nécessaire à la prolifération des CSH mais qui peuvent aussi entraîner leur mort par apoptose.

a-2- La régulation des CSH par le métabolisme des acides aminés

Quand les CSH prolifèrent, la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR est activée, notamment par le glucose et les acides aminés (Figure 17). L'augmentation de l'activité de la PI3K (PhosphoInositide 3-Kinase) induit une augmentation de la concentration en PIP_2 et PIP_3 (phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate et phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphate, respectivement). Cela provoque un changement de conformation de la protéine AKT, ce qui permet de recruter la protéine PDPK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1), impliquée dans l'activation de la protéine AKT. L'activation constitutive d'AKT provoque une augmentation de la prolifération des CSH, ce qui conduit à la déplétion du contenu en CSH (Kharas et al., 2010). Plusieurs études démontrent le rôle essentiel de la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR dans le maintien du phénotype « souche » des CSH (Jacque et al., 2015) (Jewell et al., 2015).

De manière intéressante, la glutaminolyse est une source d'énergie qui permet aux cellules de proliférer. Cela correspond à la déamination de la glutamine en glutamate et ammonium, par l'action de l'enzyme glutaminase, présente dans la mitochondrie. Par la suite, le glutamate est transformé en α-cétoglutarate (α-KG), par une seconde déamination. L'α-KG est un intermédiaire du cycle de Krebs (Figure 17). Ainsi la dégradation de la glutamine par les CSH permet leur prolifération à défaut de participer au maintien de leur nombre et de leur phénotype « souche ». De plus, la glutaminolyse permet aussi la production de molécules comme la glutathione et le NADPH, qui permettent une réduction de la concentration en ROS, limitant ainsi la présence de dommages oxydatifs dans les CSH proliératives. Cette voie métabolique semble essentielle pour les CSH cancéreuses (i.e. CSH présentant une prolifération anarchique). Des données suggèrent que la glutaminolyse est régulée par l'oncogène MYC, qui est notamment impliqué dans l'activation du cycle cellulaire et l'augmentation de métabolisme glycolytique des CSH (Dang et al., 2006). Plus récemment, l'étude de la différenciation des CSH en progéniteurs érythrocytaires a mis en lumière un rôle essentiel de la glutaminolyse. En effet, la délétion du transporteur ASCT2 (Alanine Serine Cysteine-Preferring Transporter 2), exprimé par les CSH et les progéniteurs érythrocytaires et permettant l'entrée de la glutamine dans les CSH, provoque une perte de différenciation vers le compartiment érythrocytaire. Au contraire, les progéniteurs vont alors préférentiellement se diriger vers une différenciation myélomonocytaire (Oburoglu et al., 2014). Ces résultats suggèrent que la glutaminolyse joue un rôle important dans le choix de la voie de différenciation des CSH. Les mécanismes précis qui déterminent le choix des CSH entre ces deux voies de différenciation restent inconnus à ce jour (Figure 17).

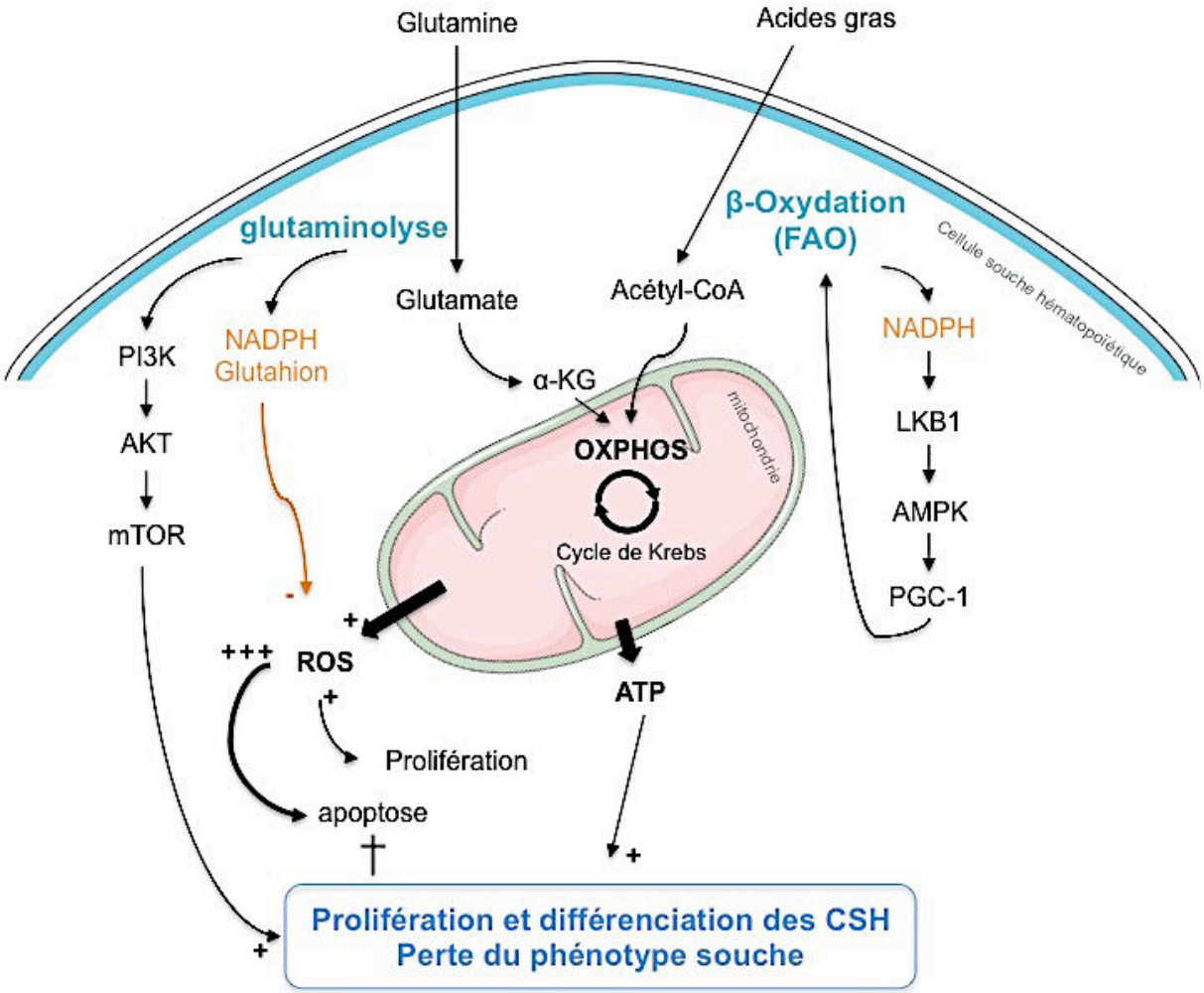


Figure 17 : Régulation des cellules souches hématopoïétiques par le métabolisme des acides aminés et des lipides.

Le **métabolisme des acides aminés** et en particulier de la glutamine joue un rôle essentiel dans la prolifération des cellules souches hématopoïétiques. Dans un premier temps, la dégradation de la glutamine permet la production d'α-KG (alpha-cétoglutarate) qui rentre dans le cycle de Krebs et favorise l'OXPHOS. Dans un second temps, cela permet la production de NADPH et de gluthation qui régule les ROS. Enfin, via l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR, la glutaminolyse stimule la prolifération des CSH.
Le métabolisme des acides gras des CSH permet, via la FAO (Fatty Acid Oxydation), la production acétyl-CoA, qui fait tourner le cycle de Krebs et ainsi permet la prolifération des CSH et leur différenciation.

a-3- La régulation des CSH par le métabolisme des acides gras

Le métabolisme des acides gras est essentiel au bon fonctionnement cellulaire, au tant sur le plan énergétique que structurel. Les lipides sont des constituants essentiels des membranes. La dégradation des lipides *via* la lipolyse ou bien l'absorption intestinale des acides gras alimentaires permet d'avoir une disponibilité en acides gras permanente. L'oxydation des acides gras (FAO pour Fatty Acids Oxidation) ou β-oxydation est la voie de dégradation des acides gras. Cette réaction enzymatique génère ainsi une molécule d'acétyl-CoA à chaque cycle et deux molécules lors du cycle final (**Figure 17**). L'acétyl-CoA rentre alors dans le cycle de Krebs afin de produire de l'ATP. Les acides gras peuvent aussi servir de messagers dans des voies de signalisation.

Comme expliqué dans la partie précédente, le « choix » entre la quiescence et la différenciation des CSH est déterminé par une fine balance entre la glycolyse anaérobie et la phosphorylation oxydative. En revanche, la FAO est capitale dans le choix entre la maintenance des HSC ou leur engagement dans la différenciation. En effet, via des mécanismes qui n'ont pas été totalement décrits, la FAO permet une division asymétrique des CSH, permettant la génération d'une cellule fille qui va se différencier et une cellule fille ayant des capacités d'auto-renouvellement. Lorsque la FAO est inhibée, les CSH se divisent de manière symétrique en deux cellules progénitrices engagées dans la différenciation (Ito et al., 2012) (Yusuf and Scadden, 2012). De manière intéressante, *ex-vivo* et sans modification de la FAO, il a été démontré que les CSH peuvent avoir trois types de division : 1) une division asymétrique, donnant une CSH et une cellule progénitrice 2) une division asymétrique, donnant deux CSH ou 3) une division asymétrique, donnant deux cellules progénitrices, engagées dans la différenciation (Ito et al., 2012). Ces résultats soulignent la complexité de l'impact de la FAO sur les CSH. Malgré l'importance de la FAO dans le maintien du nombre de CSH, les mécanismes ainsi que les acteurs impliqués dans ce processus restent mal compris et nécessitent des études complémentaires. A l'heure actuelle, le maintien des CSH par la FAO est stimulé par la protéine PML (Promyelocytic leukemia protein), qui est un suppresseur de tumeur. La protéine PML permet l'activation de PPARδ, facteur de transcription largement connu pour son rôle dans la FAO. La délétion des acteurs clés dans la FAO, comme PML, PPARδ, ou encore la CPT1 (Carnitine Palmitoyl-Transferase 1, enzyme réalisant la première étape de la FAO) aboutit à la production de progéniteurs, et donc à l'engagement des CSH dans la différenciation.

La FAO permet aussi la production de NADPH, ce qui permet l'expression de la protéine LKB1 (Liver Kinase B1), un suppresseur de tumeur, qui active alors l'AMPK (AMP-

kinase), elle-même responsable de l'activation de PGC-1 (PPARγ coactivator 1), un facteur de transcription impliqué dans l'expression des enzymes de la FAO (Kleiner et al., 2009) (**Figure 17**). En absence de LKB1, les CSH s'engagent dans la différenciation *via* la production de progéniteurs. Ces résultats souligne l'importance de la protéine LKB1 dans le maintien du phénotype « souche » des CSH (Gan et al., 2010) (Gurumurthy et al., 2010) (Nakada et al., 2010) *via* la modulation du métabolisme des lipides.

a-4- La régulation des CSH par le métabolisme du cholestérol

Nous allons maintentant nous intéresser au rôle du métabolisme du cholestérol dans la régulation des CSH (**Figure 18**). Comme décrit dans les cellules myéloïdes, le métabolisme du cholestérol joue un rôle clé dans la régulation des CSH.

Comme décrit précédemment, l'hypercholestérolémie est un facteur de risque indépendant dans le développement de l'athérosclérose. De plus, plusieurs études ont démontré l'impact du rôle du métabolisme cholestérol dans l'activation des CSH (Murphy et al., 2011) (Gao et al., 2014) (Yvan-Charvet et al., 2010b). Tout comme dans les cellules matures, l'homéostasie intracellulaire du cholestérol des CSH est un facteur clé dans la régulation de leur prolifération, de leur activation et dans leur mobilisation. Dans les CSH, les transporteurs clés dans la régulation de l'homéostasie intracellulaire du cholestérol sont les transporteurs ABCA1 et ABCG1, ainsi que le récepteur SR-B1. Bien évidemment, les lipoprotéines circulantes jouent aussi un rôle essentiel dans cette régulation.

En ce sens, dans des modèles murins, l'altération du métabolisme du cholestérol induit une prolifération des CSH, conduisant à une accumulation de leucocytes dans le sang (i.e. leucocytose). En effet, la délétion des transporteurs ABCA1 et ABCG1 provoque une accumulation de cholestérol au niveau de la membrane plasmique des CSH, en particulier au niveau des rafts lipidiques. Cela induit une augmentation de l'expression de la sous-unité β, commune aux récepteurs à l'IL-3 (IL-3Rβ) et au GM-CSF, conduisant à une prolifération anarchique des CSH (Yvan-Charvet et al., 2010b) (**Figure 18**). En effet, les récepteurs se retrouvent dans des rafts lipidiques rigides où l'internalisation devient difficile. Ainsi, les récepteurs restent en surface et donc actifs. En ce sens, il a été démontré qu'un défaut d'efflux de cholestérol dans un modèle murin de déficience en apolipoprotéine E provoque un défaut d'activité de l'E3-ubiquitine ligase, enzyme impliquée dans la dégradation des protéines (dont l'IL-3Rβ et le récepteur au GM-CSF). Cela conduit à une augmentation de l'expression de ces récepteurs, et donc à la prolifération des CSH (Murphy et al., 2011). La

stimulation des CSH par l'IL-3 et le GM-CSF induit d'une part leur prolifération mais aussi leur engagement dans la différenciation myélomonocytaire. Plus récemment, il a été démontré que la délétion du récepteur SR-B1 dans les CSH induit une expansion de ces cellules et leur différenciation en progéniteurs myéloïdes communs et en progéniteurs monocytes-macrophages (Gao et al., 2014). De manière très intéressante, en augmentant la concentration en apolipoprotéine A1 dans ces modèles, il est possible de limiter la prolifération des CSH. L'ensemble de ces données suggère l'importance de l'homéostasie du cholestérol dans la biologie des CSH.

Outre l'impact du métabolisme du cholestérol sur la prolifération des CSH, il intervient également dans la mobilisation des CSH depuis la moelle osseuse vers la circulation sanguine. Comme décrit plus haut, les CSH interagissent avec de nombreux types cellulaires dans la niche hématopoïétique, notamment via l'interaction entre les intégrines et l'axe CXCR4/SDF-1. Il a été démontré que l'hypercholestérolémie altère le gradient de SDF-1 entre le sang et la moelle osseuse, ce qui conduit à la mobilisation des CSH, soit à leur sortie de la moelle osseuse (Gomes et al., 2010). De plus, en ce sens, il a aussi été prouvé qu'une altération de l'efflux de cholestérol par la délétion des transporteurs ABCA1 et ABCG1, dans un modèle murin hypercholestérolémique, induit une mobilisation des CSH. Ceci est expliqué par une augmentation de la production des cytokines IL-23, IL-17 et G-CSH par les macrophages et les cellules dendritiques de la rate (Westerterp et al., 2012). Cela favorise le recrutement des cellules souches hématopoïétiques dans le sang. De plus, cette étude démontre aussi le rôle indirect de l'hypercholestérolémie dans la modification du microenvironnement de la niche hématopoïétique. Plus précisément, l'hypercholestérolémie induit une diminution du nombre d'ostéoblastes exprimant la N-cadhérine, et du nombre de cellules souches mésenchymateuses, exprimant la nestine. Ces deux types cellulaires étant la source principale de SDF-1, la concentration en SDF-1 est elle aussi réduite. Cela participe aussi largement à la mobilisation des CSH de la moelle osseuse vers le sang. Plus récemment, il a aussi été démontré qu'en condition hypercholestérolémique, les CSH expriment plus l'intégrine β_2, ce qui est corrélé à une augmentation de leur recrutement au sein des sites lésionnels (Wang et al., 2015).

Pour terminer, le métabolisme des HDL et de sa lipoprotéine constitutive, l'apolipoprotéine A1 (apoA1) est inversement corrélé au développement des maladies cardiovasculaires. Cela s'explique par plusieurs mécanismes. Premièrement les HDL sont largement impliquées dans l'efflux du cholestérol via les récepteurs ABCA1 et ABCG1, processus à l'origine du retour inverse du cholestérol (Rosenson et al., 2012). Deuxièmement, les HDL jouent un rôle dans la maintenance de l'intégrité de l'endothélium

(Kratzer et al., 2014). Troisièmement, les HDL présentent des propriétés anti-inflammatoires (Khan et al., 2015) (Patel et al., 2009). *In vitro*, les CSH mises en présence de HDL permet le maintien de leur quiescence, qui à terme limite la production de cellules myéloïdes (Tolani et al., 2013). De même, *in vivo*, l'augmentation de la concentration plasmatique régule la prolifération des CSH, tout en limitant l'inflammation (Murphy et al., 2011) (Gao et al., 2014). Ces résultats soulignent l'importance des voies d'efflux du cholestérol dans l'homéostasie des CSH (**Figure 18**).

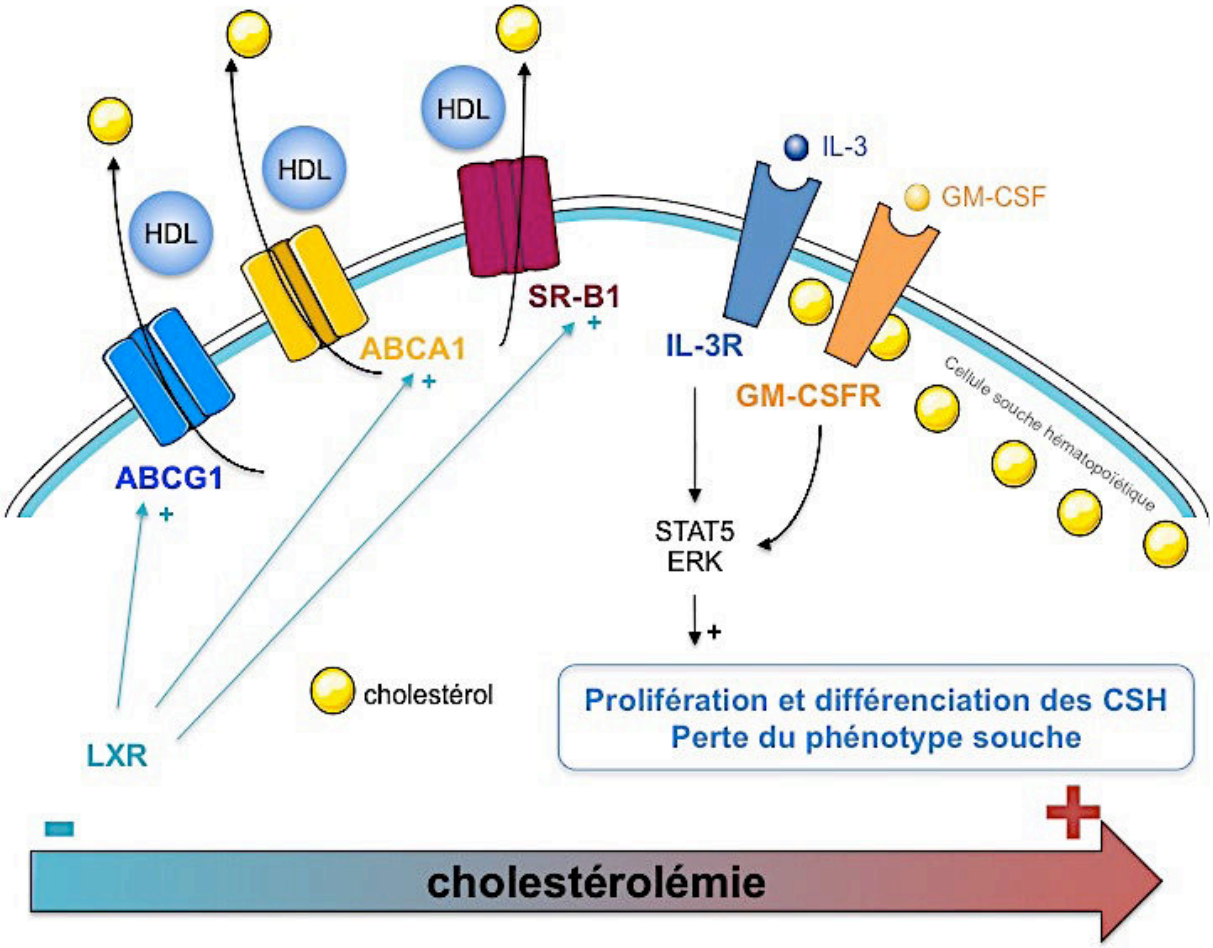


Figure 18 : Régulation des cellules souches hématopoïétiques par le métabolisme du cholestérol. En conditions normocholestérolémiques, les CSH effluent normalement le cholestérol via ABCA1, ABCG1 et SR-B1, cela limite son accumulation et la prolifération des CSH. En revanche, lors d'une hypercholestérolémie, les CSH accumulent du cholestérol car le système d'efflux est défaillant. Cela provoque une augmentation de l'expression du récepteur à l'IL-3 (IL-3R) et au GM-CSF (GM-CSFR), permettant une augmentation de la prolifération des CSH.

Résultats

Papier 1 : Disruption of Glut-1 in hematopoietic stem cells prevents myelopoiesis and enhanced glucose flux in atheromatous plaques of ApoE-/- mice. ***Circulation Research 2016***

Papier 2 : Lysosomal cholesterol hydrolysis couples efferocytosis to anti-inflammatory oxysterol production. ***Circulation Research 2018***

Projet 3 : Caractérisation de nouvelles mutations somatiques du gène ABCA1 dans la leucémie myélomonocytaire chronique : lien entre le métabolisme du cholestérol et la production de cellules myéloïdes.

Annexe 1 : Maintenance of Macrophage Redox Status by ChREBP Limits Inflammation and Apoptosis and Protects against Advanced Atherosclerotic Lesion Formation. ***Cell Reports 2015***

Papier 1

« Disruption of Glut-1 in hematopoietic stem cells prevents myelopoiesis and enhanced glucose flux in atheromatous plaques of ApoE$^{-/-}$ mice »

Comme nous avons pu le décrire dans l'introduction de cette thèse, l'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique, principalement dirigée par l'hypercholestérolémie. Cette pathologie est initiée par un dépôt de lipoprotéines riche en cholestérol au sein des vaisseaux, ce qui permet le recrutement des monocytes et des macrophages. Le lien entre athérosclérose et l'hypercholestérolémie est donc connu depuis des années. Plus récemment, il a aussi été établi que le défaut d'efflux du cholestérol induisait une augmentation du nombre de monocyte dans le sang, soit une monocytose. La monocytose participe directement à la formation des plaques d'athérosclérose en augmentant le nombre de cellules qui y sont recrutées. De plus, il a été démontré que le nombre de monocytes sanguin était un facteur de risque indépendant. La production de monocytes par le système hématopoïétique apparaît donc comme un processus clé dans le développement de la pathologie athéromateuse.

Par l'utilisation d'un analogue du glucose non métabolisable radiomarqué couplé à une analyse tomographique, les plaques d'athérosclérose ont été visualisées, suggérant un rôle local du métabolisme du glucose au sein de la plaque d'athérosclérose. De manière très intéressante, cette technique a aussi mis en évidence une augmentation du flux de glucose au niveau de la moelle osseuse hématopoïétique ainsi que dans la rate. Ces résultats suggèrent un rôle central de l'hématopoïèse, aussi bien médullaire dans la moelle osseuse qu'extra-médullaire dans la rate. Bien que ces observations soient remarquables, elles n'élucident pas les mécanismes sous-jacents impliqués.

Afin de mieux comprendre la relation entre une augmentation du flux de glucose dans les compartiments hématopoïétiques, la prolifération des cellules souches à l'origine de la monocytose et le développement des lésions d'athérosclérose, la première partie de mon travail de thèse s'est intéressée au rôle du transporteur Glut-1 dans le compartiment hématopoïétique dans un modèle murin d'athérosclérose.

Dans un premier temps, nous avons démontré que des souris déficientes pour l'ApoE dans le compartiment hématopoïétiques présentaient une augmentation de l'activité glycolytique au niveau de l'arche aortique, de la moelle osseuse et de la rate. Ce résultat est corrélé à une augmentation de l'expression du transporteur Glut-1 dans les cellules souches

hématopoïétiques (CSH). Nous avons mis en évidence que cela été du à une augmentation de la voie de signalisation Ras en aval du récepteur au GM-CSF et à l'IL-3, qui stimule alors l'utilisation des substrats de la glycolyse par la mitochondrie.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé des transplantations de moelle osseuse déficiente seulement pour Glut-1 (moelle Glut1$^{+/-}$) ou combiné à la déficience pour ApoE (moelle Glut1$^{+/-}$ ApoE$^{-/-}$) dans des souris ApoE$^{-/-}$. De manière intéressante, nous montrons que les souris ApoE$^{-/-}$ ayant reçu de la moelle osseuse Glut1$^{+/-}$ ApoE$^{-/-}$ présentent une prolifération des CSH réduite, une expansion limitée et donc en conséquence une monocytose réduite. Cela induit une réduction de la taille des plaques d'athérosclérose.

Ainsi, nous démontrons que Glut-1 est au centre de la régulation du flux de glucose au niveau des plaques d'athérosclérose, notamment via la régulation de la production de monocytes (myélopoïèse) et que cela reflète le nombre de macrophages dans la plaque. En effet, nous mettons en évidence que la régulation des CSH ainsi que leur engagement dans la différenciation monocytaire est dépendante de Glut-1.

Disruption of Glut1 in Hematopoietic Stem Cells Prevents Myelopoiesis and Enhanced Glucose Flux in Atheromatous Plaques of *ApoE*$^{-/-}$ Mice

Vincent Sarrazy,* Manon Viaud,* Marit Westerterp, Stoyan Ivanov, Sophie Giorgetti-Peraldi, Rodolphe Guinamard, Emmanuel L. Gautier, Edward B. Thorp, Darryl C. De Vivo, Laurent Yvan-Charvet

Rationale: **Inflamed atherosclerotic plaques can be visualized by noninvasive positron emission and computed tomographic imaging with ^{18}F-fluorodeoxyglucose, a glucose analog, but the underlying mechanisms are poorly understood.**

Objective: **Here, we directly investigated the role of Glut1-mediated glucose uptake in apolipoprotein E–deficient (*ApoE*$^{-/-}$) mouse model of atherosclerosis.**

Methods and Results: **We first showed that the enhanced glycolytic flux in atheromatous plaques of *ApoE*$^{-/-}$ mice was associated with the enhanced metabolic activity of hematopoietic stem and multipotential progenitor cells and higher Glut1 expression in these cells. Mechanistically, the regulation of Glut1 in *ApoE*$^{-/-}$ hematopoietic stem and multipotential progenitor cells was not because of alterations in hypoxia-inducible factor 1α signaling or the oxygenation status of the bone marrow but was the consequence of the activation of the common β subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/interleukin-3 receptor driving glycolytic substrate utilization by mitochondria. By transplanting bone marrow from WT, *Glut1*$^{+/-}$, *ApoE*$^{-/-}$, and *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ mice into hypercholesterolemic ApoE-deficient mice, we found that Glut1 deficiency reversed *ApoE*$^{-/-}$ hematopoietic stem and multipotential progenitor cell proliferation and expansion, which prevented the myelopoiesis and accelerated atherosclerosis of *ApoE*$^{-/-}$ mice transplanted with *ApoE*$^{-/-}$ bone marrow and resulted in reduced glucose uptake in the spleen and aortic arch of these mice.**

Conclusions: **We identified that Glut1 connects the enhanced glucose uptake in atheromatous plaques of *ApoE*$^{-/-}$ mice with their myelopoiesis through regulation of hematopoietic stem and multipotential progenitor cell maintenance and myelomonocytic fate and suggests Glut1 as potential drug target for atherosclerosis.**

***(Circ Res*. 2016;118:1062-1077. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307599.)**

Key Words: atherosclerosis ■ bone marrow ■ cholesterol ■ glucose transporter type 1 ■ glycolysis ■ myeloid cells

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

Atherosclerosis is a chronic, hypercholesterolemia-driven inflammatory disease that is initiated by the deposition of cholesterol-rich lipoproteins in the artery wall, leading to monocyte–macrophage recruitment. Hypercholesterolemia and defective cholesterol efflux have also been documented to induce myelopoiesis, which contributes to atherosclerotic lesion formation by fueling plaques with monocytes and neutrophils.[1,2] The monocyte count, in particular, independently predicts risk for coronary artery disease after adjustment for conventional risk factors.[3,4]

In This Issue, see p 1041

Hematopoietic stem cells (HSCs) are quiescent in the bone marrow (BM) niche and are the source of all hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) and differentiated cells that are critical for the maintenance and replenishment of peripheral leukocytes in adult life, particularly during emergency hematopoiesis. However, we and others have recently shown that chronic cholesterol accumulation in HSPCs because of hypercholesterolemia and defective apolipoprotein (Apo)-mediated

Original received September 10, 2015; revision received February 25, 2016; accepted February 29, 2016. In January 2016, the average time from submission to first decision for all original research papers submitted to *Circulation Research* was 14.92 days.

From the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Nice, France (V.S., M.V., S.I., S.G.-P., R.G., L.Y.-C.); Division of Molecular Medicine, Department of Medicine (M.W.) and Department of Neurology (D.C.D.V.), Columbia University, New York, NY; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR_S 1166, Hôpital de la Pitié, Paris, France (E.L.G.); Pierre & Marie Curie University, Université Paris 06, Paris, France (E.L.G.); Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Boulevard de l'Hôpital, Paris, France (E.L.G.); and Department of Pathology, Northwestern University, Feinberg School of Medicine, Chicago, IL (E.B.T.).

*These authors contributed equally to this study.

The online-only Data Supplement is available with this article at http://circres.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307599/-/DC1.

Correspondence to Laurent Yvan-Charvet, PhD, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Atip-Avenir, 06204 Nice, France. E-mail laurent.yvancharvet@unice.fr

© 2016 American Heart Association, Inc.

Nonstandard Abbreviations and Acronyms	
2-NBDG	2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-D-glucose
ApoE	apolipoprotein E
BM	bone marrow
CMP	common myeloid progenitors
Flt3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
Glut1	glucose transporter type 1
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GMP	granulocyte-macrophage progenitors
HIF-1α	hypoxia-inducible factor-1α
HSCs	hematopoietic stem cells
HSPCs	hematopoietic stem and progenitor cells
LT-HSC	long-term hematopoietic stem cells
MMP	mitochondrial membrane potential
WT	wild-type

cholesterol efflux promotes pathogenic HSPC expansion and proliferation leading to uncontrolled myelopoiesis.[5–8] For instance, in the *ApoE*$^{-/-}$ mouse model of atherosclerosis, the progressive HSPC expansion that drives myelopoiesis[6] contributed to provide the inflamed atherosclerotic lesions with neutrophils and monocytes.[9–11] Although recent research has focused on elucidating the roles of cytokines and the microenvironment in the proliferation, mobilization, and commitment of HSPCs in preclinical model of atherosclerosis,[1,2] the cellular metabolic pathways that regulate these processes remain unknown.

Lessons from various mutant mice displaying a wide range of bioenergetic defects in vivo have pointed to a central role for the mitochondrial energy metabolism in HSC stemness.[12–17] Mounting evidence also suggests that HSC quiescence requires a hypoxic environment[18,19] to maintain glycolysis-biased metabolic activity instead of mitochondrial oxidative phosphorylation.[20,21] By limiting mitochondrial respiration and ATP production, this could indeed prevent HSCs from producing reactive oxygen species to avoid their differentiation and exhaustion.[22–24] In contrast, funneling glucose to the mitochondria for Krebs cycle utilization is required when the HSCs become proliferative or undergo differentiation, most likely because of the high energy demand of these cellular processes.[21,25] More recently, Oburoglu et al[26] have also reported that glucose utilization can dictate the myeloid lineage commitment in human HSCs. Intriguingly, increased hematopoietic metabolic activity can be visualized by noninvasive positron emission and computed tomographic imaging with ^{18}F-fluorodeoxyglucose, a glucose analog, not only in inflamed atherosclerotic plaques[27–30] but also in the spleen of patients with cardiovascular diseases,[31,32] reflecting most likely an extramedullary hematopoiesis.[33] However, the relevance of these observations as well as the underlying mechanisms are not fully understood.

In an attempt to better understand the relation between the enhanced hematopoietic glycolytic activity, HSPC proliferation, myelopoiesis, and the development of atherosclerotic lesions, we first showed that an enhanced hematopoietic glycolytic activity in the aortic arch, the BM, and the spleen of *ApoE*$^{-/-}$ BM-transplanted mice was associated with an enhanced glucose transporter type 1 (Glut1) expression in *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs. Mechanistic studies showed that the upregulation of Glut1 in *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs was not because of an alteration of the oxygenation status of the BM niche but rather was dependent on Ras signaling downstream of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)/interleukin-3 (IL-3) receptor driving glycolytic substrate utilization by mitochondria. Finally, we performed BM transplantation from mice with single or combined deficiencies of ApoE or the glucose transporter Glut1 into *ApoE*$^{-/-}$ mice. Consistent with our hypothesis, *ApoE*$^{-/-}$ mice that had received *ApoE*$^{-/-}$*Glut*$^{+/-}$ BM showed reduced HSPC proliferation and expansion, myelopoiesis, and atherogenesis compared with mice that had received *ApoE*$^{-/-}$ BM. Thus, we proposed a causal relation between the enhanced hematopoietic glycolytic activity in *ApoE*$^{-/-}$ mice and their myelopoiesis through regulation of HSPC expansion and fate, offering novel therapeutic perspectives.

Methods

Materials and additional methods are available in Online Data Supplement.

Mice and Treatments

Glut1$^{+/-}$ mice (kindly provided by Dr De Vivo, Columbia University) have been crossed to C57BL/6J for >12 generations within our colony. *ApoE*$^{-/-}$ (B6.129P2-*ApoE*$^{tm1Unc/J}$), Mx1-cre (B6.Cg-Tg[*Mx1-cre*]$^{1Cgn/J}$), and hypoxia-inducible factor-1α (*HIF1α*$^{fl/fl}$; B6.129-*HIF1α*$^{tm1Kats/J}$) mice on a C57BL/6J background were obtained from the Jackson Laboratory. *ApoE*$^{-/-}$ (B6.129P2-*ApoE*$^{tm1Unc/J}$) mice expressing Ly5.1 cyclodextrin (CD45.2) were crossed to wild-type (WT) mice expressing Ly5.2 (CD45.1) to generate *ApoE*$^{-/-}$ mice expressing Ly5.2 (CD45.1). For each experiment, littermate controls were generated. For the neutralizing antibody experiment, WT and *ApoE*$^{-/-}$ mice were intravenously injected with IgG control or IL-3Rβ AF549 antibody (R&D systems). Animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the French Ministry of Higher Education and Research and the Mediterranean Center of Molecular Medicine (Inserm U1065) and the were undertaken in accordance with the European Guidelines for Care and Use of Experimental Animals. Animals had free access to food and water and were housed in a controlled environment with a 12-hour light–dark cycle and constant temperature (22°C).

BM Transplantation

BM transplantation was performed as previously described,[5] using BM from 12- to 14-week–old WT, *Glut1*$^{+/-}$, *ApoE*$^{-/-}$, and *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/}$ littermates with no significant variation in peripheral leukocyte counts (WT, 6.1±0.5×10^6/mL; *Glut1*$^{+/-}$ 5.6±0.6×10^6/mL; *ApoE*$^{-/-}$ 7.1±0.6×10^6/mL; *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ 6.7±0.5×10^6/mL) or BM leukocyte counts (WT, 76±12×10^6; *Glut1*$^{+/-}$ 75±11×10^6; *ApoE*$^{-/-}$ 94±21×10^6; *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ 88±16×10^6). Briefly, studies were conducted in 12-week–old female *ApoE*$^{-/-}$ mice fed with a Western type diet (TD88137) from Harlan Teklad (Madison, WI) for 12 weeks. Mice were allowed to recover for 5 weeks after irradiation and BM transplantation before diet studies were initiated. Body weight was recorded at indicated time points. Mice were euthanized in accordance with the American Veterinary Association Panel of Euthanasia. Spleen weights were determined at the time of euthanasia.

Flow Cytometry Analysis

Blood Leukocytes

For identification of peripheral blood leukocytes, 100 µL of blood was collected into EDTA tubes before red blood cell lysis (BD Pharm Lyse; BD Biosciences), filtration, and staining for 30 minutes on ice. Cells were stained with a cocktail of antibodies against CD45, Ly6C/G, CD115, B220, TCR-β, and CD8 as previously described.[5] Briefly, monocytes were identified as CD45$^+$CD115$^+$,

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

neutrophils as CD45$^+$CD115$^-$Ly6C/G^{hi}, B-lymphocytes as CD45$^+$B220$^+$, T-lymphocytes as CD45$^+$TCR-β$^+$ and further subdivided into CD4$^+$, CD8$^+$, and CD8$^+$Ly6C/G$^+$ subsets.

BM HSPCs

BM cells were collected from leg bones, lysed to remove red blood cells, and filtered before use. Freshly isolated BM cells were stained with the appropriate antibodies for 30 minutes on ice. For hematopoietic subsets, the following lineage antibodies were used: a cocktail of antibodies to lineage committed cells (CD45R, CD19, CD11b, CD3e, Ter-119, CD2, CD4, CD8, and Ly6C/G) and the following stem cell markers: c-Kit, Sca-1, FMS-like tyrosine kinase 3 ligand (Flt3, also known as CD135), CD150 (Slamf1), CD34, and FcgRII/III as previously described.[5] Briefly, HSPCs were identified as lin$^-$Sca1$^+$c-Kit$^+$ (LSKs) and HSPC subsets were identified from the most quiescent as long-term (LT)-HSC (CD34$^-$CD150$^+$Flt3$^-$) to the most cycling as short-term–HSC (CD34$^+$CD150$^+$Flt3$^-$) and multipotential progenitors (CD34$^+$CD150$^-$Flt3$^-$ > CD34$^+$CD150$^-$Flt3$^+$). Hematopoietic progenitor cells were identified as common myeloid progenitors (CMP, Lin$^-$Sca1$^-$c-Kit$^+$CD34^{int}FCgRII/III^{int}), granulocyte-macrophage progenitors (GMP, Lin$^-$Sca1$^-$c-Kit$^+$CD34^{int}FCgRII/III^{hi}), and megakaryocyte–erythrocyte progenitors (Lin$^-$Sca1$^-$c-Kit$^+$CD34^{lo}FCgRII/III^{lo}). For DNA content analysis, HSPC-stained BM cells were fixed in 1% paraformaldehyde in PBS, washed, and stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (5 µg/mL; Molecular Probes). Cell surface expression of Glut1 was quantified using Glut1 FAB1418 antibody from R&D systems or Glut1 receptor binding domain ligand (Metafora Biosystems). To assess the uptake of 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG), prestained cells were incubated with 10 µmol/L 2-NBDG (invitrogen) for 30 minutes as previously described.[34] The mitochondrial membrane potential (MMP) and reactive oxygen species production were analyzed with 25 nmol/L fluorescent tetramethylrhodamine ethyl ester (AnaSpec) and 5 µm CM-H2DCFDA stainings for 30 minutes on prestained BM cells. In addition, autophagy was monitored in live cells using Cyto-ID autophagy detection kit (Enzo Life Sciences, Lyon, France) according to manufacturer instructions. Viable cells, gated by light scatter or exclusion of CD45$^-$ cells, were analyzed on a 4-laser BD Canto cell analyzer or sorted on a BD FACSAria Cell Sorter both running with DiVa software (BD Biosciences). Data were analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc).

Statistical Analysis

Data are shown as mean±SEM. Statistical significance was performed using Prism *t* test or ANOVA according to the data set. Results were considered as statistically significant when $P<0.05$.

Results

Enhanced Glucose Uptake in Atheromatous Plaques Under Hypercholesterolemic Conditions Correlates With Higher Metabolic Activity of Hematopoietic Cells and Is Associated With Higher Glut1 Expression in HSPCs

To monitor the metabolic activity of hematopoietic cells, we first investigated the uptake of the radiolabeled D-glucose analog 2-deoxy [^{14}C] glucose in organs isolated from irradiated *ApoE*$^{-/-}$-recipient mice transplanted with either WT or *ApoE*$^{-/-}$ BM. A >2-fold increase in 2-deoxy [^{14}C] glucose uptake was observed not only in the aortic arch of *ApoE*$^{-/-}$ BM-transplanted mice compared with controls but also in their BM and spleen (Figure 1A). A ≈3.5-fold increase in 2-deoxy [^{14}C] glucose uptake was also consistently observed in colony forming unit assays with the multipotential progenitors and GMP from the *ApoE*$^{-/-}$ mice (Figure 1B). The oxygen consumption was 1.3-fold higher in *ApoE*$^{-/-}$ lineage marker-positive (Lin$^+$), *ApoE*$^{-/-}$ Lin$^-$ BM cells, and Lin$^-$Sca1$^+$ progenitors; these cell types represent mature leukocytes or a mix of HSPCs, respectively (Figure 1C). The higher oxygen consumption seen in *ApoE*$^{-/-}$ cells was most likely maintained by mitochondrial oxygen consumption because treatment with oligomycin, which inhibits mitochondrial ATP synthase, clearly suppressed their respiration (Figure 1D). Quantification of the citric acid metabolites by liquid chromatography–mass spectometry showed higher citrate, fumarate, and malate but not succinate in *ApoE*$^{-/-}$ leukocytes (Figure 1E). This was associated with a 1.7-fold increase in succinate dehydrogenase activity in *ApoE*$^{-/-}$ leukocytes (WT, 13.7±1.9 versus *ApoE*$^{-/-}$, 24.2±4.1 ΔOD/min per mg protein, respectively). Consistent with these findings, a ≈1.3-fold increase in the MMP was observed in *ApoE*$^{-/-}$ Lineage marker-positive (Lin$^+$) and Lin$^-$ BM cells by flow cytometry using a fluorescent tetramethylrhodamine ethyl ester dye (Figure 1F). An analysis of the different populations within the HSPCs showed that the mitochondrial potential of the CD34$^-$ LT-HSCs and CD34$^+$ HSPCs[35,36] was increased to the same extent as the Lin$^-$ BM cells in the *ApoE*$^{-/-}$ mice (Figure 1F). This was associated with an increase in reactive oxygen species staining in these cells (data not shown). To test whether this phenotype was caused by modulation of the glycolytic pathway in HSPCs, we next used the fluorescent D-glucose analog, 2-NBDG, as a tool to examine the glucose uptake in these cells.[34] The NBDG staining was increased by ≈1.5-fold in the *ApoE*$^{-/-}$ Lin$^+$ and Lin$^-$ BM cells and CD34$^+$ HSPCs, but not in the more primitive fractions of the CD34$^-$ LT-HSCs (Figure 1G). We next assessed the cell surface expression of the glucose transporter 1 (Glut1) in these cells by flow cytometry. A ≈1.25-fold increase in the Glut1 cell surface expression was observed in the *ApoE*$^{-/-}$ Lin$^+$ and Lin$^-$ BM cells and CD34$^+$ HSPCs, but not CD34$^-$ LT-HSCs (Figure 1H). This was similar to the NBDG pattern. Together, these observations suggest that the enhanced Glut1 expression and associated glycolytic activity in organs from *ApoE*$^{-/-}$ BM-transplanted mice could reflect the metabolic state not only of leukocytes but also of HSPCs.

HIF-1α Is Neither Involved in the Upregulation of Glut1 in ApoE$^{-/-}$ HSPCs nor in the Enhanced Myelopoiesis of ApoE$^{-/-}$ Mice

We next set out to better understand the mechanism leading to Glut1 regulation in the *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs. Studies have proposed that the HIF-1α upregulates Glut1,[37] and HIF-1α contributes to HSPC homeostasis.[18,20] We first assessed the hypoxic state of the BM cells isolated from irradiated *ApoE*$^{-/-}$-recipient mice transplanted with either WT or *ApoE*$^{-/-}$ BM by flow cytometry with a fluorescein-conjugated anti-pimonidazole antibody at 90 minutes after intravenous pimonidazole administration. We did not observe significant changes in pimonidazole staining in either the *ApoE*$^{-/-}$ Lin$^+$ and Lin$^-$ BM cells or CD34$^+$ HSPCs and CD34$^-$ LT-HSCs (Online Figure IA). HIF-1α protein was also barely detectable in WT and *ApoE*$^{-/-}$ BM cell lysates under normoxic culture conditions, and cell lysates from *ApoE*$^{-/-}$ BM cells showed amounts of HIF-1α protein similar to those of WT cells under hypoxia (Online Figure IB). Even though, the increase in lactate dehydrogenase A mRNA expression, a HIF-1α target gene, on hypoxia was similar between WT and *ApoE*$^{-/-}$ BM cultures,

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

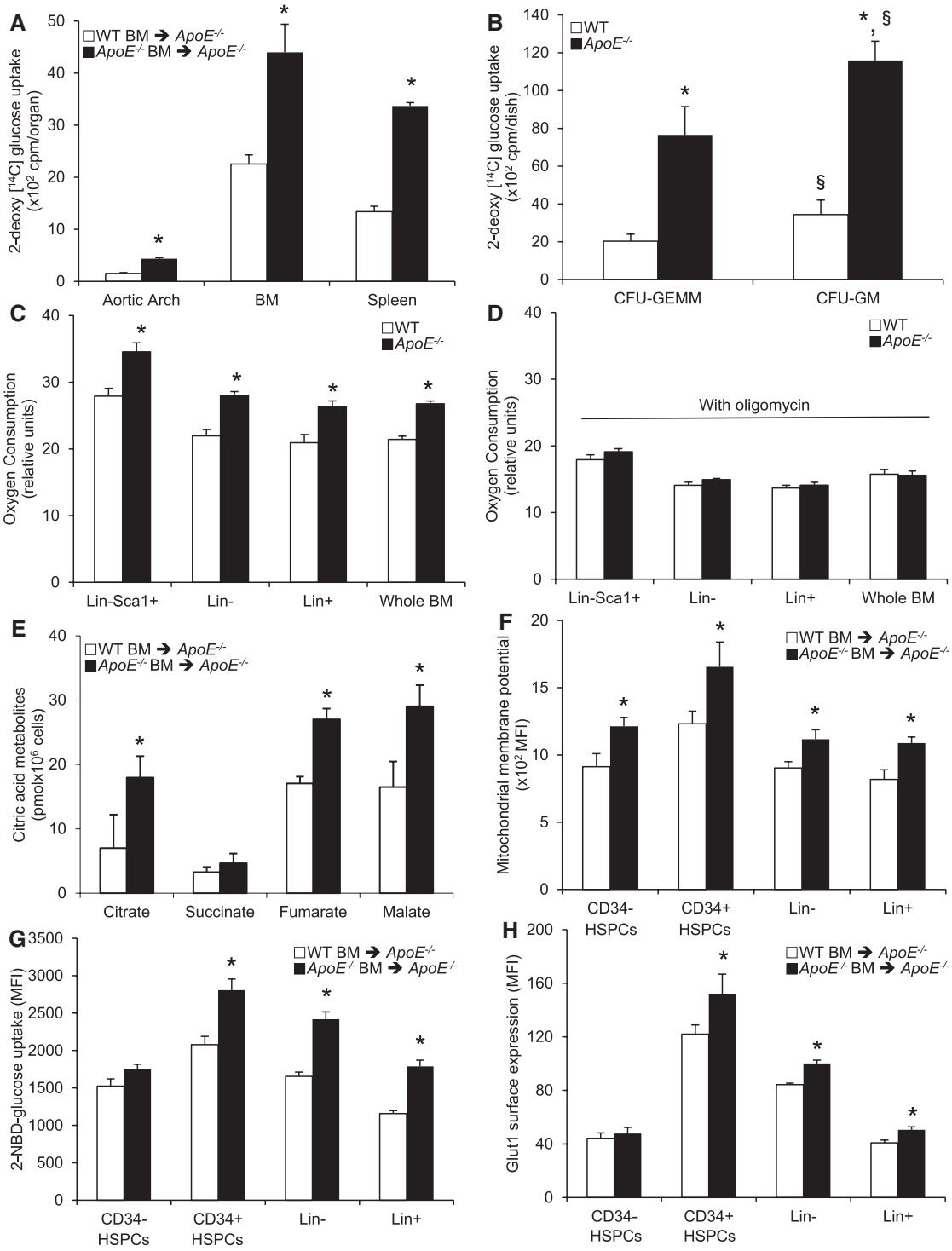


Figure 1. Enhanced glucose utilization in the aortic arch, splenocytes, bone marrow (BM), and hematopoietic stem and multipotential progenitor cells (HSPCs) of *ApoE*$^{-/-}$ BM chimeras. A, 2-deoxy-[^{14}C]-glucose uptake in aortic arch, BM, and spleen of *ApoE*$^{-/-}$ recipients transplanted with wild-type (WT) or *ApoE*$^{-/-}$ BM at 12 weeks after the transplantation procedure. **B**, 2-deoxy-[^{14}C]-glucose uptake was also determined in colony forming unit assays of multipotential progenitors (CFU-GEMM) and granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) from the BM of WT and *ApoE*$^{-/-}$ mice. **C**, Oxygen consumption of whole BM cells, lineage marker (Lin)$^{+}$, Lin^{-} BM cells, and Lin^{-}Sca1^{+} progenitors isolated from the BM of WT and *ApoE*$^{-/-}$ mice in absence or (**D**) in presence of oligomycin treatment. **E**, The citric acid metabolites were determined by liquid chromatography–mass spectometry in BM cells isolated from *ApoE*$^{-/-}$ recipients transplanted with WT or *ApoE*$^{-/-}$ BM at 12 weeks after the transplantation procedure. **F**, The mitochondrial membrane potential was measured by flow cytometry using a fluorescent tetramethylrhodamine ethyl ester dye in Lin^{-}, Lin^{+}, and CD34^{-} or CD34^{+} HSPCs isolated from the BM of these mice. **G**, NBD-glucose binding and uptake and (**H**) cell surface expression of Glut1 were also quantified in these cells. All results are the means±SEM and are representative of at least 1 experiment performed with 6 to 10 animals per group; *P<0.05 vs WT. §P<0.05 vs the untreated condition.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

Glut1 gene expression was higher under both normoxic and hypoxic culture conditions in *ApoE*$^{-/-}$ BM cultures (Online Figure IC). Thus, to directly test the contribution of HIF-1α in the regulation of Glut1-dependent glucose metabolism in *ApoE*$^{-/-}$ HSPC in vivo, we next generated an inducible, hematopoietic-specific HIF-1α knockout (Mx1-cre *HIF1α*$^{fl/fl}$) on a WT or *ApoE*$^{-/-}$ background. The BM from these mice was transplanted into irradiated *ApoE*$^{-/-}$ mice and after a recovery period, the recipients were fed with a high-fat diet for 12 weeks to exacerbate their HSPC expansion (Figure 2A).[6] HIF-1α was deleted from hematopoietic cells before the start of the diet by sequential polyI:polyIC injections, which efficiently excised the HIF-1α gene from the BM cells (Figure 2B and 2C). Lactate dehydrogenase mRNA expression was also significantly reduced in the BM of these mice, but Glut1 was only marginally regulated (Figure 2C). Also, HIF-1α deficiency did not alter the cell surface expression of Glut1 in CD34$^+$ HSPCs and CD34$^-$ LT-HSCs (Figure 2D) or the frequency of these cells (Figure 2E). Furthermore, quantification of the blood myeloid cells in these mice revealed that HIF-1α deficiency further increased the neutrophil, monocyte, and eosinophil counts in these mice (Figure 2F). Together, these findings suggest that HIF-1α does not mediate the upregulation of Glut1 in *ApoE*$^{-/-}$ HSPC or their expansion and minimally contributed to myelopoiesis under hypercholesterolemic conditions.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

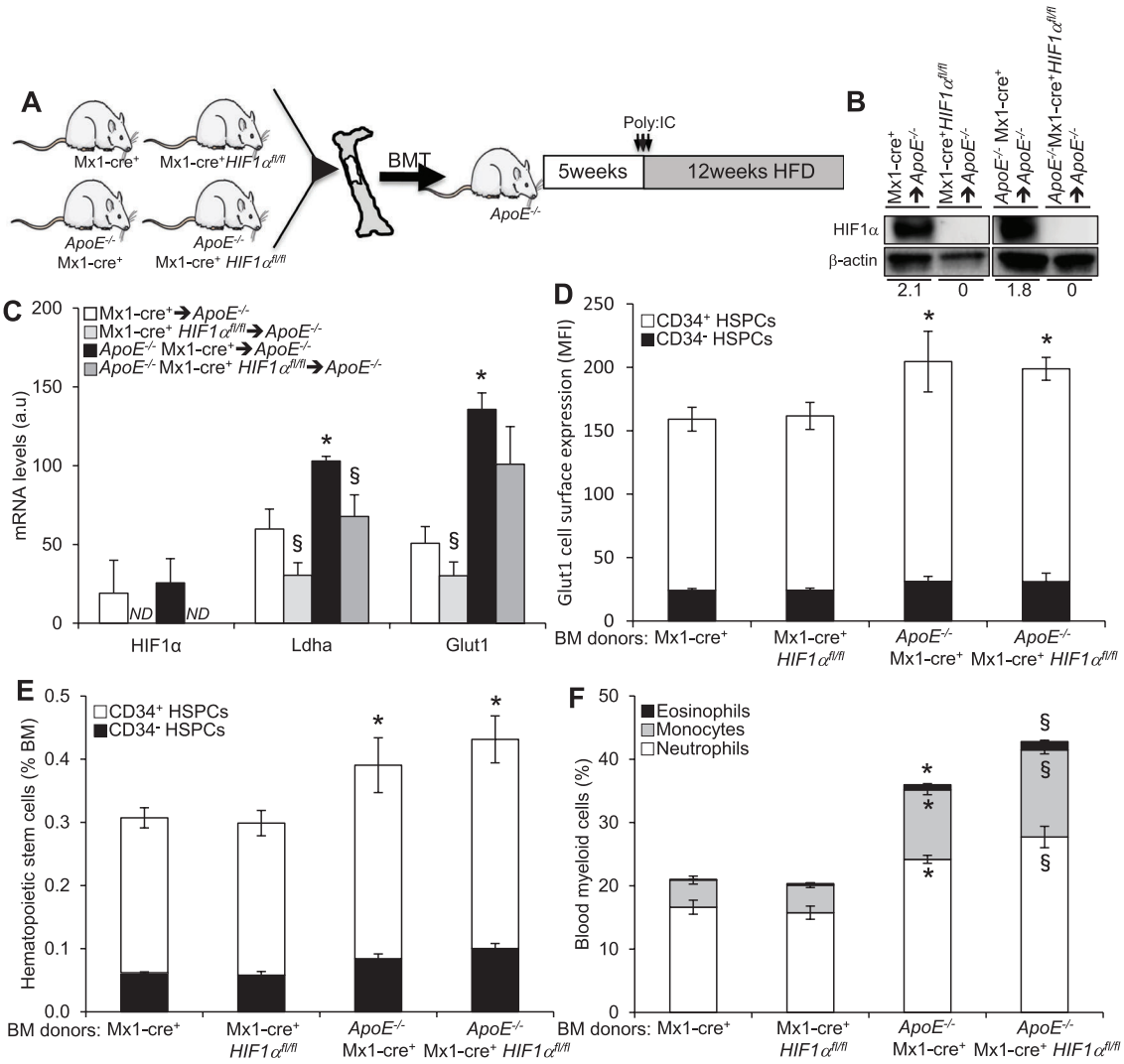


Figure 2. Hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α)-independent regulation of Glut1 expression and *ApoE*$^{-/-}$ hematopoietic stem and multipotential progenitor cell (HSPC) expansion and myeloid lineage fate. A, Experimental overview. Bone marrow from Mx1-Cre (controls), Mx1-cre *HIF1α*$^{fl/fl}$, *ApoE*$^{-/-}$ Mx1-Cre, *ApoE*$^{-/-}$ Mx1-cre *HIF1α*$^{fl/fl}$ mice were transplanted into *ApoE*$^{-/-}$ recipient mice and after a 5-week recovery period, the mice were injected with polyinosinic-polycytidylic acid (Poly:IC) and fed with a high-fat diet (HFD) for 12 weeks to induce the expansion of HSPCs. BMT indicates BM transplant. **B**, Representative Western blots showing HIF-1α levels in bone marrow (BM) cells freshly isolated from these mice at the end of the study period. Quantification (normalized to β-actin) is expressed as arbitrary unit and indicated by numbers below. **C**, mRNA expression of HIF-1α and HIF-1α target genes *Ldha* and *Glut1* in BM cells freshly isolated from these mice at the end of the study period. **D**, Histograms showing Glut1 cell surface expression (expressed as the mean fluorescence intensity [MFI]) in CD34$^-$ and CD34$^+$ HSPCs. **E**, Quantification of the CD34$^-$ or CD34$^+$ HSPCs by flow cytometry was expressed as the percentage of total BM. **F**, Peripheral blood neutrophils, monocytes, and eosinophils were also quantified in these mice at the end of the study period. The results are the means±SEM of 6 to 10 animals per group; **P*<0.05 vs *Mx1-Cre*; §*P*<0.05 vs *ApoE*$^{-/-}$ *Mx1-Cre*. ND indicates not detectable.

IL-3Rβ Signaling Pathway Concomitantly Controls the Cycling and the Upregulation of Glut1 in ApoE$^{-/-}$ HSPCs

Glut1 can be upregulated by growth hormone-dependent activation of oncogenes, such as Ras or Src.[38,39] Therefore, we investigated the expression of Glut1 in WT and *ApoE*$^{-/-}$ BM cultures in response to various growth hormones. The Glut1 mRNA levels in WT BM cells were increased on stimulation with GM-CSF and IL-3, but not Flt3L or thrombopoietin, and this response was further increased in the *ApoE*$^{-/-}$ BM cells and blunted by a farnesyl transferase inhibitor that blocks Ras activation (Online Figure IIA). These responses were not observed for the HIF-1α or lactate dehydrogenase mRNAs (Online Figure IIA). Flow cytometry analysis confirmed an increase in Glut1 cell surface expression in *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs on IL-3 and GM-CSF stimulation compared with WT HSPCs (Online Figure IIB). These effects were abrogated by blocking the IL-3Rβ signaling pathway and downstream Ras activation with a farnesyl transferase inhibitor, but not by the Jak2 inhibitor, AG490, or the AMP-activated protein kinase activator, metformin (Online Figure IIB). Removing plasma membrane cholesterol with cyclodextrin also prevented the enhanced Glut1 expression in *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs confirming the central role of cholesterol in this regulation (Online Figure IIB), To directly test the relevance of these observations in vivo, an IL-3Rβ blocking antibody was next injected into the WT and *ApoE*$^{-/-}$ mice. Consistent with earlier work,[40] we first showed that this antibody efficiently reduced myelopoiesis in the *ApoE*$^{-/-}$ mice and had no effect in WT mice during the 24-hour period (Figure 3A). An analysis of the genes in the glycolytic pathway in the BM cells at the end of the study period revealed no significant changes in the HIF-1α or lactate dehydrogenase mRNAs, but the Glut1 mRNA was downregulated after treatment with the IL-3Rβ blocking antibody in the *ApoE*$^{-/-}$ BM (Online Figure IIC). Quantification of the HSPCs in the BM of these mice by flow cytometry also revealed reduced numbers of CD34^{+}, but not CD34^{-} HSPCs, in the *ApoE*$^{-/-}$ mice, but not in the WT mice (Figure 3B), which correlated with reduced cycling of these cells (Figure 3C). This was associated with the reduced cell surface expression of Glut1 in the *ApoE*$^{-/-}$ CD34^{+} HSPCs (Figure 3D). These results revealed that the metabolic requirements for proliferation and expansion of the *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs are associated with the IL-3/Glut1 axis and not the HIF-1α/Glut1 axis in vivo.

Inhibition of Mitochondrial Glycolytic Substrate Utilization Prevents ApoE$^{-/-}$ HSPC Proliferation and Myelomonocytic Fate In Vitro

To determine the contribution of mitochondrial oxidative phosphorylation on *ApoE*$^{-/-}$ HSPC proliferation and lineage specification on IL-3 and GM-CSF treatment, we next artificially suppressed various enzymes that are intricately involved in the regulation of the tricarboxylic acid cycle using pharmacological inhibitors (Figure 4A). We first validated our in vitro BM culture assay by showing that inhibition of the IL-3Rβ signaling pathway (IL-3Rβ blocking antibody), inhibition of Ras signaling (farnesyl transferase inhibitor FTI-277), and plasma membrane cholesterol depletion with cyclodextrin prevented *ApoE*$^{-/-}$ HSPC expansion (Figure 4B) and the generation of CD11b^{+}Gr-1^{+} myeloid cells on IL-3 and GM-CSF

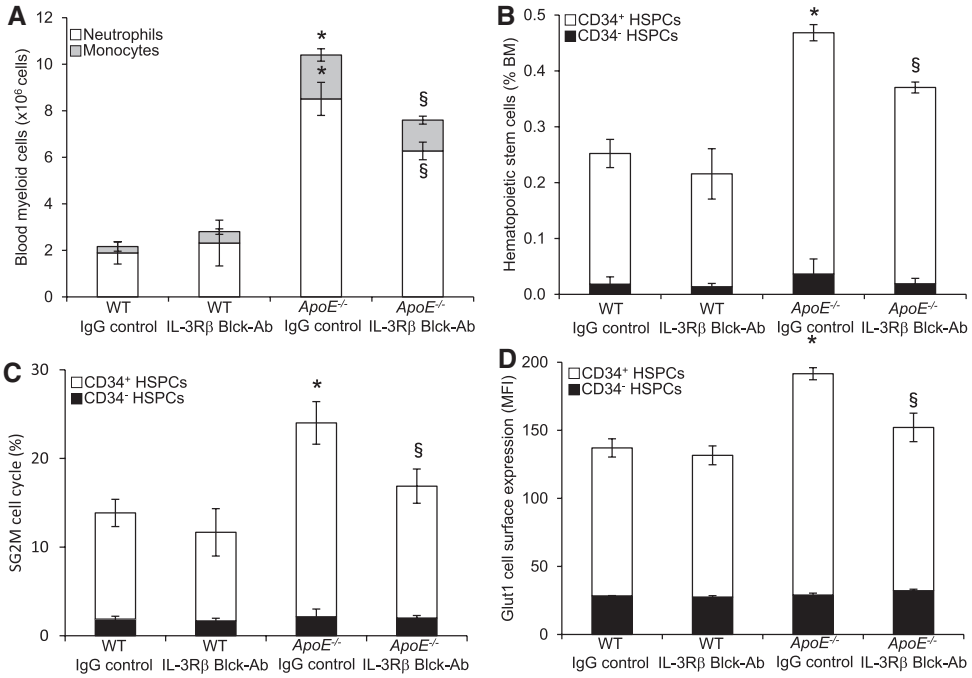


Figure 3. The *ApoE*$^{-/-}$ hematopoietic stem and multipotential progenitor cell (HSPC) expansion and myeloid lineage fate and Glut1 upregulation are driven by the IL3Rβ signaling pathway. A, Twenty-week–old wild-type (WT) and *ApoE*$^{-/-}$ mice were injected with IgG control or 100 μg of the IL-3Rβ blocking antibody for 24 hours and analyzed for peripheral blood myeloid cells by flow cytometry. **B**, The CD34^{-} or CD34^{+} HSPCs were quantified in the bone marrow (BM) of these mice and was expressed as the percentage of total BM. **C**, The percentage of these cells in S/G2M phase was determined by Hoechst staining, and (**D**) Glut1 cell surface expression was expressed as the mean fluorescence intensity (MFI). The results are the means±SEM of 5 to 6 animals per group; *P<0.05 vs WT IgG control; §P<0.05 vs *ApoE*$^{-/-}$ IgG control.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

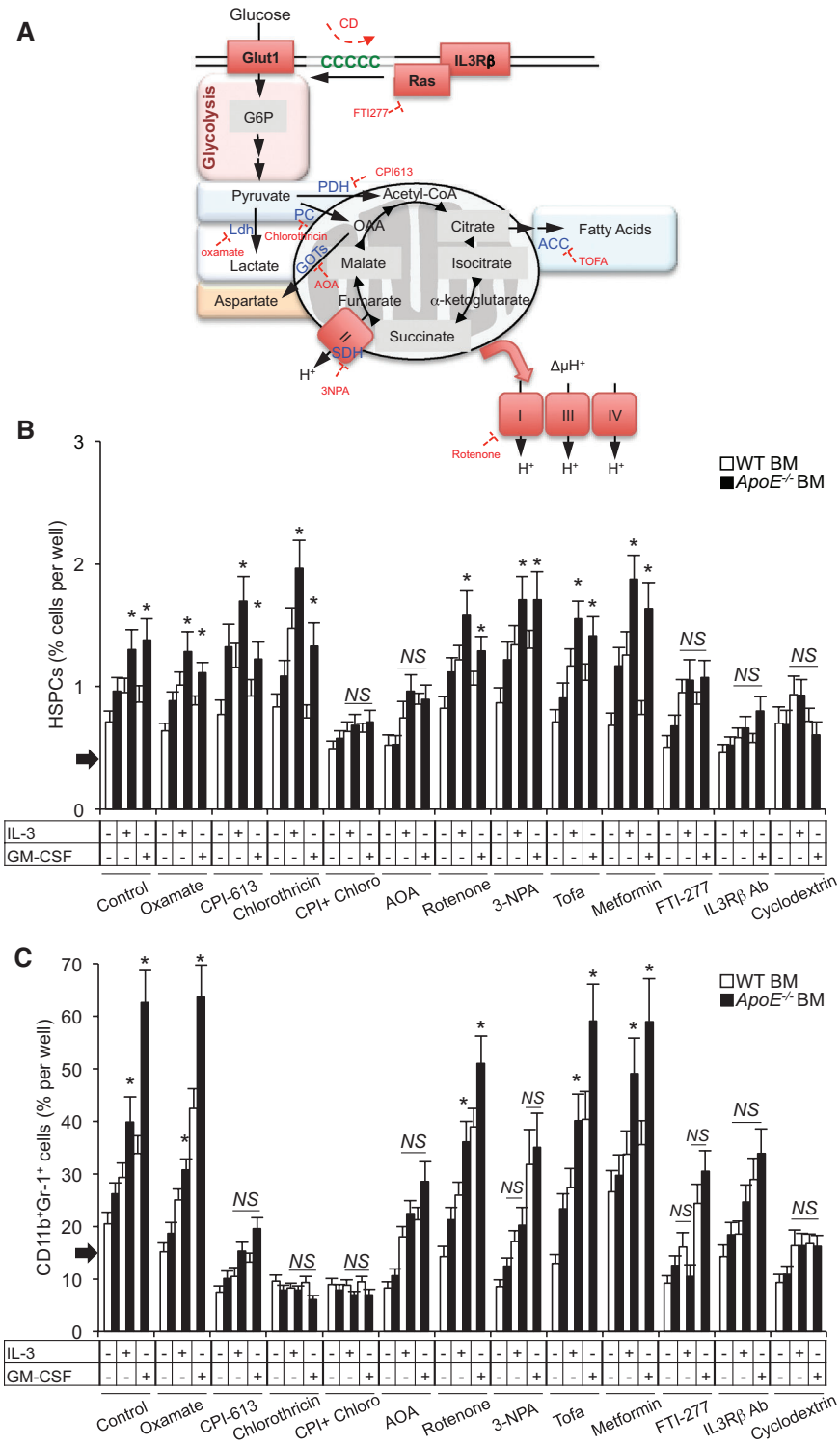


Figure 4. Mitochondrial glycolytic substrate utilization is required for *ApoE*$^{-/-}$ hematopoietic stem and multipotential progenitor cell (HSPC) proliferation and myelomonyctic fate in vitro. A, Schematic representation of the metabolic pathways analyzed using pharmacological inhibitors with key enzymes indicated in blue, inhibitors in red, metabolites in black, and cholesterol in green. Red boxes also indicated key signaling molecules. Bone marrow (BM) cells from fluorouracil-treated wild-type (WT) and *ApoE*$^{-/-}$ mice were grown for 72 hours in liquid culture containing 10% FBS IMDM (fetal bovine serum, Iscove's modified Dulbecco's medium) in the presence of the indicated chemical compounds and 6 ng/mL IL-3 or 2 ng/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). **B**, Quantification of HSPCs and (**C**) CD11b^{+}Gr-1^{+} myeloid cells after in vitro culture. Arrows on the *y* axis indicate the starting percentage of cells per well before culture. The results are the means±SEM of an experiment performed with 4 animals per group; ACC indicates acetyl-CoA carboxylase; CD, cyclodextrin; CPI-613 or CPI, 6,8-bis[(phenylmethyl)thio]octanoic acid; GOTs, glutamate oxaloacetate transaminases; LDH, lactate dehydrogenase; NPA, nitropropionic acid; NS, nonsignificant; OAA, oxaloacetate; PC, pyruvate carboxylase; PDH, pyruvate dehydrogenase; SDH, succinate dehydrogenase; and TOFA, 5-(tetradecyloxy)-2-furoic acid. $P<0.05$, genotype effect.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

treatment (Figure 4C). In contrast, inhibition of lactate dehydrogenase and acetyl-CoA carboxylase using oxamate and Tofa, respectively, or activation of AMP-activated protein kinase with metformin did not alter *ApoE*$^{-/-}$ HSPC expansion (Figure 4B) or their myeloid fate (Figure 4C). Surprisingly, inhibition of mitochondrial respiratory chain complex I with rotenone was also not sufficient to dampen *ApoE*$^{-/-}$ HSPC expansion and myeloid commitment (Figure 4B and 4C). Given the enhanced succinate dehydrogenase activity observed in *ApoE*$^{-/-}$ BM cells, we next evaluated the contribution of the mitochondrial complex II. Inhibition of succinate dehydrogenase with 3-nitropropionic acid specifically prevented the myeloid fate of *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs, but not their expansion (Figure 4B and 4C). We next assessed whether inhibition of the conversion of pyruvate for entry to the tricarboxylic acid cycle with a pyruvate dehydrogenase inhibitor (CPI-613) and a pyruvate carboxylase inhibitor (chlorothricin) could alter the expansion and myeloid fate of *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs. Although *ApoE*$^{-/-}$ HSPC expansion required both inhibition of pyruvate dehydrogenase and pyruvate carboxylase (Figure 4B), their myeloid fate was actually suppressed by inhibiting either pyruvate dehydrogenase or pyruvate carboxylase (Figure 4C). This revealed that the conversion of both succinate and pyruvate into the tricarboxylic acid cycle are central metabolic checkpoints for *ApoE*$^{-/-}$ HSPC myeloid lineage specification and to some extent *ApoE*$^{-/-}$ HSPC expansion. Interestingly, the conversion of succinate to fumarate and pyruvate to oxaloacetate converge to the malate–aspartate shuttle, known to maximize the number of ATP molecules produced in glycolysis.[41] To address the contribution of this pathway, we suppressed transaminases including glutamate oxaloacetate transaminases using aminooxyacetic acid. This molecule has been shown to prevent the mitochondria from using glycolytic substrates by inhibiting the malate–aspartate shuttle.[42] Remarkably, treatment with aminooxyacetic acid not only prevented *ApoE*$^{-/-}$ HSPC expansion (Figure 4B) but also their myeloid fate on IL-3 and GM-CSF treatment (Figure 4C). These data collectively suggest that mitochondrial metabolic reprogramming of *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs is required for their expansion and commitment to the myeloid lineage.

Glut1 Mediates the IL-3Rβ–Dependent ApoE$^{-/-}$ HSPC Proliferation and Myelomonocytic Fate In Vitro

To bolster our observations, we next generated single or combined knockout of ApoE (*ApoE*$^{-/-}$) and Glut1 (*Glut1*$^{+/-}$) mice. The increased oxygen consumption observed in *ApoE*$^{-/-}$ BM cells in response to IL-3 and GM-CSF stimulation was severely reduced by Glut1 deficiency (Figure 5A). Remarkably, Glut1 deficiency also prevented the enhanced mitochondrial respiration of *ApoE*$^{-/-}$ Lin$^-$Sca1$^+$ BM progenitors cultured for 2 hours after isolation (Figure 5B). Thus, we next isolated Lin$^-$ BM cells (containing predominantly HSPCs) that were placed in vitro in medium either alone or supplemented with IL-3 or GM-CSF. We found that Glut1 deficiency led to significantly decreased HSPC expansion either in WT Lin$^-$ cultures after IL-3 and GM-CSF stimulation or in *ApoE*$^{-/-}$ Lin$^-$ cultures under both unstimulated and stimulated conditions (Figure 5C and 5D). As a consequence, Glut1 deficiency prevented not only the expansion of the number of cells per well (Online Figure IID) but also the generation of CD11b$^+$Gr-1$^+$ myeloid cells both in response to IL-3 and GM-CSF or in *ApoE*$^{-/-}$ Lin$^-$ cultures (Figure 5E and 5F). This mirrored the reactive oxygen species production and MMP assessed by flow cytometry in HSPCs at the end of the culture period (Figure 5G and 5H). Mechanistically, we next tested whether Glut1 may mediate the effect of IL-3 on autophagy[43] because autophagy has recently emerged to regulate HSPC maintenance and a bias toward myelopoiesis.[44,45] Western blot analysis of microtubule-associated protein light chain 3-II protein levels, an hallmark of autophagy, revealed that Glut1 deficiency prevented the decrease of microtubule-associated protein light chain 3-II expression in WT and *ApoE*$^{-/-}$ BM cells under basal and IL-3–stimulated conditions (Online Figure IIIA). To analyze the autophagic flux of HSPCs, we next used the Cyto-ID probe allowing analysis by multicolor flow cytometry. Remarkably, Glut1 deficiency prevented the reduced Cyto-ID staining induced by IL-3 in HSPCs isolated from WT Lin$^-$ cultures and restored the autophagic flux of *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs to the level of control cells (Online Figure IIIB and IIIC). These data identify that Glut1 is a key metabolic sensor mediating the growth-regulatory effects of IL-3 through autophagy-dependent modulation of HSPC expansion and myeloid commitment in vitro.

Reduced Glycolytic Activity in Mice With Hematopoietic Glut1 Deficiency Prevents ApoE$^{-/-}$ HSPC Expansion and Proliferation

To directly test the in vivo physiological relevance of Glut1 on *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs, we transplanted the BM of single or combined knockout of ApoE (*ApoE*$^{-/-}$) and Glut1 (*Glut1*$^{+/-}$) into irradiated *ApoE*$^{-/-}$ mice. After a recovery period, the recipients were fed with a high-fat diet for 12 weeks using the similar experimental design described earlier (Figure 6A). At the end of the study period, we confirmed the efficiency of the transplantation procedure by showing a ≈1.3-fold and 1.5-fold decrease in Glut1 expression in mice receiving *Glut1*$^{+/-}$ or *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM, respectively, using Glut1 antibody and Glut1 receptor–binding domain ligand by flow cyotmetry (Figure 6B). An analysis of the different populations within the HSPCs of these mice was next performed (Online Figure IV). As shown in Figure 1F, low Glut1 cell surface expression was observed in the CD34$^-$ LT-HSCs (Figure 6C; Online Figure IVD), which were also characterized by CD150$^+$ and Flt3$^-$ markers (Online Figure IVA–IVC).[35,36] Further analysis of the different populations within the HSPCs revealed higher Glut1 expression in the CD34$^+$CD150$^+$Flt3$^-$ MMP2 compared with the CD34$^+$CD150$^-$Flt3$^-$ and CD34$^+$CD150$^-$Flt3$^+$ (MMP3 and MMP4, respectively; Figure 6C). Consistent with these findings, the Glut1 cell surface expression was decreased by a ≈1.4-fold in the MMP2 of mice receiving either *Glut1*$^{+/-}$ or *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM (Figure 6C; Online Figure IVD). Interestingly, the 2-NBDG staining quantified by flow cytometry suggested Glut1-independent glucose utilization in different populations within the HSPCs, but confirmed a ≈1.35-fold decrease in 2-NBDG staining in the CD34$^+$CD150$^+$Flt3$^-$ MMP2 of mice receiving either *Glut1*$^{+/-}$ or *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM compared with their respective controls (Figure 6D; Online Figure IVE). We next investigated the relation between the proliferation

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

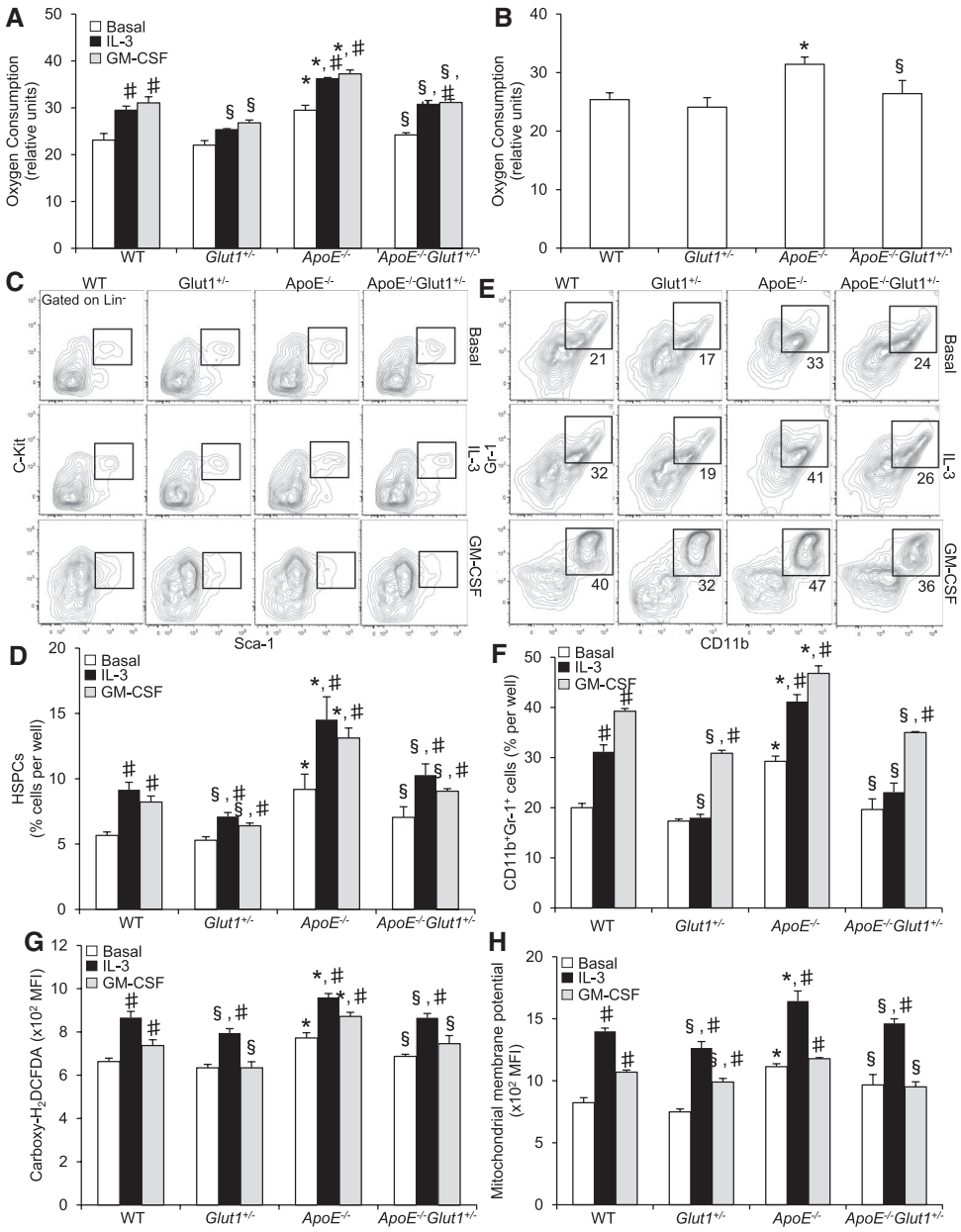


Figure 5. Glut1 is required in vitro for the IL3Rβ-dependent *ApoE*$^{-/-}$ hematopoietic stem and multipotential progenitor cell (HSPC) expansion and myeloid lineage fate. A, Oxygen consumption of wild-type (WT), *Glut1*$^{+/-}$, *ApoE*$^{-/-}$, and *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ bone marrow (BM) cells cultured for 48 hours in the presence or absence of 6 ng/mL IL-3 or 2 ng/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or **(B)** WT, *Glut1*$^{+/-}$, *ApoE*$^{-/-}$, and *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ Lineage marker (Lin)$^{-}$Sca1^{+} progenitors cultured for 2 hours after isolation. Bone marrow cells from WT, *Glut1*$^{+/-}$, *ApoE*$^{-/-}$, and *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ mice were sorted for Lin^{-} cells (i.e, enriched in HSPCs) and cultured for 72 hours in liquid culture in the presence or absence of 6 ng/mL IL-3 or 2 ng/mL GM-CSF. **C**, Representative dot plots and **(D)** quantification of HSPCs after in vitro culture. **E**, Representative dot plots and **(F)** quantification of CD11b^{+}Gr-1^{+} myeloid cells after in vitro culture. **G**, Quantification of reactive oxygen species generation and **(H)** mitochondrial membrane potential by flow cytometry using fluorescent carboxy-H_2DCFDA and tetramethylrhodamine ethyl ester dyes, respectively, in HSPCs after in vitro culture. The results are the means±SEM of n=4 per group. *P<0.05, genotype effect; §P<0.05, Glut1-dependent effect; #P<0.05, growth hormone effect.

capacity of the MMP2 and the Glut1-dependent glucose utilization. Although there was no significant decrease in the S/G2M fraction in the CD34^{+}CD150^{+}Flt3^{-} MMP2 and other populations within the HSPCs of mice receiving *Glut1*$^{+/-}$ BM, a significant 1.3-fold decrease in the S/G2M fraction was observed in the CD34^{+}CD150^{+}Flt3^{-} MMP2 and downstream CD34^{+}CD150^{-}Flt3^{-} MMP3 of mice receiving *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM compared with mice receiving *ApoE*$^{-/-}$ BM (Figure 6E; Online Figure IVF). Quantification of the BM HSPCs confirmed a ≈1.4-fold decrease in the frequency and absolute number of the CD34^{+}CD150^{+}Flt3^{-} MMP2 and downstream MMPs in mice receiving *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM compared with the controls (Figure 6F and 6G). Similar findings were also observed in chow-fed *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM-transplanted mice compared with the *ApoE*$^{-/-}$ BM-transplanted mice (data not shown). Together, these findings reveal that Glut1-dependent glucose utilization was required for *ApoE*$^{-/-}$ MMP2 proliferation and downstream MMP expansion.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

Reduced Myeloid Commitment in ApoE$^{-/-}$ BM With Glut1 Deficiency

While working on this article, Pietras et al[36] elegantly showed that the CD34$^+$CD150$^+$Flt3$^-$ MMP2 and downstream CD34$^+$CD150$^-$Flt3$^-$ MMP3 exhibited a myeloid-biased multipotential progenitor phenotype. This prompted us to test whether the decreased MMP2 and MMP3 expansions observed in mice receiving *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM could be associated with a defective myeloid fate specification. The CMP, GMP, and megakaryocyte–erythrocyte progenitor populations were analyzed by flow cytometry (Online Figure IVG) and were not significantly reduced in the mice receiving *Glut1*$^{+/-}$ BM, despite a trend toward CMPs (Figure 6H). Nevertheless, the CMP numbers were significantly decreased by >1.2-fold in mice receiving *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM compared with controls receiving *ApoE*$^{-/-}$ BM (Figure 6H). We noticed that the splenomegaly in the mice receiving the *ApoE*$^{-/-}$ BM was rescued by Glut1 deficiency (Online Table I), and the spleen represents an important reservoir of myeloid cells through extramedullary hematopoiesis in *ApoE*$^{-/-}$ mice.[6,33] Therefore, the hematopoietic progenitors were next quantified in this organ. Similar to the BM, we observed a 1.6-fold decrease in the frequency of splenic CMPs in mice receiving *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM and, to some extent, a 1.3-fold decrease in the percentage of GMPs, but no changes in the megakaryocyte–erythrocyte progenitor population (Figure 6I). Consistent with

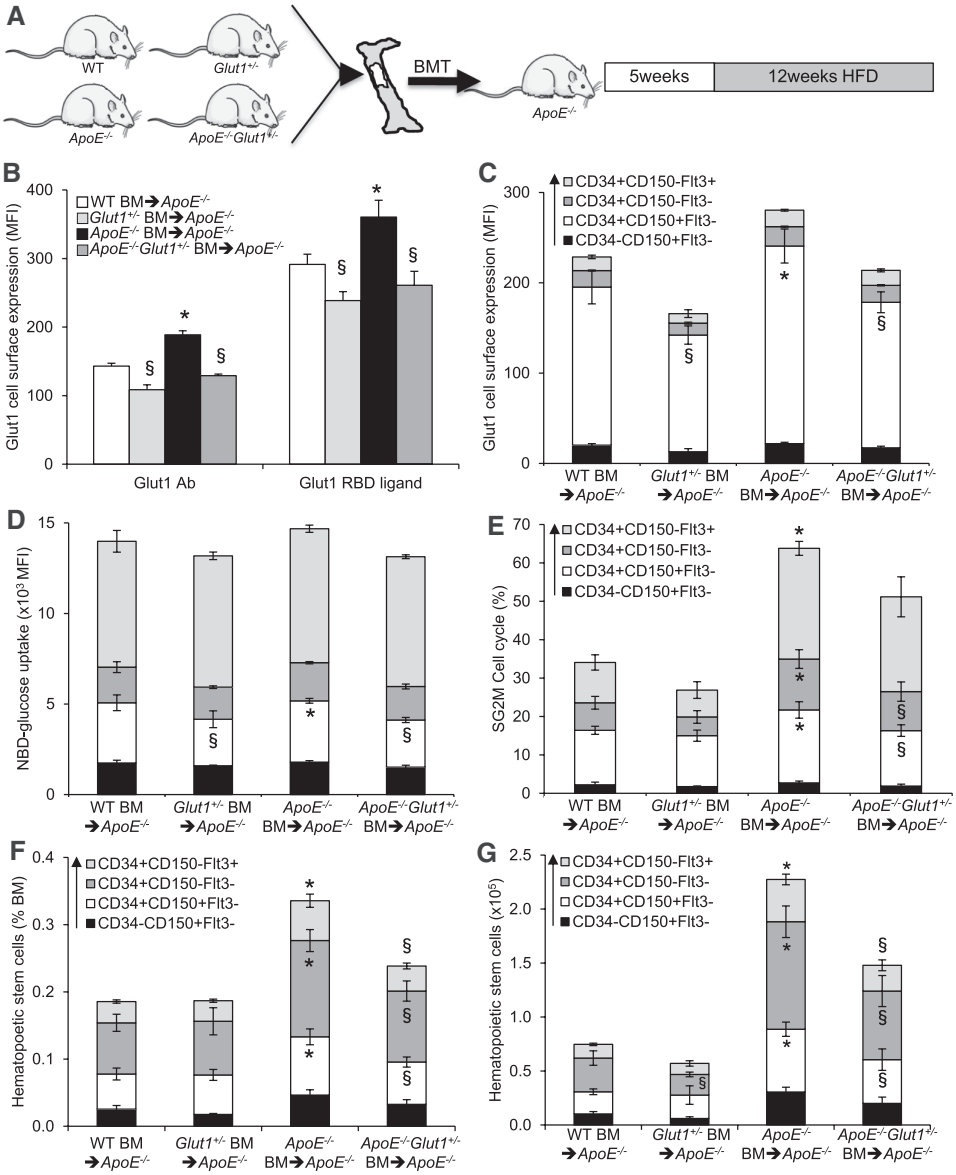


Figure 6. Glut1-dependence of *ApoE*$^{-/-}$ hematopoietic stem and multipotential progenitor cell (HSPC) expansion and myelopoiesis in vivo. A, Experimental overview. Bone marrow (BM) from wild-type (WT), *Glut1*$^{+/-}$, *ApoE*$^{-/-}$, and *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ mice were transplanted into *ApoE*$^{-/-}$ recipient mice and, after a 5 week recovery period, the mice were fed a high-fat diet (HFD) for 12 weeks to induce the expansion of HSPCs. **B**, Glut1 cell surface expression was assessed by flow cytometry in the BM of these mice using Glut1 antibody and Glut1 receptor binding domain (RBD) ligand. Histograms show **(C)** the Glut1 cell surface expression and **(D)** NBD-glucose binding and uptake in HSPC subpopulations from the most quiescent (long-term hematopoietic stem cells [LT-HSCs]) to the most cycling (*Continued*)

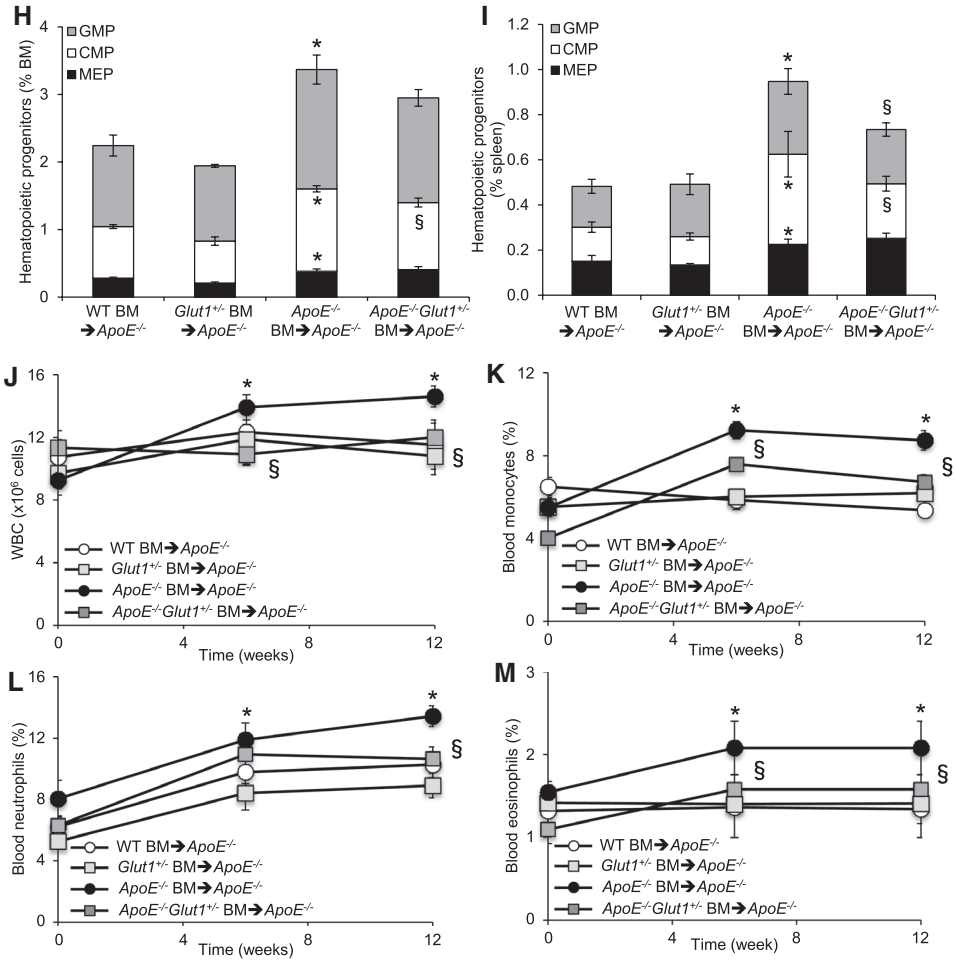


Figure 6 (Continued). multipotential progenitors (CD34⁻CD150⁺Flt3⁻>CD34⁺CD150⁺Flt3⁻>CD34⁺CD150⁻Flt3⁻>CD34⁺CD150⁻Flt3⁺) and are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI). **E**, The percentage of cells in S/G2M phase was determined by diamidino phenylindole (DAPI) staining and flow cytometry. Quantification of HSPC subpopulations expressed as **(F)** percentage of total BM or **(G)** absolute numbers. Histograms showing the quantification of granulocyte-macrophage progenitor (GMP), common myeloid progenitor (CMP), and megakaryocyte–erythrocyte progenitor (MEP) populations are expressed as percentage of **(H)** total BM or **(I)** spleen. Quantification of **(J)** the peripheral blood leukocytes, **(K)** monocytes, **(L)** neutrophils, and **(M)** eosinophils during the course of a 12-week HFD period. BMT imdicates BM transplant; and WBC, white blood cells. Data are the means±SEM and are representative of an experiment performed with n=6 (WT and *Glut1*$^{+/-}$ BM transplanted into *ApoE*$^{-/-}$ recipients) or n=10 to 12 (*ApoE*$^{-/-}$ *and ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM transplanted into *ApoE*$^{-/-}$ recipients) animals per group. **P*<0.05 vs *ApoE*$^{-/-}$ *mice* receiving WT BM. §*P*<0.05 vs *ApoE*$^{-/-}$ mice receiving *ApoE*$^{-/-}$ BM.

these findings, the platelet and red blood cell counts, mean platelet volume, and hematocrit were unchanged in these mice (Online Table I). Peripheral T- and B-cell numbers were also not affected in these mice (Online Figure VA and VB). In contrast, the blood counts indicated that the leukocytosis, monocytosis, neutrophilia, and eosinophilia of mice receiving *ApoE*$^{-/-}$ BM in response to feeding a high-fat diet were rescued by Glut1 deficiency (Figure 6J–6M). These data indicate that Glut1-dependent glucose utilization is required at the early stage of *ApoE*$^{-/-}$ HSPC commitment to the myeloid lineage.

Glut1 Acts in a Cell-Autonomous Fashion to Regulate ApoE$^{-/-}$ HSPC Proliferation and Myelopoiesis

To test whether this phenotype was caused by cell autonomous effects of Glut1 within the myeloid-biased HSPCs or involved in a cell extrinsic effect, we performed a competitive BM transplantation experiment with equally mixed BM cells from CD45.1 *ApoE*$^{-/-}$ mice and either CD45.2 *ApoE*$^{-/-}$ BM or CD45.2 *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/}$ BM into irradiated WT recipients. After BM reconstitution, we found that the frequency of CD45.1 *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs, particularly the CD34+ HSPCs, were not affected by the presence of CD45.2 *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/}$ BM cells, despite the reduced frequency of the CD45.2 *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/}$ HSPCs (Figure 7A). These findings mirrored the reduced S/G2M fraction in the CD45.2 *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/}$ HSPCs without altering the S/G2M fraction in the mixed CD45.1 *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs (Figure 7B). Consistent with these findings on BM HSPCs, there was a preferential accumulation of CD45.1 *ApoE*$^{-/-}$ versus CD45.2 *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ blood monocytes and neutrophils (Figure 7C and 7D), indicative of cell autonomous proliferative disadvantage of Glut1 deficiency.

Glut1 Deficiency Prevents the Progression of Atherosclerosis in ApoE$^{-/-}$ BM-Transplanted Mice

We next explored the in vivo relevance of reducing *ApoE*$^{-/-}$ HSPC proliferation and myelopoiesis through Glut1

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

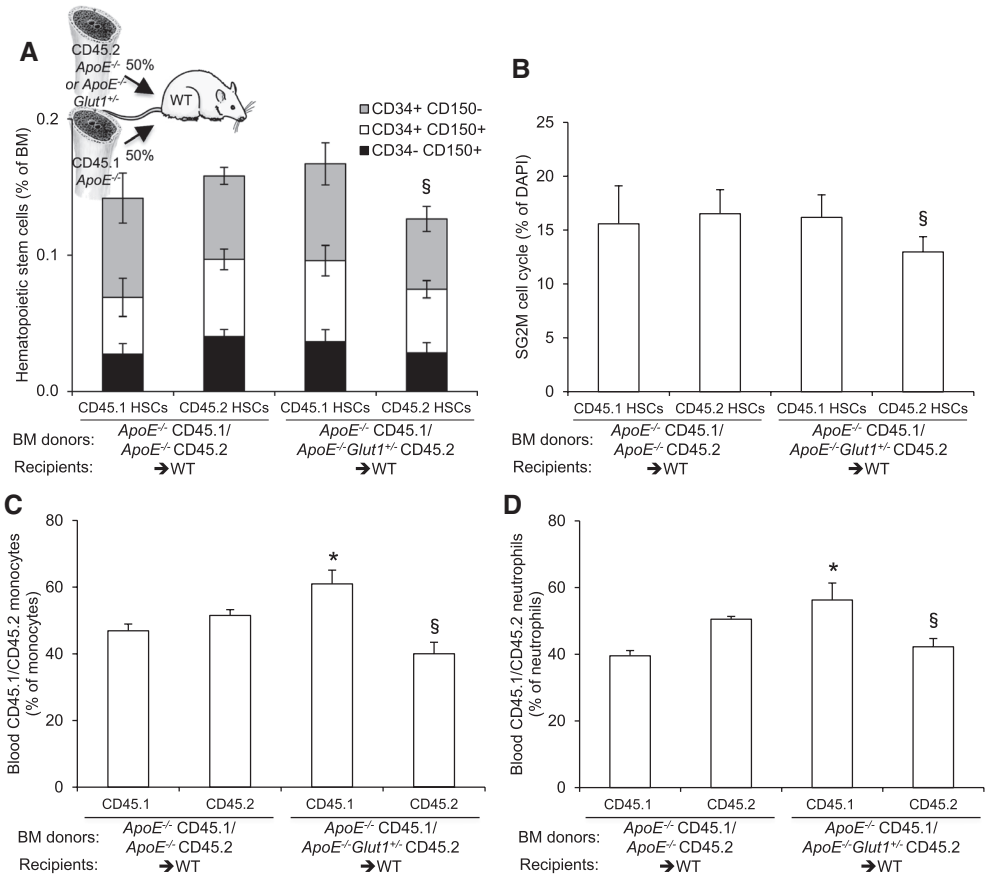


Figure 7. Cell autonomous role of Glut1 on *ApoE*$^{-/-}$ hematopoietic stem and multipotential progenitor cell (HSPC) expansion and myeloid lineage commitment. A, Schematic diagram showing the protocol for the competitive repopulation assay. Equally mixed portions of bone marrow (BM) from the respective genotypes were transplanted into wild-type (WT) recipients. Chow-fed recipient mice were analyzed at 10 weeks after reconstitution by flow cytometry for the contribution of the donor (CD45.1$^+$/CD45.2$^+$) to the HSPC subpopulations from the most quiescent (long-term hematopoietic stem cells [LT-HSCs]) to the most cycling multipotential progenitors (CD34$^-$CD150$^+$>CD34$^+$CD150$^+$> CD34$^+$CD150$^-$) in the bone marrow. **B**, The percentage of CD45.1$^+$ and CD45.2$^+$ HSPCs in S/G2M phase was also determined by diamidino phenylindole (DAPI) staining and flow cytometry in the BM of these mice. The contribution of the donor (CD45.1$^+$/CD45.2$^+$) to **(C)** the monocytes and **(D)** neutrophils in the peripheral blood was also analyzed. The results are the means±SEM of 6 to 8 mice per groups. *P<0.05 vs WT mice receiving CD45.1$^+$*Apoe*$^{-/-}$/CD45.2$^+$*Apoe*$^{-/-}$ mixed BM; §P<0.05 vs CD45.1$^+$*Apoe*$^{-/-}$ cells within the same transplanted mice.

deficiency on the development of atherosclerosis. This was tested in *ApoE*$^{-/-}$-recipient mice that received *ApoE*$^{-/-}$ or *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM fed with a high-fat diet for 12 weeks (Figure 6A). As shown in Online Table I, the body weight, plasma LDL and HDL cholesterol, or plasma glucose were not significantly different with regard to Glut1 deficiency. However, *ApoE*$^{-/-}$ mice receiving *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM showed a ≈1.4-fold decrease in the development of atherosclerosis in their proximal aortas (Figure 8A). Immunohistochemical staining of the aortic root plaques revealed that this phenotype was associated with a massive decrease in the F4/80$^+$ macrophages in the *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$BM-transplanted mice (Figure 8B). We also examined the uptake of the radiolabeled D-glucose analog (2-[^{14}C]-DG) after ex vivo incubation of the aortic arch and spleen from the *ApoE*$^{-/-}$ mice that received *ApoE*$^{-/-}$ or *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM. *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM-transplanted mice showed a significant 1.4-fold and 1.3-fold decrease in total uptake of 2-[^{14}C]-DG in the aortic arch (Figure 8C) and the spleen (Figure 8D), respectively, compared with controls. We next analyzed Ly6C^{hi} monocyte recruitment into atherosclerotic plaques using fluorescent-labeled latex beads, as previously described.[10] Figure 8E reveals that 2 days after monocyte labeling, there was a ≈1.8-fold decrease in the number of latex$^+$ monocytes in atherosclerotic lesions of *ApoE*$^{-/-}$ mice receiving *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM compared with mice receiving *ApoE*$^{-/-}$ BM. This reduced recruitment was confirmed by analysis of latex$^+$ monocytes in the aortic arch by flow cytometry (Figure 8F). This paralleled the reduced incorporation of the fluorescent beads in blood monocytes of *ApoE*$^{-/-}$ mice receiving *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM compared with controls 2 days after labeling (data not shown) reflecting their reduced monocytosis (Figure 6K). Thus, we showed that Glut1 connects the enhanced glucose uptake in atheromatous plaques of *ApoE*$^{-/-}$ mice[27–30] with their myelopoiesis through regulation of HSPC maintenance and myelomonocytic fate.

Discussion

Previous studies have shown that inflamed atherosclerotic plaques can be visualized by noninvasive positron emission and computed tomographic imaging with ^{18}F-fluorodeoxyglucose, a glucose analog, which correlates with macrophage accumulation and inflammation.[27–30] However, a recent study has called

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

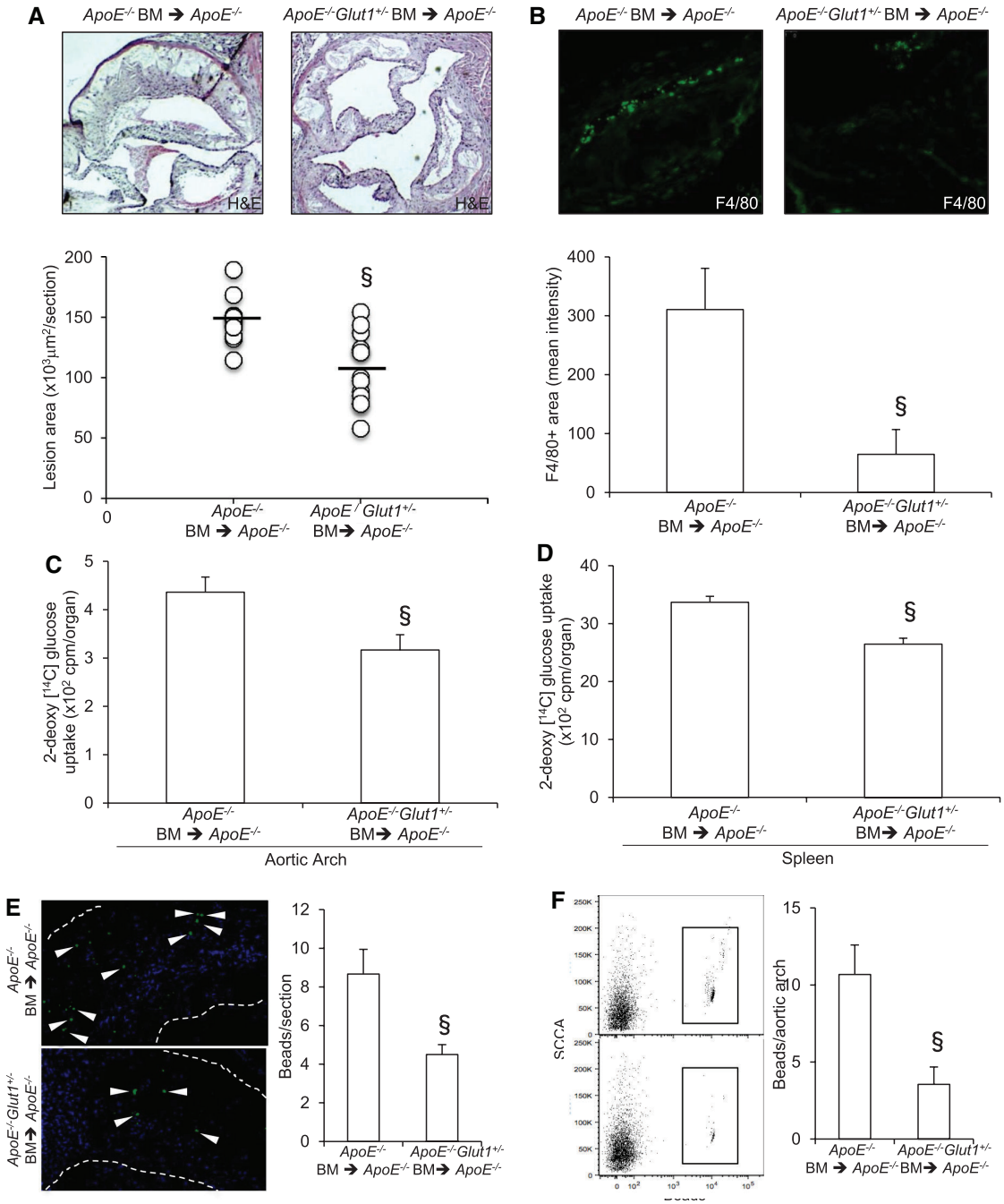


Figure 8. Glut1 deficiency reduces the accelerated atherosclerosis of *ApoE*$^{-/-}$ bone marrow (BM) chimeras. A, Representative hematoxylin and eosin (H&E) staining (magnification, ×100) and quantification by morphometric analysis of the development of atherosclerotic lesions in the proximal aorta of *ApoE*$^{-/-}$ recipient mice transplanted with *ApoE*$^{-/-}$ (n=10) or *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM that were fed a high-fat diet (n=12). The values for individual mice are shown as open circles, representing an average of 6 sections per mouse. The horizontal bars represent the group medians. **B**, The macrophages were detected by F4/80 immunofluorescent staining in the proximal aorta and quantified as the mean intensity (magnification, ×200). **C**, Aortic arch and **(D)** spleen uptake of 2-deoxy-[^{14}C]-glucose in these mice at the end of the study period. All results are the means±SEM and are representative of 10 to 12 animals per group. **E** and **F**, Tracking recruitment of Ly6C^{hi} monocytes in atherosclerotic plaques 2 days after monocyte labeling with green latex beads (n=6). **E**, Representative pictures (magnification, ×200) and quantification of latex beads (green particles, indicated by arrows) localized within atherosclerotic lesions and expressed as the number of beads per cross section; blue: diamidino phenylindole (DAPI)-stained nuclei. **F**, Representative FACS (fluorescence-activated cell sorting) plots and quantification of latex^{+} monocytes that have infiltrated the aortic arch. §P<0.05 vs *ApoE*$^{-/-}$ mice receiving *ApoE*$^{-/-}$ BM. SCCA indicates side scatter area.

into question the relevance of these observations because macrophage-specific overexpression of Glut1 did not aggravate atherosclerosis in mice compared with Glut1 sufficient controls,[46] reflecting the need for a better understanding of the underlying mechanisms. Our study provides direct evidence that Glut1 connects the enhanced glucose uptake in atheromatous plaques of *ApoE*$^{-/-}$ mice with their myelopoiesis through Glut1-dependent regulation of HSPC maintenance and myelomonocytic fate.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

Recent studies have suggested that HSPC expansion and the associated myelopoiesis could underlie the hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in mice.[1,2] However, the rate of ATP generation required for cell proliferation and differentiation cannot be directly explained by cholesterol and requires alternative sources of energy.[47] Our observations indicate that the leukocytes and HSPCs from hypercholesterolemic *ApoE*$^{-/-}$ mice exhibited an increased Glut1-dependent glucose uptake that was associated with increased mitochondrial potential, suggesting that the influx of glycolytic metabolites in these cells fuel the mitochondria for oxidative phosphorylation and ATP generation.[21] The low expression of Glut1 in CD34$^-$ LT-HSCs compared with other CD34$^+$ HSPCs was first counterintuitive because we initially speculated that the presence of the LT-HSCs in the hypoxic BM niche could favor the expression of Glut1 by HIF-1α.[37] However, increasing glucose metabolism through translocation of Glut1 to the cell surface is thought to be crucial for the active cells and cell cycle entry rather than quiescence.[48,49] During aerobic respiration, the ATP yield is linked to NAD$^+$-dependent oxidative steps, including oxidative decarboxylation of pyruvate, that requires metabolic shuttle systems to convey reducing equivalents from cytosol to mitochondria.[41] Our findings indicate that both the oxidative decarboxylation of pyruvate and the transamination reactions of the malate–aspartate shuttle were essential for HSPC expansion and commitment to the myeloid lineage. Thus, it is probably not surprising that we did not observe an accumulation of succinate in *ApoE*$^{-/-}$ BM cultures because of higher succinate dehydrogenase activity favoring fumarate and malate production. The absence of succinate accumulation in *ApoE*$^{-/-}$ BM cells could also contribute to the lack of HIF-1α activation in these cells.[50] Consistent with these observations, we did not observe modulation of the oxygenation status of *ApoE*$^{-/-}$ LT-HSCs in chronic hypercholesterolemia, and HIF-1α deficiency in WT or *ApoE*$^{-/-}$ hematopoietic cells did not alter Glut1 expression or the HSPC frequency. In fact, HIF-1α deficiency in hematopoietic cells rather led to increased myeloid expansion, which could contribute to the role of hypoxia in the development of atherosclerosis.[51] In contrast and consistent with the alternative regulation of Glut1 by growth hormone-dependent activation of Ras or Src,[38,39] the enhanced Glut1 expression in proliferating *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs was prevented by IL-3Rβ blockade. This metabolic regulation was critical for the expansion of *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs and the associated IL-3-dependent downregulation of autophagy,[43] which is most likely required to limit intracellular lysosomal degradation and fulfill the high-energy demand of these cells for proliferation.

Recently, increased splenic activity in patients with cardiovascular diseases has been demonstrated by noninvasive positron emission and computed tomographic imaging with ^{18}F-fluorodeoxyglucose,[31,32] which could reflect the metabolic activity of extramedullary hematopoiesis required to generate monocytes that infiltrate atherosclerotic plaques.[33] However, these observations do not prove causality. Intriguingly, inhibition of glucose uptake with a 2-deoxyglucose (2-DG) analog has recently been shown to inhibit myelopoiesis in human HSCs,[26] but the relevance to atherosclerosis has not been tested. The present study clearly establishes that the increased Glut1-dependent glucose utilization in the *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs could divert these cells to a myelomonocytic fate leading to extramedullary myelopoiesis and subsequent macrophage deposition–dependent atherosclerotic plaque formation. Indeed, we now provide direct in vivo evidence that Glut1 deficiency can significantly reduce the number of CMPs in the *ApoE*$^{-/-}$ BM as well as the number of CMPs and GMPs in the *ApoE*$^{-/-}$ spleen, and this was associated with reduced splenic glucose uptake. This led to inhibition of the monocytosis, neutrophilia, and eosinophilia in the *ApoE*$^{-/-}$ mice transplanted with the *ApoE*$^{-/-}$ BM. Consistent with the lack of effect of Glut1 deficiency on resting T-cells,[52] we also did not observe variations in the number of lymphocytes in our models. While working on this article, Pietras et al[36] elegantly showed that the CD34$^+$CD150$^+$Flt3$^-$ MMP2, which is now showed to express the most Glut1, and downstream CD34$^+$CD150$^-$Flt3$^-$ MMP3 exhibited a myeloid-biased multipotential progenitor phenotype, offering an alternative explanation to the role of Glut1 in favoring myelopoiesis that is independent of a change in other lineage commitments. Together, these findings reveal that the mechanism by which defective ApoE-dependent cholesterol efflux pathways skew HSCs toward myelopoiesis[5,6] relies on the regulation of Glut1-dependent glucose uptake by the IL-3Rβ signaling pathway.

The metabolic phenotype of *ApoE*$^{-/-}$ HSPCs outlined here could be relevant to the adaptability of HSPCs to cholesterol overload and may indicate that the glycolytic phenotype of HSPCs is not merely a product of their hypoxic environment. Thus, the existence of different molecular mechanisms underlying the different glycolytic phenotypes in HSPCs may suggest strategies for specifically modulating the pool of HSPCs that are committed to the myeloid lineage under stressed conditions, such as in myeloproliferative disorders,[36] sepsis,[53] myocardium infarction,[54] or chronic atherosclerosis, as shown in the present study. Inhibition of glucose uptake by a Glut1 inhibitor that does not cross the blood–brain barrier could ultimately provide a novel therapeutic approach to prevent myelopoiesis-driven diseases, such as atherosclerosis.

Acknowledgments

We thank Dr Fréderic Labret for assistance with flow cytometry and Dr Véronique Corcelle for assistance in animal facilities.

Sources of Funding

This work was supported by grants to Dr Yvan-Charvet from INSERM ATIP-AVENIR, the Fondation de France (201300038585) and Agence Nationale de la Recherche (ANR).

Disclosures

None.

References

1. Swirski FK, Nahrendorf M. Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science*. 2013;339:161–166. doi: 10.1126/science.1230719.
2. Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:104–116. doi: 10.1038/nri3793.
3. Coller BS. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:658–670. doi: 10.1161/01.ATV.0000156877.94472.a5.
4. Olivares R, Ducimetière P, Claude JR. Monocyte count: a risk factor for coronary heart disease? *Am J Epidemiol*. 1993;137:49–53.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

5. Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S, Welch CL, Wang N, Randolph GJ, Snoeck HW, Tall AR. ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science*. 2010;328:1689–1693. doi: 10.1126/science.1189731.
6. Murphy AJ, Akhtari M, Tolani S, Pagler T, Bijl N, Kuo CL, Wang M, Sanson M, Abramowicz S, Welch C, Bochem AE, Kuivenhoven JA, Yvan-Charvet L, Tall AR. ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:4138–4149. doi: 10.1172/JCI57559.
7. Gao M, Zhao D, Schouteden S, Sorci-Thomas MG, Van Veldhoven PP, Eggermont K, Liu G, Verfaillie CM, Feng Y. Regulation of high-density lipoprotein on hematopoietic stem/progenitor cells in atherosclerosis requires scavenger receptor type BI expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:1900–1909. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304006.
8. Seijkens T, Hoeksema MA, Beckers L, Smeets E, Meiler S, Levels J, Tjwa M, de Winther MP, Lutgens E. Hypercholesterolemia-induced priming of hematopoietic stem and progenitor cells aggravates atherosclerosis. *FASEB J*. 2014;28:2202–2213. doi: 10.1096/fj.13-243105.
9. Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, Pittet MJ. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest*. 2007;117:195–205. doi: 10.1172/JCI29950.
10. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 2007;117:185–194. doi: 10.1172/JCI28549.
11. Drechsler M, Megens RT, van Zandvoort M, Weber C, Soehnlein O. Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis. *Circulation*. 2010;122:1837–1845. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.961714.
12. Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, Armstrong SA, Passegué E, DePinho RA, Gilliland DG. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*. 2007;128:325–339. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.003.
13. Liu J, Cao L, Chen J, et al. Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature*. 2009;459:387–392. doi: 10.1038/nature08040.
14. Gan B, Hu J, Jiang S, Liu Y, Sahin E, Zhuang L, Fletcher-Sananikone E, Colla S, Wang YA, Chin L, Depinho RA. Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2010;468:701–704. doi: 10.1038/nature09595.
15. Gurumurthy S, Xie SZ, Alagesan B, Kim J, Yusuf RZ, Saez B, Tzatsos A, Ozsolak F, Milos P, Ferrari F, Park PJ, Shirihai OS, Scadden DT, Bardeesy N. The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature*. 2010;468:659–663. doi: 10.1038/nature09572.
16. Nakada D, Saunders TL, Morrison SJ. Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. *Nature*. 2010;468:653–658. doi: 10.1038/nature09571.
17. Norddahl GL, Pronk CJ, Wahlestedt M, Sten G, Nygren JM, Ugale A, Sigvardsson M, Bryder D. Accumulating mitochondrial DNA mutations drive premature hematopoietic aging phenotypes distinct from physiological stem cell aging. *Cell Stem Cell*. 2011;8:499–510. doi: 10.1016/j.stem.2011.03.009.
18. Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, Shima H, Johnson RS, Hirao A, Suematsu M, Suda T. Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010;7:391–402. doi: 10.1016/j.stem.2010.06.020.
19. Miharada K, Karlsson G, Rehn M, Rörby E, Siva K, Cammenga J, Karlsson S. Cripto regulates hematopoietic stem cells as a hypoxic-niche-related factor through cell surface receptor GRP78. *Cell Stem Cell*. 2011;9:330–344. doi: 10.1016/j.stem.2011.07.016.
20. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, Schneider JW, Zhang CC, Sadek HA. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2010;7:380–390. doi: 10.1016/j.stem.2010.07.011.
21. Takubo K, Nagamatsu G, Kobayashi CI, Nakamura-Ishizu A, Kobayashi H, Ikeda E, Goda N, Rahimi Y, Johnson RS, Soga T, Hirao A, Suematsu M, Suda T. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013;12:49–61. doi: 10.1016/j.stem.2012.10.011.
22. Jang YY, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*. 2007;110:3056–3063. doi: 10.1182/blood-2007-05-087759.
23. Miyamoto K, Araki KY, Naka K, et al. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*. 2007;1:101–112. doi: 10.1016/j.stem.2007.02.001.
24. Chen C, Liu Y, Liu R, Ikenoue T, Guan KL, Liu Y, Zheng P. TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J Exp Med*. 2008;205:2397–2408. doi: 10.1084/jem.20081297.
25. Yu WM, Liu X, Shen J, Jovanovic O, Pohl EE, Gerson SL, Finkel T, Broxmeyer HE, Qu CK. Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*. 2013;12:62–74. doi: 10.1016/j.stem.2012.11.022.
26. Oburoglu L, Tardito S, Fritz V, et al. Glucose and glutamine metabolism regulate human hematopoietic stem cell lineage specification. *Cell Stem Cell*. 2014;15:169–184. doi: 10.1016/j.stem.2014.06.002.
27. Rogers IS, Tawakol A. Imaging of coronary inflammation with FDG-PET: feasibility and clinical hurdles. *Curr Cardiol Rep*. 2011;13:138–144. doi: 10.1007/s11886-011-0168-3.
28. Hag AM, Pedersen SF, Christoffersen C, Binderup T, Jensen MM, Jørgensen JT, Skovgaard D, Ripa RS, Kjaer A. (18)F-FDG PET imaging of murine atherosclerosis: association with gene expression of key molecular markers. *PLoS One*. 2012;7:e50908. doi: 10.1371/journal.pone.0050908.
29. Lee SJ, Thien Quach CH, Jung KH, Paik JY, Lee JH, Park JW, Lee KH. Oxidized low-density lipoprotein stimulates macrophage 18F-FDG uptake via hypoxia-inducible factor-1α activation through Nox2-dependent reactive oxygen species generation. *J Nucl Med*. 2014;55:1699–1705. doi: 10.2967/jnumed.114.139428.
30. Garcia-Garcia HM, Jang IK, Serruys PW, Kovacic JC, Narula J, Fayad ZA. Imaging plaques to predict and better manage patients with acute coronary events. *Circ Res*. 2014;114:1904–1917. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302745.
31. Kim EJ, Kim S, Kang DO, Seo HS. Metabolic activity of the spleen and bone marrow in patients with acute myocardial infarction evaluated by 18f-fluorodeoxyglucose positron emission tomograpic imaging. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014;7:454–460. doi: 10.1161/CIRCIMAGING.113.001093.
32. Enami H, Singh P, MacNabb MH, et al. Splenic metabolic activity predicts risk of future cardiovascular events: demonstration of a cardiosplenic axis in humans. *J Am Coll Cardiol Cardiovasc Imaging*. 2015;8:121–130. doi: 10.1016/j.jcmg.2014.10.009.
33. Robbins CS, Chudnovskiy A, Rauch PJ, et al. Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. *Circulation*. 2012;125:364–374. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.061986.
34. Gautier EL, Westerterp M, Bhagwat N, Cremers S, Shih A, Abdel-Wahab O, Lütjohann D, Randolph GJ, Levine RL, Tall AR, Yvan-Charvet L. HDL and Glut1 inhibition reverse a hypermetabolic state in mouse models of myeloproliferative disorders. *J Exp Med*. 2013;210:339–353. doi: 10.1084/jem.20121357.
35. Weissman IL, Shizuru JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*. 2008;112:3543–3553. doi: 10.1182/blood-2008-08-078220.
36. Pietras EM, Reynaud D, Kang YA, Carlin D, Calero-Nieto FJ, Leavitt AD, Stuart JM, Göttgens B, Passegué E. Functionally distinct subsets of lineage-biased multipotent progenitors control blood production in normal and regenerative conditions. *Cell Stem Cell*. 2015;17:35–46. doi: 10.1016/j.stem.2015.05.003.
37. Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem*. 1995;270:29083–29089. doi: 10.1074/jbc.270.49.29083.
38. Flier JS, Mueckler MM, Usher P, Lodish HF. Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. *Science*. 1987;235:1492–1495. doi: 10.1126/science.3103217.
39. Murakami T, Nishiyama T, Shirotani T, Shinohara Y, Kan M, Ishii K, Kanai F, Nakazuru S, Ebina Y. Identification of two enhancer elements in the gene encoding the type 1 glucose transporter from the mouse which are responsive to serum, growth factor, and oncogenes. *J Biol Chem*. 1992;267:9300–9306.
40. Wang M, Subramanian M, Abramowicz S, Murphy AJ, Gonen A, Witztum J, Welch C, Tabas I, Westerterp M, Tall AR. Interleukin-3/granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor promotes stem cell expansion, monocytosis, and atheroma macrophage burden in mice with hematopoietic ApoE deficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:976–984. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.303097.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

41. Dawson AG. Oxidation of cytosolic NADH formed during aerobic metabolism in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*. 1979;4:171–176. doi: 10.1016/0968-0004(79)90417-1.
42. Kauppinen RA, Sihra TS, Nicholls DG. Aminooxyacetic acid inhibits the malate-aspartate shuttle in isolated nerve terminals and prevents the mitochondria from utilizing glycolytic substrates. *Biochim Biophys Acta*. 1987;930:173–178. doi: 10.1016/0167-4889(87)90029-2.
43. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. 2005;120:237–248. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.046.
44. Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, Tripp R, Lutteropp M, Sadighi-Akha E, Stranks AJ, Glanville J, Knight S, Jacobsen SE, Kranc KR, Simon AK. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med*. 2011;208:455–467. doi: 10.1084/jem.20101145.
45. Rožman S, Yousefi S, Oberson K, Kaufmann T, Benarafa C, Simon HU. The generation of neutrophils in the bone marrow is controlled by autophagy. *Cell Death Differ*. 2015;22:445–456. doi: 10.1038/cdd.2014.169.
46. Nishizawa T, Kanter JE, Kramer F, Barnhart S, Shen X, Vivekanandan-Giri A, Wall VZ, Kowitz J, Devaraj S, O'Brien KD, Pennathur S, Tang J, Miyaoka RS, Raines EW, Bornfeldt KE. Testing the role of myeloid cell glucose flux in inflammation and atherosclerosis. *Cell Rep*. 2014;7:356–365. doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.028.
47. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324:1029–1033. doi: 10.1126/science.1160809.
48. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 2008;7:11–20. doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.002.
49. Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27:441–464. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
50. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 2005;7:77–85. doi: 10.1016/j.ccr.2004.11.022.
51. Parathath S, Yang Y, Mick S, Fisher EA. Hypoxia in murine atherosclerotic plaques and its adverse effects on macrophages. *Trends Cardiovasc Med*. 2013;23:80–84. doi: 10.1016/j.tcm.2012.09.004.
52. Macintyre AN, Gerriets VA, Nichols AG, Michalek RD, Rudolph MC, Deoliveira D, Anderson SM, Abel ED, Chen BJ, Hale LP, Rathmell JC. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab*. 2014;20:61–72. doi: 10.1016/j.cmet.2014.05.004.
53. Weber GF, Chousterman BG, He S, et al. Interleukin-3 amplifies acute inflammation and is a potential therapeutic target in sepsis. *Science*. 2015;347:1260–1265. doi: 10.1126/science.aaa4268.
54. Dutta P, Sager HB, Stengel KR, et al. Myocardial Infarction activates CCR2(+) hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell*. 2015;16:477–487. doi: 10.1016/j.stem.2015.04.008.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

Novelty and Significance

What Is Known?

- Increased hematopoietic metabolic activity can be visualized by noninvasive positron emission and computed tomographic imaging with ^{18}F-fluorodeoxyglucose, a glucose analog, not only in inflamed atherosclerotic plaques but also in the spleen of patients with cardiovascular diseases.
- Increased glucose metabolism is thought to be crucial for cellular proliferation, but direct evidence of its role in hematopoiesis is lacking.

What New Information Does This Article Contribute?

- The induction of Glut1 in *ApoE*$^{-/-}$ hematopoietic stem and progenitor cells is the consequence of the growth-regulatory effects of IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor driving glycolytic substrate utilization by mitochondria.
- Deletion of the *Glut1* gene limits the enhanced glycolytic and mitochondrial activity of *ApoE*$^{-/-}$ hematopoietic stem and progenitor cells, attenuating the high-energy demand of these cells for proliferation and expansion and preventing the development of atherosclerosis.
- These findings suggest the presence of proatherogenic cross-talk between nutritional and growth factor signaling pathways in hematopoietic stem and progenitor cells.

The enhanced metabolic activity visualized by noninvasive positron emission and computed tomographic imaging with ^{18}F-fluorodeoxyglucose, a glucose analog, in inflamed atherosclerotic plaques and spleen of patients with cardiovascular diseases suggests a link between hematopoietic activity and atherosclerosis. We evaluated this hypothesis by investigating the contribution of Glut1 in the hematopoietic compartment to the development of atherosclerosis in *ApoE*$^{-/-}$ mice. We found that hematopoietic Glut1 deficiency decreased atherosclerosis by preventing hematopoietic stem and progenitor cell proliferation, myelopoiesis, and the recruitment of myeloid cells in atherosclerotic lesions independent of plasma lipid profile. In *ApoE*$^{-/-}$ hematopoietic stem and progenitor cells, Glut1 serves as a key metabolic sensor for the high-energy demand of these cells for proliferation favoring glycolytic substrate utilization by mitochondria. These results provide direct evidence showing that (1) Glut1 connects the enhanced glucose uptake in atheromatous plaques and spleen of *ApoE*$^{-/-}$ mice with their myelopoiesis and (2) the activation of Glut1 in hematopoietic stem and progenitor cells of preclinical model of atherosclerosis is proatherogenic. Thus, inhibition of glucose uptake by a Glut1 inhibitor that does not cross the blood–brain barrier may be useful in the treatment of atherosclerosis.

Circulation Research
Journal of the American Heart Association

Disruption of Glut1 in Hematopoietic Stem Cells Prevents Myelopoiesis and Enhanced Glucose Flux in Atheromatous Plaques of *ApoE*$^{-/-}$ Mice

Vincent Sarrazy, Manon Viaud, Marit Westerterp, Stoyan Ivanov, Sophie Giorgetti-Peraldi, Rodolphe Guinamard, Emmanuel L. Gautier, Edward B. Thorp, Darryl C. De Vivo and Laurent Yvan-Charvet

Circ Res. 2016;118:1062-1077; originally published online February 29, 2016;
doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307599
Circulation Research is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Copyright © 2016 American Heart Association, Inc. 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/content/118/7/1062

Data Supplement (unedited) at:
http://circres.ahajournals.org/content/suppl/2016/02/29/CIRCRESAHA.115.307599.DC1.html

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation Research* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the Permissions and Rights Question and Answer document.

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

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

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ at INSERM - DISC on August 19, 2016

Supplemental Material

Disruption of Glut1 in hematopoietic stem cells prevents myelopoiesis and enhanced glucose flux in atheromatous plaques of *ApoE*$^{-/-}$ mice.

Vincent Sarrazy*, Manon Viaud*, Marit Westerterp, Stoyan Ivanov, Sophie Giorgetti-Peraldi, Rodolphe Guinamard, Emmanuel L Gautier, Edward B Thorp, Darryl C. De Vivo and Laurent Yvan-Charvet.

Supplemental Experimental procedures

Competitive BM transplantation

Competitive BM transplantation was performed as previously described.[1] In brief, CD45.1^{+} *ApoE*$^{-/-}$ BM isolated from congenic CD45.1^{+} *ApoE*$^{-/-}$ mice on the C57/BL6 background was mixed with either CD45.2^{+} *ApoE*$^{-/-}$ or CD45.2^{+} *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM (ratio 1:1) before transplantation into lethally irradiated C57/BL6 WT recipient mice.

White blood cell counts

Leukocytes, differential blood counts, platelets, mean platelet volume (MPV), erythrocytes and hematocrit were quantified from whole blood using a hematology cell counter (Hemavet, Beckman Coulter).

Blood parameters

Plasma LDL-C, HDL-C and glucose levels were determined using commercial kits (all from Wako Diagnostics).

Histological analysis of proximal aortas

Mice were sacrificed and heart was harvested. Heart was washed with PBS then fixed with 4% paraformaldehyde. Heart was embedded in paraffin and 5µm sections of proximal aortas were performed using a Microm HM340E microtome (Microm Microtech, Francheville France) and stained with H&E as previously described.[1] Aortic lesion size of each animal was calculated as the mean of lesion areas in 6 sections from the same mouse using ImageJ software calibrated with parameters of the Leica DM5500 B (Leica Microsystemes SAS, Nanterre, France) microscope. Atherosclerotic lesions were expressed in µm2 per section.

Immunohistochemistry

Cells fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with PBS containing 0.1% Triton X100 (Sigma). Unspecific staining was avoided with a blocking step in PBS 0.1% Triton X100 3% FBS. Antibodies anti F4/80, was from Cell Signaling and used as recommended by the manufacturer. Dilution for antibodies was 1/100. Slides were mounted in fluorescence mounting medium Vectamount (Vector laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA). Pictures were taken as previously described,[1] enhanced for publication purposes and the number of positive cells were counted using ImageJ software. Count was performed 3 times per slice of tissue and the average reported.

Monocyte labeling and tracking *in vivo*. Classical Ly6C^{hi} monocytes were labeled as previously described.[2] Briefly, mononuclear cells were first transiently depleted by *i.v.* injection of 250µl clodronate-loaded liposomes (FormuMax, Sunnyvale, CA, USA) and 2 days later, Ly6C^{hi} monocytes were labeled *in vivo* by retro-orbital *i.v.* injection of 1µm Fluoresbrite green fluorescent (YG) plain microspheres (Polysciences Inc.), diluted 1:4 in

sterile PBS. Labeling efficiency (i.e, engulfment of latex beads) was verified in peripheral monocytes by flow cytometry 1 day after labeling and 2 days later, mice were sacrificed and the heart and aorta were perfused and isolated. Histological analysis of proximal aortas was performed as described above in a blinded manner and the mean number of latex$^+$ cells per section was determined. Nuclei were revealed with DAPI staining. Aortic arches were subjected to enzymatic digestion with a mix of collagenases I and XI (450 and 125 U/mL, respectively) and prepared for flow cytometry analysis of latex$^+$ cells per aortic arch.

***Ex vivo* 2-[14C]-DG uptake**
In some experiments, mice were sacrificed and aortic arch and spleen were harvested and weighed. Tissues were perfused with PBS. BM cells were collected from leg bones. Splenocytes were isolated by manual disruption of the spleen through a 40-μm cell strainer with PBS. Whole aortic arch (normalized to similar tissue weight) and isolated BM cells and splenocytes were incubated with 0.1μCi 2-[^{14}C]-deoxyglucose (2-[^{14}C]-DG) in 2% BSA Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4 for 10min at 37°C, washed 3times with PBS and homogenized with 5% HClO4 solution. The radioactivity incorporated was measured and expressed as total radioactivity per tissue weight.

Splenic HSPCs and hematopoietic progenitors
Isolation of splenocytes for flow cytometry analysis was achieved as follows. Spleens were dissected from mice, perfused with PBS, and a cell suspension was obtained by manual disruption through a 40-μm cell strainer with PBS. The cellular mix was then centrifuged and subjected to a brief RBC lysis. Specific HSPC and hematopoietic progenitor subsets were identified by flow cytometry as described for BM cells.

Flow cytometry analysis of intracellular pimonidazole (Pimo)
12-week old WT and *Apoe*$^{-/-}$ mice were *i.v* injected with 60mg/kg Pimonidazole (Pimo; Hydpoxyprobe) 90 min before sacrifice according to the manufacturer's instructions. BM cells were stained as decribed in the 'flow cytometry analysis' section. Cells were then fixed and permeabilized with BD Perm Wash kit (BD Biosciences). Intracellular Pimo adducts were detected using an anti-Pimo FITC antibody provided in the Hydpoxyprobe Kit.

Bone marrow harvest and treatment. Primary BM cells were resuspended in IMDM (Gibco) containing 10% FCS (Stemcell) and cultured for 1h in tissue culture flasks to remove adherent cells, including macrophages. Succinate dehydrogenase (SDH) activity was determined by an ELISA kit according to the manufacturer's instructions (MitoSciences). In some experiments, mice were i.p injected with 150mg/kg 5-fluorouracil for 3 days to enrich hematopoietic stem cells in BM cultures as indicated in the figure legend. Suspended cells were then cultured for 72h in the presence of 6ng/mL IL-3 or 2ng/mL GM-CSF, Flt3L or TPO (all from R&D Systems). In some experiments, the farnesyl transferase inhibitor (FTI, Calbiochem) was used at the final concentration of 1μM, the lactate dehydrogenase inhibitor (oxamate, Sigma-Aldrich) at 50mM, the pyruvate dehydrogenase inhibitor (CPI-613, Tocris Bioscience) at 200μM, the pyruvate carboxylase inhibitor (chlorothricin, Cayman Chemical) at 100μM, the glutamate oxaloacetate transaminase inhibitor (AOA, Sigma-Aldrich) at 2mM, the mitochondrial complex I inhibitor (rotenone, Cayman Chemical) at 1μM, the succinate dehydrogenase inhibitor (3-NPA, Sigma-Aldrich) at 100μM, the acetyl-coA carboxylase inhibitor (Tofa, Sigma-Aldrich) at 10μM, tha AMPK activator (Metformin, Sigma-Aldrich) at 5mM, the IL3Rβ blocking antibody (R&D Systems) at 10μg/mL and Cyclodextrin (CD, Sigma-Aldrich) at 2,5mM. BM cells were also cultured in an hypoxic chamber (1% oxygen) for 6hours as indicated in the figure legend.

Lin$^-$ bone marrow cell cultures. Hematopoietic stem and progenitor cells were isolated by FACS sorting of lineage depleted (Lin$^-$) bone marrow from *ApoE*$^{-/-}$ recipient mice transplanted with WT, *Glut1*$^{+/-}$, *ApoE*$^{-/-}$ and *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM. Lin$^-$ BM cells (0.5x10^6 cells) were

resuspended in IMDM (Gibco) containing 10% FCS (Stemcell) and cultured for 72h in the presence or absence of 6ng/mL IL-3 before analysis by flow cytometry.

Colony-Forming Assay and *in vitro* 2-[14C]-DG uptake
Primary bone cells ($4x10^4$) were plated in methylcellulose-based media containing a cocktail of recombinant cytokines including SCF, IL-3 and IL-6 (Methocult, Stemcell) supplemented with 2% FCS to generate multipotential progenitor cells (CFU-GEMM) and in presence of additional GM-CSF (2ng/mL, R&Dsystems) to generate granulocyte-macrophage progenitors (CFU-GM) as previously described.[1] In some conditions, cultures were performed in 5.6mM glucose (DMEM low glucose, Gibco) rather than 25mM glucose (standard DMEM, Gibco) as described in the figure legends. After 10 days of differentiation, the number of CFUs per dish was scored or colonies were extensively washed with PBS to dissociate them from the methylcellulose-based media and were incubated with 0.1µCi 2-deoxy-[^{14}C]-glucose (2-[^{14}C]-DG) in 2% BSA Krebs-Ringer bicarbonate buffer, pH 7.4 for 10min at 37°C. After 3 washes with PBS, colonies were homogenized with 5% HClO4 solution and the radioactivity incorporated into CFUs was determined by standard procedures using liquid scintillation counter.

Directed Metabolomic assays
Metabolomics analyses were performed at the Michigan core facility of the University of Michigan as previously described.[3] Briefly, Metabolites from Krebs cycle (Citrate, Succinate, Fumarate and Malate) were analyzed in WT and *Apoe*$^{-/-}$ deficient BM cells. Metabolites were extracted by exposing cells to a chilled mixture of 80% methanol, 10% chloroform, and 10% water and analyzed by LC-MS.

Respiration assays
Oxygen consumption was measured with the Oxygen Biosensor System in accordance with the manufacturer's recommendations (PreSens GmbH) and as previously described.[4] A total of 0.5 to $3x10^5$ cells/well were used. In studies where Lineage marker-positive and negative (Lin^+ and Lin^-) BM cells and Lin^-Sca1^+ progenitor cells were isolated for respiration analysis, magnetic lineage depletion and Sca1 enrichment (autoMACS separator, Miltenybiotec) were used. Adequate lineage depletion was confirmed by flow cytometry as previously described.[4] Oxygen consumption was determined after 2h of culture in the biosensor in presence or absence of 2µM oligomycin to inhibit mitochondrial ATP synthase.

Western blot analysis
The expression of HIF1α and LC3-II were measured in BM cell extracts by Western blot analysis as previously described.[1,3] Primary antibodies for HIF1α and LC3-I/II were purchased from Novus Biologicals and Cell Signaling Technology, respectively

qPCRs
qPCRs were performed on StepOne device from Applied Biosystem (France) using sybergreen reaction system. All the results were normalized on m36B4 gene expression. All conditions were performed in at least one experiment performed in triplicates.

Antibodies. CD45.1 (clone A20)-PE and CD45.2 (clone 104)-PercPCy5.5 were purchased from eBioscience. CD2 (RM2-5), CD3e (145-2C11), CD4 (GK1.5), CD8b (53-6.7), CD19 (eBio1D3), CD45R (B220, RA3-6B2), Gr-1 (Ly6G, RB6-8C5), Cd11b (Mac1, M1/70), Ter119 (Ly76) and NK1.1 (Ly53, PK136)-FITC were all from eBioscience and used for lineage determination. c-Kit (CD117, ACK2)-APCeFluor780 from eBioscience, Sca-1-Pacific blue from Biolegend, FcgRII/III-PE (CD16/32, 2.4G2), CD34 (RAM34)-AlexaFluor 647, CD135 (Flt3, A2F10)-PE, CD150 (Slamf1, TC15-12F12.2)-PECy7 were from Biolegend and used to quantify HSPCs and progenitor subsets. Peripheral leukocytes were stained with CD115 (AFS98)-APC, B220 or CD45R (RA3-6B2)-FITC, CD45 (30-F11)-APCCy7, Ly6C/G or Gr-1

(RB6-8C5)-PercPCy5.5, TCRβ (H57-597)-Pacific Blue, CD3 (17A2)-PE and CD8a (53-6.7)-PECy7 from eBioscience and BD Biosciences, respectively.

Statistical analysis

Data are shown as mean ± SEM. Statistical significance was performed using Prism t-test or ANOVA were performed according to the dataset. Results were considered as statistically significant when $P<0.05$.

References

1. Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S, Welch CL, Wang N, Randolph GJ, Snoeck HW, et al. ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. *Science*. 2010;328:1689–1693.

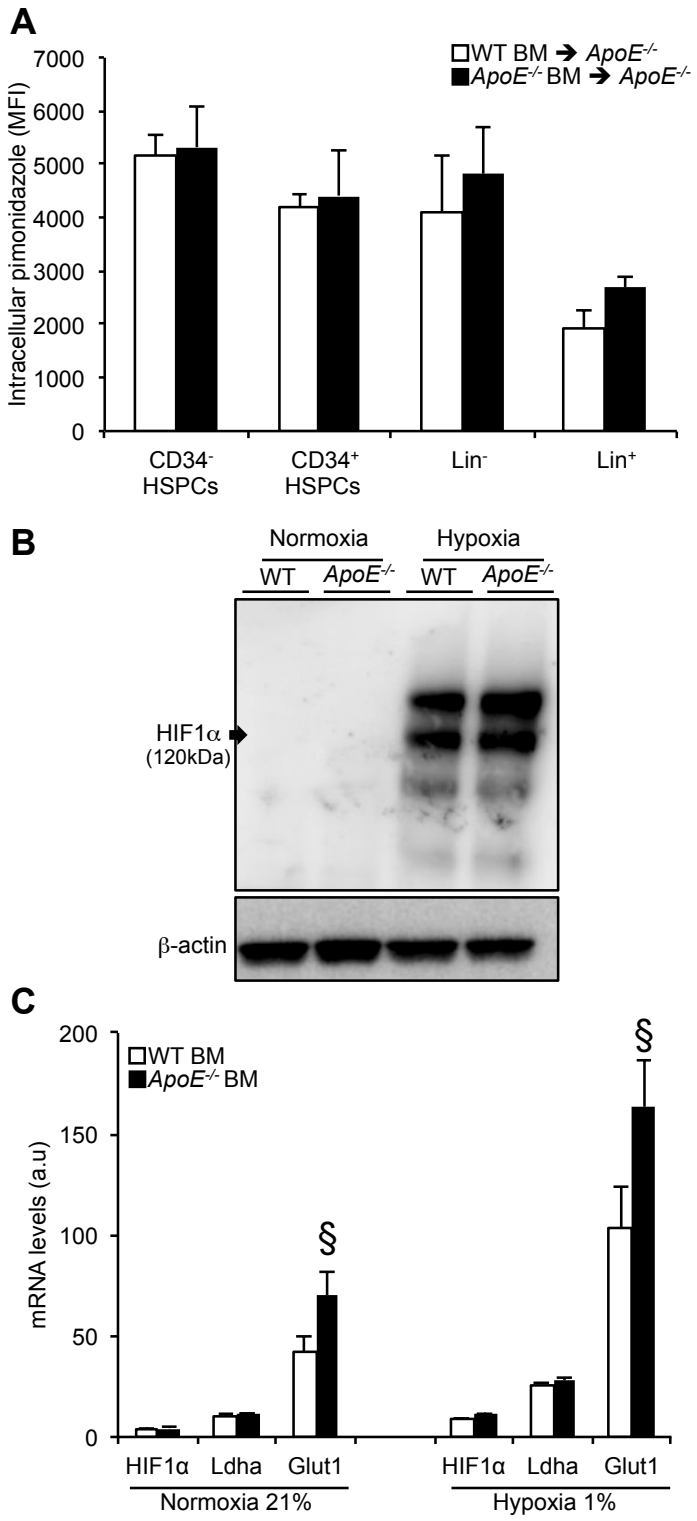
2. Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ, Jakubzick C, Spanbroek R, Llodra J, Garin A, Liu J, Mack M, van Rooijen N, Lira SA, Habenicht AJ, Randolph GJ. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 2007;117:185-194.

3. Gautier EL, Westerterp M, Bhagwat N, Cremers S, Shih A, Abdel-Wahab O, Lütjohann D, Randolph GJ, Levine RL, Tall AR and Yvan-Charvet L. HDL and Glut1 inhibition reverse a hypermetabolic state in mouse models of myeloproliferative disorders. *J Exp Med*. 2013;210:339–353.

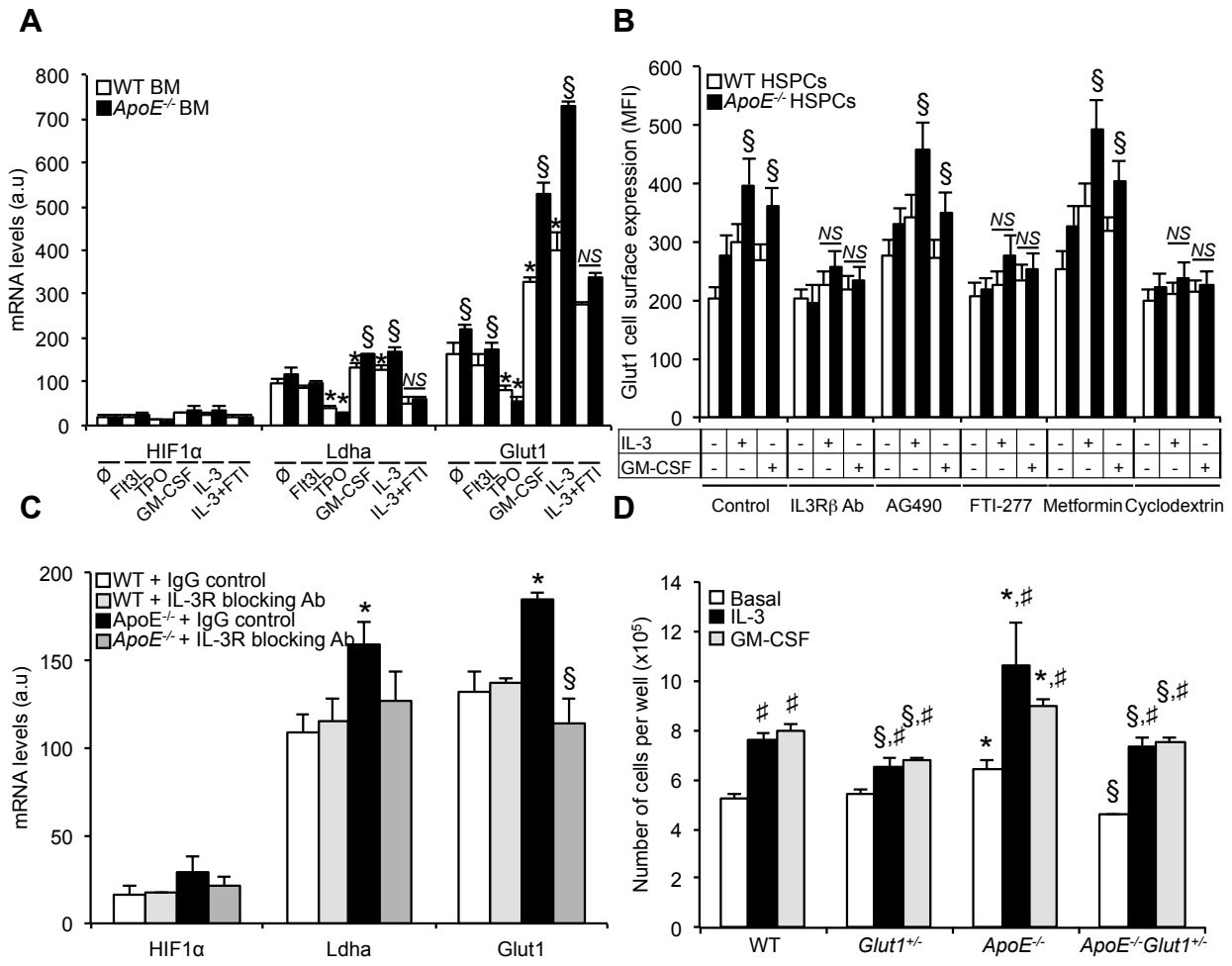
4. Simsek T, Kocabas F, Zheng J, DeBerardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, Schneider, JW, Zhang CC, Sadek HA. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2010;7:380-390.

	WT BM ➔ *ApoE*$^{-/-}$ (n=6)	*Glut1*$^{+/-}$ BM ➔ *ApoE*$^{-/-}$ (n=6)	*ApoE*$^{-/-}$ BM ➔ *ApoE*$^{-/-}$ (n=10)	*ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM ➔ *ApoE*$^{-/-}$ (n=12)
Hematologic parameters				
Spleen (mg)	90±14	64±8	124±13*	85±9§
Platelets (x10^3/μL)	665±17	646±15	728±59	671±67
MPV (x10^3/μL)	5,3±0,1	5,4±0,1	5,1±0,1	5,3±0,1
Erythrocytes (x10^6/μL)	8,2±0,7	8,3±0,6	8,9±0,2	8,4±0,3
Hematocrit (%)	37,1±3,1	36,0±2,2	43,7±0,9	37,9±1,3
Metabolic parameters				
Body weight (g)	21.7±0.5	22.5±0.6	21.9±0.6	21.2±0.7
Plasma LDL-C(mg/dL)	146±36	126±43	1055±124	1002±102
Plasma HDL-C (mg/dL)	68±22	94±12	164±23	142±27
Plasma glucose (g/L)	1.8±0.2	1.8±0.3	3.1±0.2	3.0±0.2

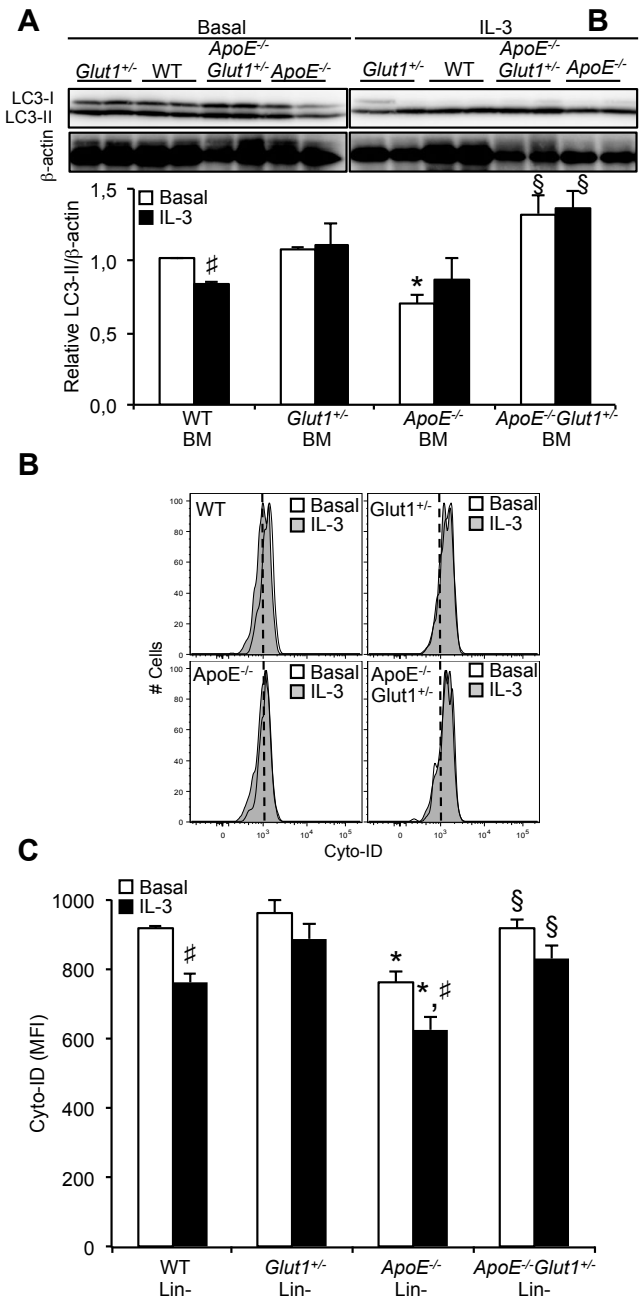
Supplemental Table I: Hematologic and metabolic parameters of *Apoe*$^{-/-}$ mice transplanted with WT, *Glut1*$^{+/-}$, *Apoe*$^{-/-}$, *Apoe*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM after 12 weeks of high-fat diet. Values are mean ± SEM.



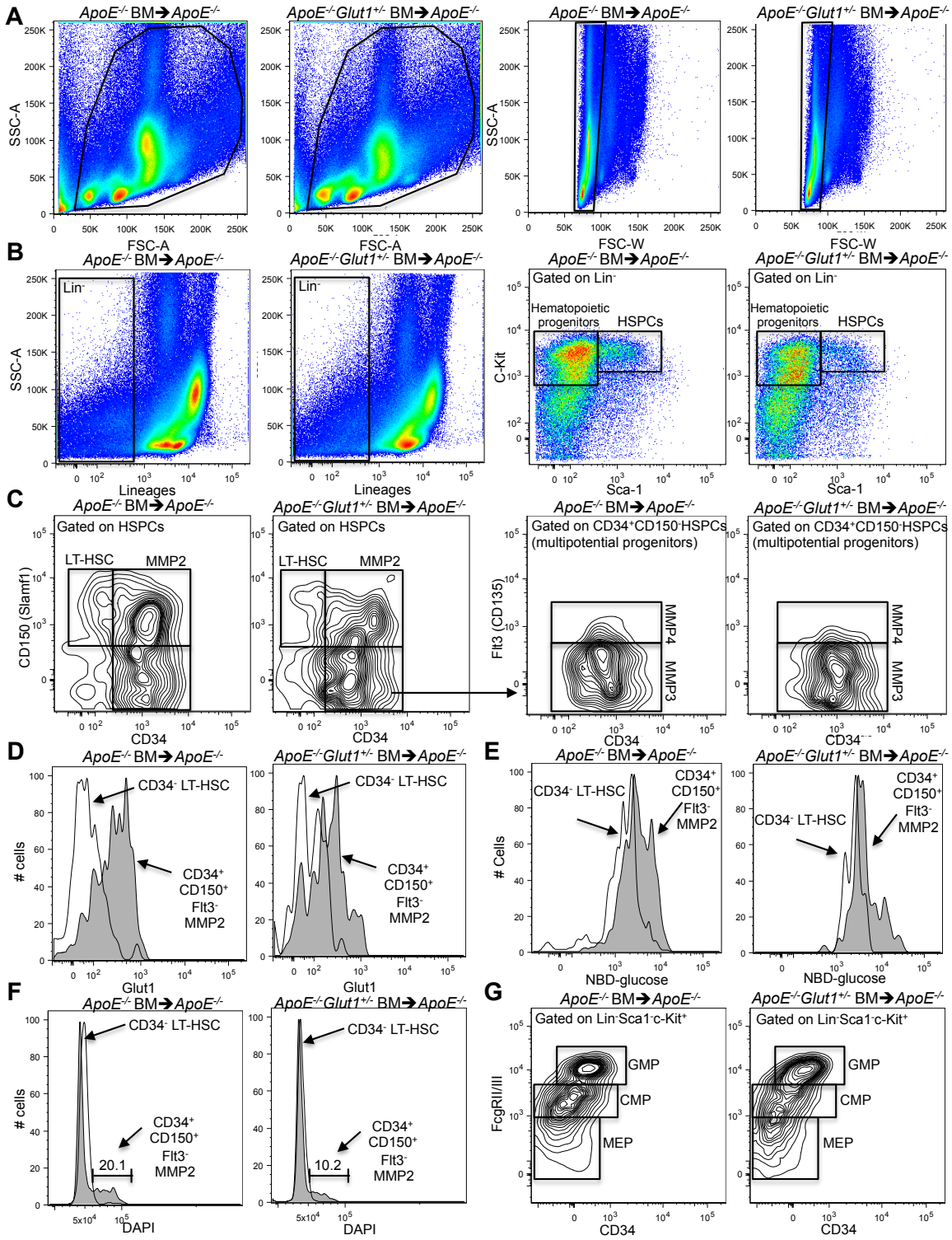
Supplemental Figure I. HIF1α-independent regulation of Glut1 in *ApoE*$^{-/-}$ BM cells. (A) Oxygenation status measured by flow cytometry using a fluorescent pimonidazole (Pimo) dye in Lineage marker (Lin)$^{-}$, Lin^{+} and CD34^{-} or CD34^{+} HSPCs isolated from the BM of chow fed *ApoE*$^{-/-}$ recipients transplanted with WT or *ApoE*$^{-/-}$ BM, 12weeks after the transplantation procedure. **(B)** Western blot analysis of HIF1α and **(C)** mRNA expression of HIF1α and HIF1α target genes (Ldha and Glut1) in BM cells exposed to normoxia (21% O_2) or hypoxia (1% O_2) for 6hours.



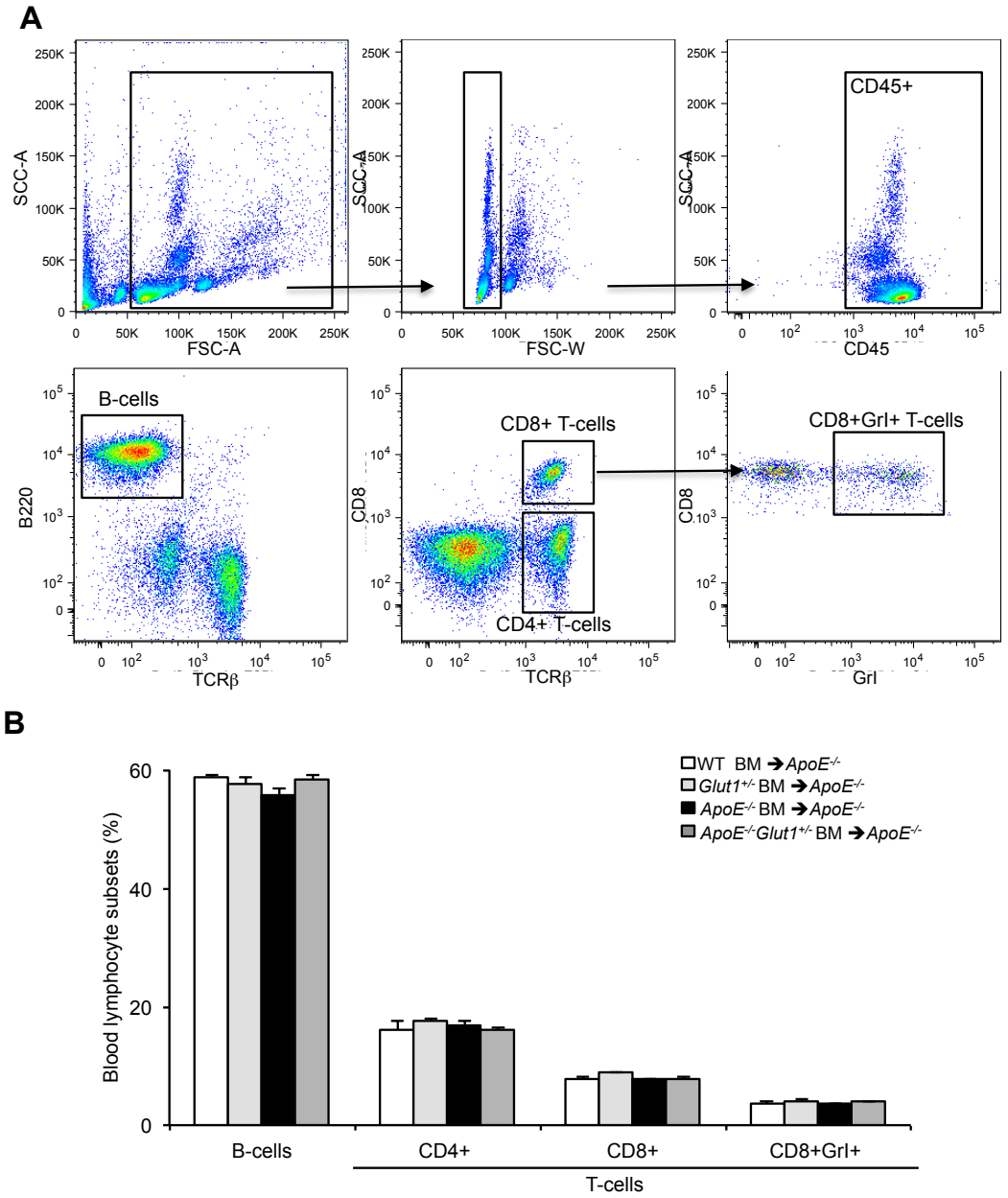
Supplemental Figure II. IL3Rβ-dependent regulation of Glut1 and Glut1 dependency on cell expansion in *ApoE*$^{-/-}$ BM cells. (A) mRNA expression of HIF1α and HIF1α target genes Ldha and Glut1 in BM cells treated for 72 hours with the indicated growth hormones and in the presence or absence of 1μM farnesyl transferase inhibitor (FTI). **(B)** Glut1 cell surface expression (expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) in HSPCs after BM cells were cultured for 72 hours with the indicated treatments (10μg/mL IL3Rβ blocking antibody; 1μM farnesyl transferase inhibitor (FTI); 5mM AMPK activator (Metformin); 2.5mM Cyclodextrin (CD)). **(C)** mRNA expression of HIF1α and HIF1α target genes Ldha and Glut1 in BM cells freshly isolated from 20 weeks old WT and *ApoE*$^{-/-}$ mice that were injected with IgG control or 100μg IL-3Rβ blocking antibody for 24h. Values were normalized to ribosomal m36B4. **(D)** WT, *Glut1*$^{+/-}$, *ApoE*$^{-/-}$, and *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ Lin^{-} cells (i.e, enriched in HSPCs) were cultured for 72h in liquid culture in presence or absence of 6ng/mL IL-3 or 2ng/mL GM-CSF and the number of cells per well was quantified. Results are means ± SEM of experiments performed with 6-10 animals per group or cultures performed in triplicates. *P<0.05 *vs.* WT, $^{\S}P$<0.05 *vs. ApoE*$^{-/-}$ and $^{\#}P$<0.05 *vs.* untreated conditions.



Supplemental Figure III. IL3Rβ-dependent regulation of autophagy in *ApoE*$^{-/-}$ BM cells. (A) Western blot analysis of LC3 in BM cells cultured with or without 6ng/mL IL-3 for 24 hours. Bars represent LC3-II/β-actin relative expression. **(B)** Autophagic flux was quantified using the Cyto-ID probe by flow cytometry and **(C)** expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) in HSPCs after *in vitro* culture with or without 6ng/mL IL-3 for 72 hours. Results are means ± SEM of experiments performed with 6-10 animals per group or cultures performed in triplicates. *P<0.05 *vs.* WT, $^{\S}P$<0.05 *vs. ApoE*$^{-/-}$ and $^{\#}P$<0.05 *vs.* untreated conditions.



Supplemental Figure IV. Multiparameter flow cytometric analysis. Representative dot plots and gating strategies used to characterize hematopoietic stem and progenitor cells. **(A)** Single live BM cells were selected by exclusion of low forward and side scatter populations (debris) and doublets. **(B)** Cells were then gated for Lin$^-$ and Sca$^+$c-kit$^+$ (HSPCs) or Sca$^-$c-kit$^+$ populations. **(C)** HSPC gates were further subdivided into four HSPC populations based on differential expression of CD34, CD150 and Flt3 (CD135): CD34$^-$CD150$^+$Flt3$^-$ long-term LT-HSCs and CD34$^+$CD150$^+$Flt3$^-$, CD34$^+$CD150$^-$Flt3$^-$ and CD34$^+$CD150$^-$Flt3$^+$ multipotential progenitors (MPP2, MPP3 and MPP4, respectively). Representative flow cytometry analysis of **(D)** Glut1, **(E)** NBD-glucose and **(F)** DAPI stainings in LT- and MMP2 from the BM of high-fat diet fed *ApoE$^{-/-}$* mice transplanted with WT, *Glut1$^{+/-}$, ApoE$^{-/-}$, ApoE$^{-/-}$Glut1$^{+/-}$* BM. **(G)** Lin$^-$ Sca$^-$c-kit$^+$ gates were further divided into granulocyte-monocyte progenitor (GMP), common myeloid progenitor (CMP) and megakaryocyte erythrocyte compartments.



Supplemental Figure V. Glut1 deficiency does not alter lymphocyte homeostasis in *ApoE*$^{-/-}$ BM transplanted mice. Analysis of peripheral blood lymphocyte subsets by flow cytometry in *ApoE*$^{-/-}$ recipient mice transplanted with WT, *Glut1*$^{+/-}$, *ApoE*$^{-/-}$, *ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM and fed a high-fat diet for 12 weeks. **(A)** Representative dot plots and **(B)** histograms showing the quantification of B220^{+} B-lymphocytes, CD4^{+} T-lymphocytes, CD8^{+} T-lymphocytes and CD8^{+}GrI^{+} T-lymphocytes. Results are means ± SEM and are representative of an experiment performed with n=6 (WT and *Glut1*$^{+/-}$ BM transplanted into *ApoE*$^{-/-}$ recipients) or n=10-12 (*ApoE*$^{-/-}$ *and ApoE*$^{-/-}$*Glut1*$^{+/-}$ BM transplanted into *ApoE*$^{-/-}$ recipients) animals per groups.

Papier 2

« Lysosomal cholesterol hydrolysis couples efferocytosis to anti-inflammatory oxysterol production. »

Comme je l'ai exposé dans l'introduction, l'efferocytose est un processus clé dans le maintien de la stabilité des plaques d'athérosclérose. En effet, lorsque ce processus fait défaut au sein de la plaque, elle devient instable et se rompt plus rapidement, aboutissant à des conséquences dramatiques. En capturant les cellules apoptotiques, les macrophages jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie des plaques d'athérosclérose mais aussi dans l'intégrité tissulaire. En effet, cela prévient le relargage des peptides immunogènes et de lipides qui participent à une inflammation locale. Une fois la cellule apoptotique ingérée le macrophage doit faire face à une quantité importante de matériel cellulaire et en particulier du cholestérol. Dans ce cadre, un des acteurs clé est la lipase acide lysosomale (LAL ou LIPA). L'enzyme LIPA est la seule enzyme connue à pouvoir hydrolyser les esters de cholestérol en cholestérol libre afin qu'il soit métabolisable par la cellule. Les patients présentant une déficience pour cette enzyme sont atteints de multiples complications, notamment un développement accru de plaques d'athérosclérose due à une accumulation de lipides et de macrophages spumeux au sein des vaisseaux. Ces données suggèrent un rôle central de l'enzyme LIPA dans les cellules myéloïdes. Comme nous l'avons déjà abordé dans l'introduction, les macrophages font face à une quantité importante de lipides après endocytose via le récepteur CD36, qui permet d'activer la FAO mitochondriale. Ils sont aussi capables de mobiliser les lipides via la fusion des gouttelettes lipides et des lysosomes. De plus un défaut de ces voies est impliqué dans la production de cytokines pro-inflammatoires, c'est ce que l'on appelle l'inflammation stérile.

Nous nous sommes alors intéressés au rôle de l'hydrolyse du cholestérol par l'enzyme LIPA dans des conditions d'efferocytose. Dans un premier temps, j'ai pu démontrer que LIPA était essentielle à une efferocytose fonctionnelle. En effet, si nous traitons les macrophages *in vitro* avec un inhibiteur spécifique de LIPA, le pourcentage de macrophages ayant captés une cellule apoptotique (efferocytes) est fortement diminué. Nous avons pu démontrer que LIPA joue un rôle essentiel dans la production des dérivés du cholestérol tels que le 25-hydroxycholestérol (25-OHC) ou le 27-hydroxycholestérol (27-OHC). La diminution de la production de 25-OHC induit un défaut de contact entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (aussi appelé membranes associées à la mitochondrie ou MAM). Cela provoque une modification du métabolisme mitochondrial qui conduit à une activation de l'inflammasome NLRP3. Ce niveau d'inflammation supérieur dans la cellule provoque aussi

des altérations structurelles. En effet, la phagocytose des cellules apoptotiques nécessite un réarrangement du cytosquelette, notamment pour former la coupe phagocytaire. Ainsi, lorsque LIPA est inhibée la protéine Rac-1 ne se localise plus au niveau de la coupe phagocytaire, participant ainsi au défaut d'efferocytose observé. Les 25- et 27-OHC sont aussi connus pour être des agonistes des LXR. Ainsi leur défaut de production provoque une réduction de l'activation des voies dépendantes des LXRs, telles que l'efflux de cholestérol et les voies de clairance des cellules apoptotiques (i.e. régulation de l'expression de MerTK).

En parallèle, nous avons confirmé que l'inhibition de LIPA chez les souris provoquait un défaut d'efferocytose. Après injection de cellules apoptotiques ou d'érythrocytes stressés, nous avons mis en évidence un défaut d'efferocytose par les macrophages du foie et de la rate. Cela se traduit aussi pas une splénomégalie et un dépôt de fer dans la rate chez des souris hypercholestérolémiques.

Pour conclure, nos données placent l'enzyme LIPA au cœur de la réponse efferocytique des macrophages aussi bien dans l'athérosclérose que dans le maintien de l'intégrité des tissus. Dans un cadre plus large, cela place aussi LIPA comme un acteur clé dans la régulation de l'inflammation.

Lysosomal Cholesterol Hydrolysis Couples Efferocytosis to Anti-Inflammatory Oxysterol Production

Manon Viaud[1], Stoyan Ivanov[1], Nemanja Vujic[3], Madalina Duta-Mare[3], Lazaro-Emilio Aira[1], Thibault Barouillet[2], Elsa Garcia[1], Francois Orange[4], Isabelle Dugail[5], Isabelle Hainault[6], Christian Stehlik[7], Sandrine Marchetti[1], Laurent Boyer[1], Rodolphe Guinamard[1], Fabienne Foufelle[6], Andrea Bochem[8], Kees G Hovingh[9], Edward B Thorp[7], Emmanuel L Gautier[5], Dagmar Kratky[3], Paul Dasilva-Jardine[10], Laurent Yvan-Charvet[1]

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U1065, Université Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Atip-Avenir, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Oncoage, 06204 Nice, France; [2]Acquire Innovation Ltd, Coliemore House, Coliemore Road, A96A8D5 Dakley CO. Dublin, Ireland; [3]Gottfried Schatz Research Center for Cell Signaling, Metabolism & Aging, Molecular Biology and Biochemistry, Medical University of Graz, Graz, Austria; [4]UFR Sciences, Faculté des Sciences de l'Université de Nice- Sophia Antipolis, Parc Valrose, 28 avenue Valrose, 06108 Nice, France; [5]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR_S 1166, Pierre & Marie Curie University, ICAN Institute of Cardiometabolism & Nutrition, Hôpital de la Pitié, Boulevard de l'Hôpital, 75006 Paris, France; [6] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) UMRS 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006, Paris, France; [7]Feinberg Cardiovascular Research Institute, Department of Pathology, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL 60611; [8]Cardiology, Academic Medical Center, Amsterdam, the Netherlands; [9] Department of Vascular Medicine, Academic Medical Center, Amsterdam, The Netherlands, and; [10]Staten Biotechnology, 5 TransistorWeg Nijmegen, The Netherlands.

*M.V. and S.I. contributed equally to this work

Running title: LIPA and Efferocytic Inflammation

Subject Terms:
Inflammation
Lipids and Cholesterol
Metabolism

Address correspondence to:
Dr. Laurent Yvan-Charvet
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) U1065
Université Côte d'Azur
Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M)
Atip-Avenir
Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) Oncoage
06204 Nice
France
yvancharvet@unice.fr

In February 2018, the average time from submission to first decision for all original research papers submitted to *Circulation Research* was 12 days.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

Circulation Research ONLINE FIRST

ABSTRACT

***Rationale*:** Macrophages face a substantial amount of cholesterol following the ingestion of apoptotic cells and the lysosomal acid lipase (LIPA) has a major role in hydrolyzing cholesteryl esters in the endocytic compartment.

***Objective*:** Here, we directly investigated the role of LIPA-mediated clearance of apoptotic cells both in vitro and in vivo.

Methods and Results: We show that LIPA inhibition causes a defective efferocytic response due to impaired generation of 25-OHC and 27-OHC. Reduced synthesis of 25-OHC after LIPA inhibition contributed to defective mitochondria associated membrane (MAM) leading to mitochondrial oxidative stress-induced NLRP3 inflammasome activation and caspase 1-dependent Rac1 degradation. A secondary event consisting of failure to appropriately activate liver X receptor-mediated pathways led to mitigation of cholesterol efflux and apoptotic cell clearance. In mice, LIPA inhibition caused defective clearance of apoptotic lymphocytes and stressed erythrocytes by hepatic and splenic macrophages, culminating in splenomegaly and splenic iron accumulation under hypercholesterolemia.

***Conclusions*:** Our findings position lysosomal cholesterol hydrolysis as a critical process that prevents metabolic inflammation by enabling efficient macrophage apoptotic cell clearance.

Keywords:
Lysosomal acid lipase (LIPA), oxysterols, efferocytosis, inflammation, macrophage, cholesterol.

Nonstandard Abbreviations and Acronyms:

AL	Apoptotic lymphocytes
ATMs	Adipose tissue macrophages
CESD	Cholesteryl Ester Storage Disease
E	Endoplasmic reticulum
GRP78	78 kDa glucose-regulated protein
GWAS	Genome-wide association studies
HDL	High-density lipoprotein
KC	Kupffer cells
LAP	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)-associated phagocytosis
LDL	Low-density lipoprotein
LIPA	Lysosomal acid lipase
LPS	Lipopolysaccharide
MAM	Mitochondria associated membrane
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain containing
NOX2	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 2
OCR	Oxygen consumption rate
OXPHOS	Oxidative phosphorylation
PMs	Peritoneal Macrophages
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RBC	Red blood cell
ROS	Reactive oxygen species
RPMs	Red pulp macrophages
TFEB	Transcription factor E-box

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

American Heart Association Circulation Research ONLINE FIRST

INTRODUCTION

Macrophages regulate tissue homeostasis through the uptake and catabolism of plasma lipoproteins, thus avoiding ectopic lipid deposition.[1,2] Tissue integrity also results from the efficient efferocytic capacity of macrophages to prevent the leakage of immunogenic peptides and lipid contents from dying cells.[3,4] When macrophages ingest modified lipoproteins or apoptotic cells, they increase their cellular contents and metabolic load. Excess cholesterol delivered to macrophages by these pathways must be processed within the lysosome and then re-esterified for storage leading to noncytotoxic macrophage foam cell formation.[5-7] Excess cholesterol can also be exported to extracellular acceptors via cholesterol efflux pathways to prevent the cytotoxic effects associated with elevated free cholesterol within the endoplasmic reticulum (ER) or the formation of cholesterol crystals within the lysosome.[8,9] The efflux of cholesterol is governed by liver X receptors (LXRs), which are members of the nuclear receptor superfamily that not only sense an excess of cholesterol but also regulate genes involved in anti-inflammatory responses.[7,10]

Lysosomal acid lipase (LIPA) is a unique acid hydrolase enzyme that breaks down fatty material within the lysosomal compartment of cells. In humans and mice, LIPA deficiency is associated with multiple complications, including severe dyslipidemia, abnormal liver function, hepatomegaly, splenomegaly and accelerated atherosclerosis due to the accumulation of fatty deposits and the formation of pathogenic macrophage foam cells.[11,12] Interestingly, myeloid cell-specific re-expression of LIPA in LIPA-deficient mice corrects most of their inflammatory and tissue pathogenic phenotypes.[13] This finding suggests that macrophage LIPA expression plays a non-redundant role in tissue lipid homeostasis by preventing metabolic inflammation. However, the underlying molecular mechanisms that drive this inflammation remain to be elucidated.

In macrophages, LIPA hydrolyzes not only fatty materials upon CD36 scavenger receptor-mediated endocytosis to promote mitochondrial fatty acid oxidation,[14] but also cholesteryl esters upon the fusion of lipid droplets with lysosomes to support free cholesterol efflux, a process termed lipophagy.[15] This illustrates the pivotal role of LIPA at the interface of different catabolic pathways. Of note, the unabated uptake of modified lipoprotein-derived cholesterol and defective autophagy have been linked to sterile inflammation as a consequence of cholesterol crystal formation within macrophage lysosomes, promoting the assembly of the NLRP3 inflammasome and activation of caspase-1.[16,17] Although, a protective role of LIPA in macrophages during acute parasitic infection has recently emerged,[14] the contribution of LIPA-dependent processing of cholesteryl esters in sterile inflammation remains elusive.

To test the causal relationship between lysosomal cholesterol processing and macrophage function, we explored the role of LIPA after engulfment of apoptotic cells. We report here that LIPA is critical for efficient efferocytosis. These effects were mediated not by defective LC3-associated phagocytosis-engaged phagosome (LAPosome) formation or lysosomal dysfunction. We rather report that LIPA controls the generation of 25- and 27- hydroxycholesterol (OHC). Reduced 25-OHC after LIPA inhibition contributed to defective mitochondria associated membrane (MAM)-dependent mitochondrial metabolic repurposing leading to activation of the NLRP3 inflammasome after efferocytosis. Activation of the inflammasome subsequently promoted defects in Rac1-dependent phagocytic cup formation. Reduced 25- and 27-OHC also contributed to dampen LXR activation causing mitigation of cholesterol efflux and apoptotic cell clearance. In vivo experiments confirmed that LIPA inhibition led to defective clearance of apoptotic cells and stressed erythrocytes by splenic and hepatic macrophages. This process culminated in splenomegaly and splenic iron accumulation under hypercholesterolemic conditions. Our data highlight that LIPA is integral to macrophage efferocytic response, and they provide a framework for understanding the contribution of LIPA to chronic inflammation.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

Circulation Research ONLINE FIRST

METHODS

All data and methods used in the analysis and materials used to conduct the research will be made available to any researcher for the purpose of reproducing the results or replicating the procedures.

All data, methods, and materials are available on personal request at the University Côte d'Azur, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (L.Y.C).

An expanded Methods section is available in the Online Data Supplement

Animals and treatments.
WT and Ldlr$^{-/-}$ mice in a C57BL6/J background were obtained from the Janvier Lab (Saint Berthevin, France) and fed a normal chow diet. Hyperlipidemia was induced by feeding the mice with a Western diet (TD88137, Ssniff) for 12 weeks. Two weeks before the end of the study, mice were challenged with subcutaneous injections every two days of 20mg/kg lalistat (Enamine) solubilized in 0,5% methylcellulose 0,1% Tween 20 or with control solution**.** Mice were sacrificed one day after the last injection. All animals procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the French Ministry of Higher Education and Research and the Mediterranean Center of Molecular Medicine (Inserm U1065) and were undertaken in accordance with the European Guidelines for Care and Use of Experimental Animals. Animals had free access to food and water and were housed in a controlled environment with a 12-hour light–dark cycle and constant temperature (22°C).

RESULTS

Optimal clearance of apoptotic cells depends on LIPA.

We first made the observation that opposing regulation of LIPA activity occurred between classical (LPS) and alternative (IL-4) macrophage activation, and this correlated with the efferocytic capacity of these cells (Fig. 1A). Thus, we examined whether LIPA could impact efferocytosis in human THP-1 macrophages. Efferocytosis was analyzed 30 minutes after exposure to apoptotic Jurkat cells in LIPA deficient cells (LIPA knockdown using siRNA or lentiviral ShRNA particles (Online Fig. IA)) or LIPA overexpressing cells (Ovex, using stable transfection (Online Fig. IB)). Remarkably, LIPA expression modulated optimal engulfment of apoptotic cells as shown after knockdown or overexpression (Fig. 1B). These efferocytic responses paralleled BODIPY-neutral lipid stainings in both LIPA-deficient and LIPA-overexpressing THP-1 macrophages 30 minutes following ingestion of apoptotic cells (Fig. 1C). LIPA inhibition was next achieved with lalistat. A time course experiment showed that the efferocytic index was unaffected by lalistat 3 and 6 hours post-efferocytosis in THP-1 macrophages but was significantly reduced by 46% 24 hours after efferocytosis (Fig. 1D-E). Consistently, reduced phagocytic capacity was also observed in LIPA deficient murine bone marrow-derived macrophages and lalistat treatment did not show any additive effects in these cells (Online Fig. IC). These results reveal that LIPA inhibition initiates a sequential cascade of events that leads to impaired efferocytic response. Importantly, quantification of BODIPY staining in a time-course experiment revealed that neutral lipid accumulation preceded defects observed on efferocytosis after LIPA inhibition both in THP-1 macrophages (Fig. 1F) and murine primary macrophages (Online Fig. ID). Thus, LIPA-dependent clearance of apoptotic cells is most likely the consequence on how efferocytes initially handle cholesterol, the main neutral lipid in macrophages.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

Circulation Research ONLINE FIRST

LIPA controls lysosomal cholesterol trafficking during efferocytosis.

To better comprehend the mechanism by which LIPA modulates the efferocytic response, we performed an assay to follow the diffusion of cholesterol within intracellular compartments. Human THP-1 macrophages that had been cultured for 1 hour after the ingestion of [^{3}H]-cholesterol-prelabeled apoptotic Jurkat cells were fractionated by sucrose step gradient, and cellular fractions were assayed for [^{3}H]-cholesterol levels. The accumulation of cholesterol was observed 1 hour after efferocytosis in the high-density membrane fraction (enriched in endosomes and lysosomes) and in the plasma membrane fraction of lalistat-treated efferocytes (Fig. 1G). In contrast, reduced cholesterol content in high-density membrane fraction was observed 1 hour after the ingestion of [^{3}H]-cholesterol-prelabeled apoptotic Jurkat cells in LIPA overexpressing cells (Online Fig. IE). As expected, cholesteryl esters accumulated in the high-density membrane fraction after LIPA inhibition and to some extent in the plasma membrane fraction (Online Fig. IF). At this time point, there was no significant difference in the amount of cholesterol diffusing in the Golgi but less diffusion of free cholesterol occurred in the ER fraction in lalistat-treated THP-1 macrophages compared to control cells (Fig. 1G and Online Fig IF). Consistent with the accumulation of cholesteryl esters rather than free cholesterol after LIPA inhibition, transmission electron microscopy revealed only sparse cholesterol crystal formation in lalistat-treated THP-1 macrophages (1 identified among more than 400 visualized lysosomes with similar structures) (Online Fig. IG). However, we observed almost complete absence of 'whorl-shaped' lysosomes in these cells compared to control cells (Online Fig. IG, right panel), providing ultrastructural evidence of altered lysosomal lipid composition. To strengthen these observations, human THP-1 macrophages were co-cultured in vitro with BODIPY-prelabeled apoptotic Jurkat cells in the presence or absence of lalistat and confocal microscopy was performed to visualize the diffusion of cholesterol within intracellular compartments. LysoTracker staining (red) revealed that a considerable amount of BODIPY (green) was localized in the phagolysosomal membrane surrounding the apoptotic cells (yellow staining: overlap between green apoptotic cells and red LysoTracker staining) in lalistat-treated efferocytes (Online Fig. IH). In contrast, BODIPY (green) diffused within intracellular compartments in control and LIPA overexpressing THP-1 efferocytes (Online Fig. IH). Performing 3D reconstruction from confocal Z-stack images more clearly revealed the BODIPY lining surrounding apoptotic cells in lalistat-treated THP-1 efferocytes (Fig. 1H). Thus, LIPA is a key lysosomal enzyme that processes cholesteryl esters ingested from apoptotic cells during efferocytosis.

Defective lysosomal cholesterol hydrolysis does not initiate LC3-associated phagocytosis (LAP) or lysosomal dysfunction after efferocytosis.

During phagocytosis, LAP is a process by which LC3-II conjugation to phagosomes enables phagosome-lysosome fusion, stabilization of the NADPH oxidase 2 (NOX2) complex and apoptotic cell corpse clearance,[20] and we previously reported that NOX2 translocates to phagolysosomes in a cholesterol-dependent fashion.[21] Western blot analysis of LC3-II/LC3-I ratio showed that inhibition of LIPA in THP-1 macrophages did not alter LAP-engaged phagosome between 0 and 6 hours after efferocytosis (Fig. 2A and 2B). Although both LC3-I and LC3-II forms were reduced in LIPA overexpressing THP-1 macrophages, the LC3-II/LC3-I ratio was also not significantly modified between 0 and 6 hours after efferocytosis (Online Fig. IIA). We also investigated active NADPH oxidase (NOX) complex formation by immunostaining for p47^{phox} clustering, one of the active components of the NOX2 complex. As expected, a considerable amount of p47^{phox} staining (red) was localized to phagolysosomal membranes surrounding the apoptotic cells 1 hour post-efferocytosis; however, quantification of the phagolysosomal p47^{phox} staining did not reveal any difference between the control and lalistat-treated macrophages (Online Fig. IIB). Consistent with the role of the NOX complex in controlling phagolysosomal pH,[20] similar lysosomal acidification was observed between control and lalistat-treated efferocytes as measured by confocal microscopy 1 hour following the ingestion of apoptotic cells (Online Fig. IIC) or by flow cytometry using a LysoSensor probe (Online Fig. IID). LIPA overexpressing THP-1 macrophages also exhibited similar lysosomal acidification response

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

(Online Fig. IID). Altogether, our data indicate that defective lysosomal cholesterol hydrolysis does not initiate phagolysosome dysfunction after efferocytosis.

Defective autophagy or lysosomal biogenesis promotes macrophage apoptosis,[16,22,23] and we previously reported that defective efferocytosis could be the consequence of an excess cholesterol accumulation that induces apoptosis.[21] Western blot analysis revealed an increase in LC3II/LC3-I ratio 24 hours post-efferocytosis in lalistat-treated THP-1 macrophages, indicative of an enhanced autophagic response (Figs. 2A and 2B). We also observed an increased number of lysosomes in lalistat-treated THP-1 macrophages 24 hours post-efferocytosis using the LysoTracker probe and flow cytometry (Online Fig. IIE). The dephosphorylated form of TFEB is essential for optimal TFEB activation through translocation into the nucleus and subsequent activation of a gene network regulating lysosomal biogenesis and autophagy.[24] Inhibition of LIPA in macrophages led to an increase in the dephosphorylated form of TFEB 24 hours after ingestion of apoptotic cells (Figs. 2A and 2B), evoking an adaptive rather than a defective lysosomal biogenesis or autophagic response. Consistently, apoptosis was unaffected in LIPA deficient THP-1 efferocytes (LIPA knockdown using siRNA or lentiviral ShRNA particles) or lalistat-treated THP-1 efferocytes (Online Fig. IIF). In contrast, LIPA-overexpressing efferocytes exhibited lower autophagic and lysosomal biogenesis responses as shown by reduced expression of the dephosphorylated form of TFEB and both forms of LC3-I and LC3-II (Online Fig. IIA) and reduced LysoTracker staining (Online Fig. IIE). However, apoptosis was also unaffected in these cells (Online Fig. IF). Thus, lysosomal cholesterol hydrolysis capacity dictates TFEB-dependent lysosomal biogenesis and this adaptive compensatory response is unlikely the cause of defective efferocytosis but rather prevents macrophage from apoptosis.

Activation of the NLRP3 inflammasome causes defective efferocytosis after LIPA inhibition.

To evaluate whether LIPA-dependent lysosomal cholesterol storage ties lysosomal inflammation,[25] to defective efferocytosis, we next assessed the secretion of lysosomal inflammatory markers cathepsin B, K and IL-1β after ingestion of apoptotic cells. Consistent with the absence of lysosomal damage after LIPA inhibition, similar secretion of cathepsin B and K were observed between control and lalistat-treated THP-1 efferocytes (Figs. 2C and Online Fig. IIA). However, higher IL-1β and IL-18 secretion was observed 3h after LIPA inhibition in THP-1 efferocytes (Fig. 2D). Similar findings were observed after LIPA inhibition in murine thyoglycollate-elicited peritoneal efferocytes (Online Fig. IIIB). The NLRP3 inflammasome, which is a well-known sensor of danger signals, is involved in caspase-1-dependent maturation and secretion of IL-1β and IL-18.[26] Consistently, an inhibitor of NLRP3 (CP-456773) prevented the enhanced IL-1β and IL-18 secretion in lalistat-treated THP-1 efferocytes (Fig. 2D). Reduced IL-1β secretion, but not cathepsin B, was also observed in LIPA-overexpressing THP-1 efferocytes (Figs. 2C and Online Fig. IIIC). A time-course experiment confirmed an 100% increase in caspase-1 cleavage in THP-1 efferocytes as early as 3 hours after lalistat treatment, and this was sustained up to 24 hours following the ingestion of apoptotic Jurkat cells in lalistat-treated efferocytes (Figs. 2E). This result was associated with an increase in FAM-Flica caspase-1 activity that could be prevented by the NLRP3 inhibitor (Online Fig. IIID). Using immortalized murine NLRP3-deficient macrophages, we confirmed the dependence of the NLRP3 inflammasome on IL-1β secretion (Fig. S3E) and caspase-1 activation (Online Fig. IIIF) after LIPA inhibition. Inhibition of the NLRP3 inflammasome partially restored the efferocytic index of lalistat-treated THP-1 efferocytes (Fig. 2F). CP-456773 treatment and caspase 1 deficiency also prevented the efferocytosis defect induced by LIPA inhibition in murine thyoglycollate-elicited peritoneal efferocytes (Online Fig. IIIG). Thus, lysosomal cholesterol hydrolysis prevents the NLRP3 inflammasome-activating danger signal during efferocytosis to allow efficient clearance of apoptotic cells.

Caspase-1 activation has been previously proposed to cleave Rac1,[27] which is a canonical Rho guanosine triphosphatase (GTPase) involved in cytoskeletal reorganization and efferocytosis.[28] Transmission electron microscopy showed that the morphology of lalistat-treated THP-1 efferocytes

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

differed from control cells after 24 hours of culture with a less identifiable phagocytic cup that transform from filopodia and underlying lamellipodia (Online Fig. IIIH). Immunostaining for Rac1 (green) and F-actin (red) 6 hours after efferocytosis revealed a considerable amount of co-staining at the leading edge of membrane ruffle formation surrounding the apoptotic cells in control macrophages (overlapping yellow staining) (Online Fig. IIII, upper panels). In contrast, a general decrease in phagolysosome Rac1 was observed after LIPA inhibition (Online Fig. IIII, lower panels). This was more clearly visible after we performed 3D reconstruction from confocal Z-stack images (Fig. 2G). Reduced Rac1 protein expression was confirmed in THP-1 efferocytes after LIPA inhibition by Western blot (Fig. 2H). Pull-down activation assay confirmed reduced Rac1 activity after LIPA inhibition (Fig. 2H). To determine when after LIPA inhibition this decline in cell ruffling occurs, we used impedance to perform real-time monitoring of cell protrusion dynamics.[29] These analyses revealed increased resistance in lalistat-treated THP-1 macrophages beginning 6 hours post-efferocytosis (Fig. 2I), a signature that followed the inflammasome activation. We confirmed that the Rac1 inhibitor NSC23766, known to selectively lower active Rac1-GTP levels, also increased resistance in control cells to the level of lalistat-treated efferocytes (Fig. 2I). Inhibition of the NLRP3 inflammasome (CP-456773 treatment) rescued Rac1 protein expression (Fig. 2H). These findings provide a mechanism by which inflammasome-activating danger signal contributes to the defective efferocytic response after LIPA inhibition.

Defective lysosomal cholesterol hydrolysis repurposes MAM-dependent mitochondrial metabolism to activate the NLRP3 inflammasome and dampen efferocytosis.

Recent evidences suggest that LIPA is important for mitochondrial oxidative phosphorylation,[15] and elevated mitochondrial ROS production have been proposed to activate the NLRP3 inflammasome.[30] Reduced metabolic flux in the mitochondria of lalistat-treated THP-1 efferocytes was reflected by a decrease in the oxygen consumption rate (OCR) at baseline or after the inhibition of oxidative phosphorylation by oligomycin treatment (Figs. 3A and Online Fig. IVA). The enhanced OCR response was also prevented in thyoglycollate-elicited peritoneal efferocytes after LIPA inhibition or in LIPA deficient efferocytes (Online Fig. IVB). The increased capacity of LIPA-overexpressing THP-1 cells to capture and take up apoptotic Jurkat cells was also associated with increased oxygen consumption rate (OCR) and maximal respiration response after FCCP treatment (Fig. 3A). These observations were further supported by reduced mitochondrial uncoupling protein 2 (*ucp2*) mRNA expression in lalistat-treated THP-1 efferocytes (Online Fig. IVC) and enhanced mRNA levels of heme oxygenase-1 (*Hmox1*) (Fig. S4D) starting 1 hour after efferocytosis. Reduced mitochondrial flux and uncoupling of lalistat-treated THP-1 efferocytes paralleled an increase in mitochondrial ROS generation (Figs. 3B and 3C). This effect was most likely due to a raise in mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) since addition of the complex I inhibitor (rotenone), the complex II inhibitor (3-nitropropionic acid, 3-NPA) or the succinate oxidation inhibitor (dimethyl malonate, DMM) promoted mitochondrial ROS production in control cells but not in lalistat-treated THP-1 efferocytes (Fig. 3C). These inhibitors also resulted in an increase in IL-1β secretion in control but not in lalistat-treated efferocytes (Fig. 3D).

Calcium is a central player in mitochondria metabolic repurposing and inflammasome activation,[31,32] and different lysosomal storage diseases have been associated with calcium flux modulation.[33-35] We first activated the two main lysosomal calcium pathways, the nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate receptor (NAADPR) with the membrane-permeant NAADP analog (NAADP-AM) and the mucolipin transient receptor potential channel 1 (TRPML1) with the mucolipin synthetic agonist (ML-SA1). However, these treatments did not modify FAM-Flica caspase-1 activity or IL-1β secretion (Online Fig. IVE and IV4F). In contrast, activation of the mitochondrial inositol trisphosphate receptor (IP3R) with low dose 2-aminoethyl diphenylborinate (2-ABP) completely prevented the inflammasome activation and IL-1β secretion in lalistat-treated efferocytes (Online Figs. IVE and IVF). These findings suggest that inhibition of LIPA promotes mitochondrial metabolic repurposing-dependent inflammasome

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

activation by limiting mitochondrial calcium flux. To directly test this hypothesis, efferocytes were loaded with the calcium probe Fluo4-AM and calcium release from the mitochondria, a surrogate of mitochondrial calcium content, was assessed after treatment of cells with the mitochondrial uncoupler, carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP). We observed a striking decrease in mitochondrial calcium release in lalistat-treated THP-1 efferocytes compared to control cells (Fig. 3E). Calcium-dependent activation of the inflammasome relies on Mitochondria-Associated ER Membranes (MAMs) that comprise IP3R and chaperone proteins.[32] Transmission electron microscopy highlighted ER-mitochondria contacts in control THP-1 efferocytes, an effect that was less visible in lalistat-treated cells (Fig. 3F). The ER-localized chaperone GRP78 (BiP) is part of the MAM macromolecular complex and interacts with ER lipid transporters.[37] Overexpression of GRP78 normalized the mitochondrial calcium response of lalistat-treated THP-1 efferocytes (Fig. 3E) and prevented the exacerbated IL-1β secretion (Fig. 3G). Consistently, GRP78 overexpression also restored efficient efferocytosis in lalistat-treated efferocytes (Fig. 3H). Thus, we propose that LIPA is required for MAM-dependent calcium flux after efferocytosis. This flux will repurpose the mitochondria to limit the inflammasome activating danger signal and allow efficient efferocytosis.

LIPA primes the sterol-dependent metabolic reprogramming of efferocytes.

The group of Cyster recently reported that defective 25-OH cholesterol generation in the ER promotes inflammasome activation in macrophages.[37,38] Thus, we next quantified sterol metabolites using liquid chromatography-mass spectrometry in control and lalistat-treated THP-1 macrophages 3 hours post-efferocytosis. Precursors of cholesterol synthesis such as lanosterol, 24-DH-lanosterol, 7-DH cholesterol and desmosterol as well as toxic sterols such as α-triols (cholesterol-3beta,5alpha,6beta-triol), α-Epox (cholesterol-5alpha,6alpha-epoxide), 7α-OH cholesterol and 7-ketocholesterol (7-KC) were not altered at this time point in lalistat-treated efferocytes (Online Fig. VA and VB). The brain-specific 24S-OH cholesterol was near the detection limit and was unaltered in lalistat-treated efferocytes (Fig. 4A). In contrast, a striking 50 to 70% decrease in oxysterols made from free cholesterol in the ER, such as 4β-OH cholesterol and 25-OH cholesterol or in the mitochondria such as 27-OH cholesterol, was observed in lalistat-treated efferocytes (Fig. 4A). These decreases were not associated with significant changes in the mRNA expression of the related oxysterol biosynthetic enzymes in lalistat-treated efferocytes (Online Fig. VC), suggesting that LIPA inhibition impacts the production of oxysterols by limiting substrate availability.

Part of the mechanism by which defective 25-OH cholesterol generation activates the inflammasome relies on modulation of cholesterol biosynthetic genes.[37,38] The ingestion of apoptotic cells led to a decrease in the mRNA expression of the biosynthetic genes *Srebf2* and *Hmgcr* in control macrophages starting 3 hours after efferocytosis, an effect that was virtually absent in lalistat-treated THP-1 macrophages (Figs. 4B, Online VD and VE). In contrast, *Srebf2* and *Hmgcr* mRNA expression were further intensified in LIPA-overexpressing THP-1 macrophages 3 hours after efferocytosis (Fig. 4B). Treatment of the cells with 25-OH cholesterol restored the down-regulation of *Srebf2* and *Hmgcr* mRNA expression in lalistat-treated efferocytes (Fig. 4B). These findings suggest that cholesteryl ester hydrolysis of engulfed apoptotic cells favors the flux of free cholesterol toward the ER (Online Fig. IE) to generate 25-OH cholesterol and dampen cholesterol biosynthetic pathway after efferocytosis. Treatment with 25-OH cholesterol partially restored the decrease in OCR observed in lalistat-treated THP-1 efferocytes (Fig. 4C) and rescued their mitochondrial calcium defect (Fig. 4D), offering a potential mechanism by which 25-OH cholesterol could control ER-dependent mitochondrial proticity after efferocytosis. Consistently, treatment with 25-OH cholesterol reduced inflammasome activation following efferocytosis in lalistat-treated THP-1 macrophages, as reflected by reduced IL-1β secretion (Fig. 4E) and restored an efficient efferocytic response (Fig. 4F). Treatment of Lipa deficient murine macrophages with 25-OH cholesterol also rescued the defective efferocytosis of these cells (Online Fig. VF). The reduced IL-1β secretion in LIPA-overexpressing efferocytes was also abolished after knockdown of Ch25h by siRNA (Online Fig. VG). Thus, we propose that impaired 25-OH cholesterol generation after LIPA inhibition controls

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

mitochondrial metabolic repurposing to activate the inflammasome and limit subsequent clearance of apoptotic cells.

25-OH and 27-OH cholesterol are potent endogenous LXR agonists and LXR activation occurs after efferocytosis to support efficient efferocytosis through upregulation of cholesterol efflux transporters or the efferocytic receptor *MertK*.[21,39] Thus, we next examined the expression of LXR target genes during the course of efferocytosis and observed that the mRNA expression of the cholesterol efflux transporters *Abca1* and *Abcg1* was not altered in the early phase of efferocytosis in lalistat-treated THP-1 macrophages (up to 6 hours) but was significantly decreased in the late resolution phase (Online Fig. VIA and VIB). Cholesterol efflux studies have confirmed a decrease in cholesterol efflux to lipid-poor apoA-1, the major apolipoprotein of HDL (Online Fig. VIC) and to PEG-HDL (Online Fig. VID) 24 hours after the ingestion of apoptotic cells in lalistat-treated THP-1 macrophages. In contrast, LIPA-overexpressing THP-1 efferocytes exhibited higher mRNA expression of LXR target genes (Online Fig. VIE) and more cholesterol efflux to PEG HDL (Online Fig. VIF). We confirmed the LXR dependency of these effects, as treatment with the synthetic LXR agonist TO901317 not only enhanced the expression of *Abca1* and *Abcg1* (Online Fig. VIG) but also cholesterol efflux to HDL in lalistat-treated THP-1 macrophages (Online Fig. VIH). Consistently, we observed reduced mRNA expression of the efferocytic receptor *MertK* in lalistat-treated THP-1 macrophages 24 hours after efferocytosis (Fig. 4G). In contrast, *MertK* was upregulated in LIPA-overexpressing THP-1 efferocytes (Online Fig. VIE). To delineate whether LXR activation could rescue the adverse effects of LIPA inhibition on efferocytes, stimulation of LXR activity was achieved with 25-OH cholesterol, 27-OH cholesterol or the synthetic LXR agonist TO901317 for 24 hours. In contrast to 25-OH cholesterol treatment, 27-OH cholesterol or TO901317 did not prevent the inflammasome activation (Fig. 4E). However, all treatments enhanced *MertK* mRNA expression in control and lalistat-treated THP-1 efferocytes (Fig. 4G). This could explain how 27-OH cholesterol and TO901317 partially restored the efferocytic capacity of lalistat-treated efferocytes (Fig. 4F). The relevance of this pathway was further illustrated through the effect of the LXR agonist in synergizing with the NLRP3 inhibitor (CP-456773) to fully restore efficient efferocytosis (Fig. 4H). These results indicate that LXR activation is a critical checkpoint by which LIPA controls the efferocytic response.

Altogether, these findings reveal that LIPA favors efficient efferocytosis through sterol-dependent metabolic reprogramming: 1) The ER-dependent 25-OHC generation after lysosomal cholesterol hydrolysis will limit inflammasome activating danger signal and prevent Rac1-dependent phagocytic cup disassembly and 2) 25- and 27-OHC generation after lysosomal cholesterol hydrolysis will activate a LXR-dependent transcriptional program that favors ABCA1 and ABCG1-dependent efflux of cholesterol ingested from apoptotic cells and primes efferocytes for multiple MertK-dependent clearance of apoptotic cells.

LIPA orchestrates disposal of stressed erythrocytes and apoptotic cells in vivo.

Taking advantage of a publicly available gene expression dataset from Immgen (http://immgen.org), we observed that efferocytosis markers, LXR target genes and heme and iron homeostasis markers were predominantly expressed not only in peritoneal macrophages but also in specialized tissue-resident macrophages, paralleling LIPA expression and lysosome markers (Online Fig. VIIA). This finding suggested an important interplay between LIPA, cholesterol homeostasis and tissue-resident macrophage lysosomal and erythrophagocytic functions. The in vivo contribution of LIPA to efferocytosis was next studied using two different models. The use of lalistat treatment over LIPA deficient mice was chosen to avoid an inflammatory phenotype that could origin from embryogenesis.[12] We intravenously injected either fluorescently labeled stressed erythrocytes (sRBCs) or apoptotic lymphocytes (ALs) into mice treated with lalistat or vehicle for 2 weeks and examined their macrophage efferocytic capacity in spleen and liver 16 hours later. sRBCs and ALs were retrieved in the liver and spleen (Online Fig. VIIB) and accumulated within different leukocyte populations gated by flow cytometry as $CD11b^{lo}F4/80^{int}$ myeloid cells, $CD11b^{lo}F4/80^{high}$ Kupffer cells (KCs) or red pulp macrophages (RPMs) and $CD11b^{high}F4/80^{high}$ whether

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

these cells are the newly identified transient macrophage population (T-macs) or a subpopulation of myeloid cells (Fig. 5A).[40] In the liver, sRBCs and to a lesser extent ALs promoted the appearance of T-macs or a subpopulation of myeloid cells (Fig. 5A). Both T-macs and KCs ingested labeled sRBCs or ALs (Figs. 5B and Online Fig VIIC). A small fraction of myeloid cells also ingested fluorescent sRBCs or ALs (Fig. 5B and Online Fig. VIIC). Lalistat treatment reduced the ability of KCs and T-macs to phagocytose labeled sRBCs and ALs (Fig. 5B and Online Fig VIIC). However, lalistat also induced a compensatory increase in the number of myeloid cells that had phagocytosed labeled ALs (Online Fig. VIIC). In the spleen, RPMs were the most abundant cell population that efficiently cleared labeled sRBCs and ALs (Fig. 5C and Online Fig VIID). Lalistat treatment reduced the efferocytic capacity of RPMs (Fig. 5C and Online Fig VIID) and there was a specific compensatory up-regulation of the number of myeloid cells that had ingested ALs (Online Fig. VIID). The enhanced number of immature myeloid cell with efferocytic capacity after lalistat treatment was a specific response to the injection of ALs, most likely reflecting the initiation of an inflammatory response secondary to release of find-me or danger signals in this context.[29] We thus conclude that LIPA promotes the disposal of stressed RBCs and apoptotic cells in hepatic and splenic macrophage populations.

LIPA inhibition precipitates hypercholesterolemia-associated efferocytosis defects.

Previous studies have documented defective efferocytosis and splenomegaly under hypercholesterolemic conditions.[2] Thus, high-fat diet-fed hypercholesterolemic *Ldlr*$^{-/-}$ mice were next treated with lalistat for 2 weeks. An analysis of macrophage numbers in the spleen (RPMs), liver (KCs), adipose tissue (ATMs) and peritoneal cavity (PMs) (Online Fig. VIIIA) revealed a specific increase in RPMs and KCs, probably to compensate for efferocytosis defects, but not in ATMs or PMs (Online Fig. VIIIB). Consistent with this observation, reduced mRNA expression of efferocytic markers (i.e, MertK, Axl and Gas6) were down regulated by lalistat treatment along with enhanced inflammatory markers including Il1β (Fig. 5D). RPMs from lalistat-treated animals also exhibited reduced cell surface expression of CD206 (the mannose receptor MRC1) (Online Fig. VIIIC). Mechanistically and in line with our in vitro studies, LIPA inhibition led to a compensatory increase in lysosomal biogenesis in RPMs and KCs with no changes in lysosomal acidification as quantified by flow cytometry (Online Fig. VIIID). This result correlated with enlarged spleen and higher splenic IL-1β levels in lalistat-treated animals while other inflammatory parameters were unaffected (Table 1). Senescent RBCs are normally phagocytosed by macrophages in the spleen and liver, and defective erythrophagocytosis leads to splenic iron deposition.[41,42] Thus, we assessed iron stores in lalistat-treated animals. Splenic iron accumulation was histologically evident and was largely confined to the red pulp in lalistat-treated animals (Fig. 5E). Plasma, liver, and adipose tissue iron and ferritin concentrations were normal in lalistat-treated animals (Fig. 5F-5G and Table 1), but an increased iron concentration was confirmed in the spleen (Fig. 5F). Ferritin concentrations were also increased by more than 200% in the spleens of lalistat-treated animals but did not reach statistical significance (P=0.07, Fig. 5G). Thus, our data supports a critical in vivo role of LIPA in the efferocytic capacity of tissue-resident macrophages under hypercholesterolemic conditions, which is required for tissue integrity by maintaining immune and tissue lipid homeostasis.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

DISCUSSION

Macrophage lipid accumulation and defective clearance of apoptotic cells are central events in many metabolic disorders. However, the specific molecular mechanisms linking lipid accumulation to inflammation in macrophages are still not completely understood. We have now uncovered a novel mechanism by which LIPA controls macrophage inflammatory response by limiting continued clearance of apoptotic cells. Notably, our mechanistic studies demonstrated that lysosomal cholesterol hydrolysis mediated by LIPA orchestrated the timely production of 25-OH and 27-OH cholesterol during efferocytosis, which modulated inflammasome activation and the generation of endogenous LXR ligands. While activation of the inflammasome after LIPA inhibition led to defects in Rac1-dependent phagocytic cup formation, decreased production of LXR ligands resulted in reduced cholesterol efflux and *MertK* expression impeding subsequent apoptotic cell clearance (Graphical abstract, Fig. 6). Importantly, our findings indicate that in vivo inhibition of this pathway reduced the clearance of apoptotic lymphocytes and stressed erythrocytes by splenic- and hepatic-resident macrophages leading to splenomegaly and splenic iron accumulation upon hypercholesterolemic challenge. Collectively, these findings demonstrate the importance of macrophage lysosomal cholesterol hydrolysis linking metabolism and inflammation under homeostatic and disease conditions.

It has been shown that LIPA is essential for breaking down fatty material within the lysosomal compartment of macrophages upon receptor-mediated endocytosis of lipoprotein, lysosome biogenesis or lipophagy,[14,15,22] but the relevance to efferocytosis has not yet been addressed. Our findings reveal that LIPA activity follows the efferocytic capacity of polarized macrophages and controls the lysosomal degradative capacity under non-polarizing culture conditions raising a number of interesting questions for future study. First, the dual role of LIPA for optimal alternative macrophage activation,[14] and efferocytosis, as detailed in the present study, might be interconnected in vivo to promote tissue repair and metabolic homeostasis.[43] The findings of reduced LIPA activity in classically activated macrophages and enhanced inflammasome activation after LIPA inhibition also indicates that LIPA might be more susceptible to exogenous inflammatory stimuli. Thus, it will be of interest to determine whether LIPA may prime macrophages prior activation. Indeed, a switch between classically and alternatively activated macrophages was previously associated to different oxidative stress responses that prime macrophage prior activation.[44,45]

Second, why enhanced oxidative stress does not initiate apoptosis after LIPA inhibition needs to be defined. While our data exclude a role of NADPH oxidase in promoting cholesterol-dependent apoptosis susceptibility,[21] they do not rule out why mitochondrial oxidative stress and associated inflammasome activation are not linked to pyroptosis or other forms of apoptosis. One explanation could be the absence of second signals that triggers apoptosis ('two hit models'),[8] or the level of aggressiveness of the first signal. For instance, we found occasional cholesterol crystals in macrophages after LIPA inhibition and no sign of lysosomal damage after apoptotic cell clearance despite higher NLRP3 inflammasome activation. These findings contrast with the activation of the NLRP3 inflammasome by cholesterol crystals relying on lysosomal damage and the subsequent proteolytic activation of cathepsins.[9,17] This could be the consequence of an accumulation of cholesteryl ester after LIPA inhibition rather than free cholesterol, which is the source of cholesterol crystal formation in lysosomes.[46] Another possibility for the lack of apoptosis induction after LIPA inhibition could involve formation of new lysosomes to face cholesterol accumulation that has been previously shown to prevent cell death.[23] It also remains an open question as to how exactly the origin and level of mitochondrial ROS, which depends on the balance between the reverse electron transport of the electron transport chain and the mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$),[47] leads to oxidative damage to DNA, proteins and lipids and subsequent apoptosis. It would be of interest to determine whether absence of ROS-mediated mtDNA release after LIPA inhibition may have limited activation of the AIM2 inflammasome under efferocytic condition since AIM2 has redundant function with the NLRP3 inflammasome,[38] and activates apoptosis.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

How does LIPA control optimal clearance of apoptotic cells? Our findings suggest that inhibition of lysosomal cholesteryl ester hydrolysis limited the generation of free cholesterol that could reach sites of oxysterol generation after the digestion of apoptotic cells. These oxysterols include 25-OH and 27-OH cholesterol that could prime efferocytes for subsequent apoptotic cell clearance by at least two independent mechanisms. We first observed an unexpected mechanism that involves defective production of 25-OH cholesterol in the ER, which impaired the repression of cholesterol biosynthetic genes post-efferocytosis but also prevented MAM-dependent mitochondrial metabolic repurposing and subsequent activation of the inflammasome. This activation reduced Rac1 activity and subsequently disorganized phagocytic cups. Although it was recently shown that defective 25-OH cholesterol generation in macrophages promotes inflammasome activation,[37,38] the present study positions this observation in the context of efferocytosis and provides new insights into the underlying mechanisms. Indeed, we found that 1) LIPA controls the generation of 25-OH cholesterol after efferocytosis and 2) 25-OH cholesterol controls the MAM-dependent calcium flux to repurpose mitochondrial metabolism. Under normal physiological conditions, calcium primarily promotes ATP synthesis by stimulating enzymes of the Krebs cycle and oxidative phosphorylation in the mitochondria. This increased metabolic rate would consume more oxygen resulting in increased respiratory chain electron leakage and mitochondrial ROS levels as it is observed in control efferocytes. After LIPA inhibition, reduced mitochondrial calcium influx may have dampened OXPHOS and UCP-2-dependent proton leaks across the inner mitochondrial membrane but at the same time reduced $\Delta\Psi_m$ consumption exacerbating mitochondrial ROS generation.[30,31] Restoring MAM-dependent calcium flux through GPR78 overexpression was sufficient to prevent the inflammasome activation after LIPA inhibition mimicking the effect of 25-OH cholesterol. Future studies will be required to understand whether MAM formation during efferocytosis is also linked to mitochondrial fission.[48] Nevertheless, this mitochondrial checkpoint is crucial for the efferocytic response of macrophages as the inflammasome activation after LIPA inhibition reduced Rac1 expression and activity. Decreased levels of Rac1 and F-actin polymerization in membrane ruffles following the ingestion of apoptotic cells caused cytoskeletal changes and impaired pseudopod formation. Similar modulation of focal adhesion dynamics was previously observed under cholesterol loading conditions in LIPA deficient cells.[49] In our setting, this modulation contributed to reduce efferocytic capacity after LIPA inhibition.

Consistent with 25-OH and 27-OH cholesterol being potent LXR agonists in macrophages,[7,10] we next observed a delayed response in LXR target gene activation after LIPA inhibition in efferocytes leading to impaired cholesterol efflux and reduced efferocytic capacity.[21,39] We confirmed that reduced LXR activation was independent of, and synergized with, the modulation of Rac1 signaling pathway to impede efficient apoptotic cell clearance.[50] Interestingly, in other lysosomal storage diseases such as Niemann-Pick type C (NPC) disease, in which cholesterol accumulates within late endosomes, it has been reported that NPC cells exhibit a defect in 25-OH and 27-OH cholesterol in response to LDL and fail to repress SREBPs and LXRs.[51,52] Our findings extend these observations, and we propose that LIPA-dependent cholesteryl ester hydrolysis, which is upstream of endosomal NPC-dependent cholesterol trafficking, might be an earlier enzymatic step that governs oxysterol generation and LXR activation during efferocytosis. Thus, LIPA-dependent lysosomal cholesterol hydrolysis orchestrates the timely cholesterol-dependent inflammasome activation and transcriptional efferocytic response of macrophages.

On a daily basis, over 100 billion white and red blood cells are turned over through efferocytosis to prevent the inflammatory consequences associated with the accumulation of apoptotic debris and to maintain tissue homeostasis.[8,28] Although the splenomegaly of LIPA-deficient mice has been associated with extramedullary hematopoiesis,[12] the spleen does not support hematopoiesis in humans under injury-free conditions,[53] arguing that defective efferocytosis is most likely the culprit of the inflammatory phenotype and splenomegaly of LIPA mutation carriers.[11] Considerable data support that dying cells are normally phagocytosed by macrophages in the spleen and liver, and apoptotic bodies are rapidly broken down into their molecular constituents, including iron and lipids, which must be recycled or transported back into the circulation.[41,42] Challenging mice with stressed RBCs or apoptotic lymphocytes revealed that LIPA

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

inhibition attenuated the efferocytic capacity of not only red pulp macrophages but also Kupffer cells. Under hypercholesterolemic disease conditions, we found that LIPA inhibition caused the spontaneous accumulation of iron in the spleen along with enhanced splenic IL-1β content. These findings could have major relevance not only for current enzyme replacement therapy for LIPA mutation carriers but also to better elucidate the recent genome-wide association studies (GWAS) that have reinforced LIPA as a susceptibility gene for cardiovascular diseases along with reduced LIPA activity.[54,55]

ACKNOWLEDGMENTS
We thank Dr. Wanida Ruangsiriluk for providing LIPA overexpressing THP-1 macrophages and very useful scientific discussion and advice. We thank Dr. Fréderic Larbret for assistance with flow cytometry and Dr. Véronique Corcelle for assistance in animal facilities.

SOURCES OF FUNDING
The Fondation ARC (RAC15014AAA) and the Austrian Science Fund (W1226 DK-MCD) support L.B and D.K, respectively. PACA region PhD fellowship supports M.V and BioTechMed-Graz (Flagship) supports N.V and M.D.M fellowships. This work was supported by the Inserm Atip-Avenir program, the association VML (Vaincre les Maladies Lysosomales), the European Marie Curie Career Integation Grant (CIG-630926) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE12-0017-01) to L.Y.C.

DISCLOSURES
None.

REFERENCES

1. Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature *496*, 445–455.
2. Tall, A.R., and Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. Nat. Rev. Immunol. *15*, 104–116.
3. Han, C.Z., and Ravichandran, K.S. (2011). Metabolic connections during apoptotic cell engulfment. Cell *147*, 1442–1445.
4. Nagata, S., Hanayama, R., and Kawane, K. (2010). Autoimmunity and the clearance of dead cells. Cell *140*, 619–630.
5. Maxfield, F.R., Tabas, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. (2005). Nature. *438*, 612-21.
6. Goldstein, J.L., DeBose-Boyd, R.A., and Brown, M.S. (2006). Protein sensors for membrane sterols. Cell *124*, 35–46.
7. Spann, N.J., and Glass, C.K. (2013). Sterols and oxysterols in immune cell function. Nat. Immunol. *14*, 893–900.
8. Tabas, I. (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. Nat. Rev. Immunol. *10*, 36–46.
9. Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., et al. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. Nature *464*, 1357–1361.
10. Zelcer, N., and Tontonoz, P. (2006). Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. J. Clin. Invest. *116*, 607–614.
11. Bernstein, D.L., Hülkova, H., Bialer, M.G., and Desnick, R.J. (2013). Cholesteryl ester storage disease: review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease. J. Hepatol. *58*, 1230–1243.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

Circulation Research ONLINE FIRST

12. Du, H., and Grabowski, G.A. (2004). Lysosomal acid lipase and atherosclerosis. Curr. Opin. Lipidol. *15*, 539–544.
13. Yan, C., Lian, X., Li, Y., Dai, Y., White, A., Qin, Y., Li, H., Hume, D.A., and Du, H. (2006). Macrophage-specific expression of human lysosomal acid lipase corrects inflammation and pathogenic phenotypes in lal-/- mice. Am. J. Pathol. *169*, 916–926.
14. Huang, S.C.-C., Everts, B., Ivanova, Y., O'Sullivan, D., Nascimento, M., Smith, A.M., Beatty, W., Love-Gregory, L., Lam, W.Y., O'Neill, C.M., et al. (2014). Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. Nat. Immunol. *15*, 846–855.

15. Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I., and Marcel, Y.L. (2011). Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. Cell Metab. *13*, 655–667.
16. Razani, B., Feng, C., Coleman, T., Emanuel, R., Wen, H., Hwang, S., Ting, J.P., Virgin, H.W., Kastan, M.B., and Semenkovich, C.F. (2012). Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. Cell Metab. *15*, 534–544.
17. Sheedy, F.J., Grebe, A., Rayner, K.J., Kalantari, P., Ramkhelawon, B., Carpenter, S.B., Becker, C.E., Ediriweera, H.N., Mullick, A.E., Golenbock, D.T., et al. (2013). CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. Nat. Immunol. *14*, 812–820.
18. Stitziel, N.O., Fouchier, S.W., Sjouke, B., Peloso, G.M., Moscoso, A.M., Auer, P.L., Goel, A., Gigante, B., Barnes, T.A., Melander, O., et al. (2013). Exome sequencing and directed clinical phenotyping diagnose cholesterol ester storage disease presenting as autosomal recessive hypercholesterolemia. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *33*, 2909–2914.
19. Bochem, A.E., van der Valk, F.M., Tolani, S., Stroes, E.S., Westerterp, M., and Tall, A.R. (2015). Increased Systemic and Plaque Inflammation in ABCA1 Mutation Carriers With Attenuation by Statins. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *35*, 1663–1669.
20. Green, D.R., Oguin, T.H., Martinez, J. (2016). The clearance of dying cells: table for two. Cell Death & Differentiation. *23*, 915-926.
21. Yvan-Charvet, L., Pagler, T.A., Seimon, T.A., Thorp, E., Welch, C.L., Witztum, J.L., Tabas, I., and Tall, A.R. (2010). ABCA1 and ABCG1 protect against oxidative stress-induced macrophage apoptosis during efferocytosis. Circ. Res. *106*, 1861–1869.
22. Emanuel, R., Sergin, I., Bhattacharya, S., Turner, J.N., Epelman, S., Settembre, C., Diwan, A., Ballabio, A., and Razani, B. (2014). Induction of lysosomal biogenesis in atherosclerotic macrophages can rescue lipid-induced lysosomal dysfunction and downstream sequelae. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *34*, 1942–1952.
23. Sergin, I., Evans, T.D., Zhang, X., Battacharya, S., Stokes, C.J., Song, E., Dehestani, B., Holloway, K.B., Micevych, P.S., Javaheri, A., Crowley, J.R., Ballabio, A., Schilling, J.D., Epelman, S., Weihl, C.C., Diwan, A., Fan, D., Zayed, M.A., Razani, B. (2017). Exploiting macrophage autophagy-lysosomal biogenesis as a therapy for atherosclerosis. Nat Commun. *8*,15750.
24. Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., et al. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. Science *332*, 1429–1433.
25. Weissmann, G. (1967). The role of lysosomes in inflammation and disease. Annu. Rev. Med. *18*, 97–112.
26. Lamkanfi, M., and Dixit, V.M,. (2017). In retrospect: The inflammasome turns 15. Nature. *548*, 534-535.
27. Sokolovska, A., Becker, C.E., Ip, W.K., Rathinam, V.A., Brudner, M., Paquette, N., Tanne, A., Vanaja, S.K., Moore, K.J., Fitzgerald, K.A., Lacy-Hulbert, A., Stuart, L.M. (2013). Activation of caspase-1 by the NLRP3 inflammasome regulates the NADPH oxidase NOX2 to control phagosome function. Nat. Immunol. *14*, 543-53.
28. Elliott, M.R., and Ravichandran, K.S. (2016). The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance. Dev. Cell *38*, 147–160.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

29. Giaever, I., and Keese, C.R. (1993). A morphological biosensor for mammalian cells. Nature. *366*, 591-592.
30. Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., Tschopp, J. (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. Nature. *469*, 221-226.
31. Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., Sheu, S.S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. Am. J. Physiol. Cell. Physiol. *287*, C817-C833.
32. Horng, T. (2014). Calcium signaling and mitochondrial destabilization in the triggering of the NLRP3 inflammasome. Trends Immunol. *35*, 253-261.
33. Lloyd-Evans, E., Morgan, A., He, X., Smith, D.A., Elliot-Smith, E., Sillence, D.J., Churchill, G.C., Schuchman, E.H., Galione, A., Platt, F.M. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. Nat Med. *14*, 1247-55.
34. Sano, R., Annunziata, I., Patterson, A., Moshiach, S., Gomero, E., Opferman, J., Forte, M., d'Azzo, A. (2008). GM1-Ganglioside accumulation at the Mitochondria-Associated ER membranes links ER stress to Ca^{2+}-dependent mitochondrial apoptosis. Molecular Cell. *36*, 500-511.
35. Shen, D., Wang, X., Li, X., Zhang, X., Yao, Z., Dibble, S., Dong, X.P., Yu, T., Lieberman, A.P., Showalter, H.D., Xu, H. (2012). Lipid storage disorders block lysosomal trafficking by inhibiting a TRP channel and lysosomal calcium release. Nat Commun. *3*, 731.
36. Prasad, M., Pawlak, K.J., Burak, W.E., Perry, E.E., Marshall, B., Whittal, R.M., Bose, H.S. (2017). Mitochondrial metabolic regulation by GRP78. Sci Adv. *3*,e1602038.
37. Reboldi, A., Dang, E.V., McDonald, J.G., Liang, G., Russell, D.W., and Cyster, J.G. (2014). Inflammation. 25-Hydroxycholesterol suppresses interleukin-1-driven inflammation downstream of type I interferon. Science *345*, 679–684.
38. Dang, E.V., McDonald, J.G., Russell, D.W., Cyster, J.G. (2017). Oxysterol restraint of cholesterol synthesis prevents AIM2 inflammasome activation. Cell. *171*, 1-15.
39. A-Gonzalez, N., Bensinger, S.J., Hong, C., Beceiro, S., Bradley, M.N., Zelcer, N., Deniz, J., Ramirez, C., Díaz, M., Gallardo, G., et al. (2009). Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. Immunity *31*, 245–258.
40. Theurl, I., Hilgendorf, I., Nairz, M., Tymoszuk, P., Haschka, D., Asshoff, M., He, S., Gerhardt, L.M.S., Holderried, T.A.W., Seifert, M., et al. (2016). On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. Nat. Med. *22*, 945–951.
41. De Domenico, I., McVey Ward, D., and Kaplan, J. (2008). Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 72–81.
42. Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B.T., Wilker, P.R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W.A., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2009). Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. Nature *457*, 318–321.
43. Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. Nature *496*, 445–455.
44. Jais, A., Einwallner, E., Sharif, O., Gossens, K., Lu, T.T.-H., Soyal, S.M., Medgyesi, D., Neureiter, D., Paier-Pourani, J., Dalgaard, K., et al. (2014). Heme oxygenase-1 drives metaflammation and insulin resistance in mouse and man. Cell *158*, 25–40.
45. Sarrazy, V., Sore, S., Viaud, M., Rignol, G., Westerterp, M., Ceppo, F., Tanti, J.-F., Guinamard, R., Gautier, E.L., and Yvan-Charvet, L. (2015). Maintenance of Macrophage Redox Status by ChREBP Limits Inflammation and Apoptosis and Protects against Advanced Atherosclerotic Lesion Formation. Cell Rep *13*, 132–144.
46. Kellner-Weibel, G., Yancey, P.G., Jerome, W.G., Walser, T., Mason, R.P., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (1999). Crystallization of free cholesterol in model macrophage foam cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *19*, 1891–1898.
47. Scialò, F., Fernandez-Ayala, D.J., Sanz, A. (2017). Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: potential roles in health and disease. Front Physiol. *8*,428.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

48. Wang, Y., Subramanian, M., Yirdagul, A., Barbosa-Lorenzi, V.C., Cai, B., de Juan-Sanz, J., Ryan, T.A., Nomura, M., Maxfield, F.R., Tabas, I. (2017). Mitochondrial fission promotes the continued clearance of apoptotic cells by macrophages. Cell. *171*, 1-15.
49. Kanerva, K., Uronen, R.-L., Blom, T., Li, S., Bittman, R., Lappalainen, P., Peränen, J., Raposo, G., and Ikonen, E. (2013). LDL cholesterol recycles to the plasma membrane via a Rab8a-Myosin5b-actin-dependent membrane transport route. Dev. Cell *27*, 249–262.
50. Fond, A.M., Lee, C.S., Schulman, I.G., Kiss, R.S., and Ravichandran, K.S. (2015). Apoptotic cells trigger a membrane-initiated pathway to increase ABCA1. J. Clin. Invest. *125*, 2748–2758.
51. Frolov, A., Zielinski, S.E., Crowley, J.R., Dudley-Rucker, N., Schaffer, J.E., and Ory, D.S. (2003). NPC1 and NPC2 regulate cellular cholesterol homeostasis through generation of low density lipoprotein cholesterol-derived oxysterols. J. Biol. Chem. *278*, 25517–25525.
52. Zhang, J.R., Coleman, T., Langmade, S.J., Scherrer, D.E., Lane, L., Lanier, M.H., Feng, C., Sands, M.S., Schaffer, J.E., Semenkovich, C.F., et al. (2008). Niemann-Pick C1 protects against atherosclerosis in mice via regulation of macrophage intracellular cholesterol trafficking. J. Clin. Invest. *118*, 2281–2290.
53. Crosby, W.H. (1983). Hematopoiesis in the human spleen. Arch. Intern. Med. *143*, 1321–1322.
54. Wild, P.S., Zeller, T., Schillert, A., Szymczak, S., Sinning, C.R., Deiseroth, A., Schnabel, R.B., Lubos, E., Keller, T., Eleftheriadis, M.S., et al. (2011). A genome-wide association study identifies LIPA as a susceptibility gene for coronary artery disease. Circ Cardiovasc Genet *4*, 403–412.
55. Morris, G.E., Braund, P.S., Moore, J.S., Samani, N.J., Codd, V., and Webb, T.R. (2017). Coronary Artery Disease-Associated LIPA Coding Variant rs1051338 Reduces Lysosomal Acid Lipase Levels and Activity in Lysosomes. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *37*, 1050-57.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

Circulation Research
ONLINE FIRST

FIGURE LEGENDS

Figure 1. LIPA expression controls efferocytic capacity and lysosomal cholesterol trafficking. (A) Correlations between LIPA activity and the efferocytic index in human THP-1 macrophages exposed for 16 hours to medium alone (M0), 50 ng/mL LPS (M1) or 15 ng/mL IL-4 (M2). (B) THP-1 macrophages were transduced with empty or LIPA ShRNA lentiviral particles or transfected with scrambled or LIPA SiRNA before incubation with Cell-Tracker Deep Red-prelabeled apoptotic Jurkat cells and quantification of the efferocytic index by flow cytometry. LIPA overexpressing cells (Ovex) were also used in this assay. (C) BODIPY staining was quantified by flow cytometry in THP-1 macrophages after modulation of LIPA expression (as described above) and exposure for 30 minutes to apoptotic Jurkat cells. Data are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI). The dotted line represents the BODIPY-neutral lipid content into non-efferocytic control cells. (D-E) THP-1 macrophages (CD64+) were incubated for the indicated times in the presence or absence of 10 μM lalistat together with Cell-Tracker Deep Red-prelabeled apoptotic Jurkat cells, and the efferocytic index was quantified by flow cytometry. (F) THP-1 macrophages incubated in the presence or absence of 10 μM lalistat were stimulated with apoptotic Jurkat cells for the indicated times. BODIPY staining was quantified by flow cytometry. Inset depicts a representative histogram at the indicated time point. (G) Control or lalistat-treated THP-1 efferocytes, cultured for 1 hour after the ingestion of [^{3}H]-cholesterol-prelabeled apoptotic Jurkat cells, were fractionated by sucrose step gradient, and fractions were assayed for [^{3}H]-cholesterol incorporation as described in the Methods section. (H) Representative 3D reconstruction from confocal Z-stack images of an ingested apoptotic cell prelabeled with BODIPY (green) and localized within a phagolysosome (stained with LysoTracker^R Deep Red). Cells were counterstained with DAPI (nuclear staining). Arrows indicate BODIPY clusters in phagocytic cells (eight to ten different confocal images were analyzed per condition from experiments performed in triplicate). The data are given as the mean ± SEM of at least two experiments performed in triplicate. *P<0.05 *vs.* controls.

Figure 2. Defective lysosomal cholesterol hydrolysis promotes lysosomal damage-independent inflammasome activation after efferocytosis causing subsequent Rac1-dependent phagocytic cup defects. (A) Representative immunoblots of LC3I/II and phospho-Tfeb from control or lalistat-treated THP-1 macrophages incubated for 30 minutes with apoptotic Jurkat cells and cultured for various times. (B) Kinetics of band densities normalized to HSP90 are shown for the indicated times. (C) Cathepsin B secretion levels from control or lalistat-treated THP-1 efferocytes cultured for the indicated times after the ingestion of apoptotic cells and expressed in ng/mL. (D) IL-1β and IL-18 secretion levels (expressed in pg/mL) from control or lalistat-treated THP-1 efferocytes cultured for 3 hours after the ingestion of apoptotic cells in the presence or absence of 25 nM Nlrp3 inflammasome inhibitor (CP456773). The dotted lines represent IL-1□ and IL-18 secretion levels into non-efferocytic control cells. (E) Immunoblot of caspase-1 from control or lalistat-treated THP-1 macrophages incubated for 30 minutes with apoptotic Jurkat cells and cultured for various times and quantification of cleaved caspase-1. (F) Control and lalistat-treated THP-1 macrophages were incubated in the presence or absence of 25 nM Nlrp3 inflammasome inhibitor (CP456773) together with Cell-Tracker Red-prelabeled apoptotic Jurkat cells, and the efferocytic index was quantified by flow cytometry 16 hours later. (G) THP-1 macrophages incubated in the presence or absence of 10 □M lalistat were stimulated with cell tracker Deep Red-prelabeled apoptotic Jurkat cells for 30 minutes. After an additional culture period, the cells were counterstained with Rac1 (green), F-actin (red) and DAPI (nuclear staining); a 3D reconstruction from confocal Z-stack images is provided. (H) Immunoblots of Rac1 from control or lalistat-treated THP-1 macrophages cultured for 3 hours after the ingestion of apoptotic Jurkat cells in presence or absence of 25 nM of the Nlrp3 inflammasome inhibitor (CP-456773). (I) Real-time evaluation of macrophage protrusion dynamics by impedance reading of control or lalistat-treated THP-1 efferocytes in presence or absence of the Rac1 inhibitor, NSC23766. The data are given as the mean ± SEM of two to five independent experiments performed in triplicate. *P<0.05 *vs.* controls. #P<0.05 treatment effect.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

Figure 3. Defective lysosomal cholesterol hydrolysis restrains MAM-dependent mitochondrial metabolic repurposing after efferocytosis to activate the inflammasome and subsequent efferocytic defects. (A) Oxygen consumption rate (OCR) recordings of control, lalistat-treated or Lipa over-expressing (Ovex) THP-1 macrophages under the indicated conditions. (B) Representative histograms and (C) quantification of mitochondrial ROS generation using the MitoSox probe by flow cytometry in control and lalistat-treated THP-1 efferocytes cultured for 3 hours after ingestion of apoptotic cells in the presence or absence of 10 mM of the succinate oxidation inhibitor (dimethyl malonate, DMM) or 1μM of the succinate dehydrogenase inhibitor (3-nitropropionic acid, 3-NPA) or 1μM of rotenone. Data are expressed as mean fluorescence intensity (MFI). (D) IL-1β secretion levels in these cells at the end of the incubation period. (E) THP-1 macrophages were transduced with empty or GPR78 overexpressing adenoviral particles and loaded for 30 minutes with the fluorescent calcium probe Fluo4-AM before the start of the efferocytosis experiment. Control and lalistat-treated THP-1 macrophages were then incubated for 30 minutes with apoptotic Jurkat cells before treatment with carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) to release mitochondrial calcium. Mitochondrial calcium content was calculated as the difference in mean fluorescence intensity between conditions treated with or without CCCP. (F) Representative transmission electron microscopy images of control or lalistat-treated THP-1 efferocytes showing ER-mitochondria contacts (scale bar, 1 μm). (G) IL-1β secretion levels (H) and efferocytic index from control and GPR78 overexpressing THP-1 macrophages incubated in the presence or absence of 10 μM lalistat and cultured for 3 hours after the ingestion of apoptotic Jurkat cells. The results are expressed as the mean ± SEM of at least two independent experiments performed in triplicate. *P<0.05 *vs.* controls. #P<0.05 treatment effect.

Figure 4. Lysosomal cholesterol hydrolysis governs the efferocytic response by controlling oxysterol production. (A) Oxysterol metabolites (24S-, 4β-, 25- and 27-hydroxy(OH)cholesterol) were determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). (B) Effects of LIPA inhibition, LIPA overexpression and 25-OHC treatment (5 μM) on *Srebf2* and *Hmgcr* mRNA expression in THP-1 macrophages 3 hours post-efferocytosis. Quantified transcript levels (normalized to m36B4) are expressed in arbitrary units (a.u.). (C) OCR recordings of control and lalistat-treated THP-1 efferocytes in the presence or absence of 5 □M 25-OHC. (D) Control and lalistat-treated THP-1 macrophages, preloaded for 30 minutes with the fluorescent calcium probe Fluo4-AM, were incubated for 30 minutes with apoptotic Jurkat cells in presence or absence of 5 μM 25-OHC. Release of mitochondrial calcium was achieved at the end of the experiment by treating cells with carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP). Mitochondrial calcium content was calculated as the difference in mean fluorescence intensity between conditions treated with or without CCCP. (E) IL-1β secretion levels from control or lalistat-treated THP-1 efferocytes cultured for 3 hours after the ingestion of apoptotic cells in the presence or absence of 5 μM 25-hydroxycholesterol (25-OHC), 5 μM 27-hydroxycholesterol (27-OHC) or 3 μM LXR agonist (TO901317). (F) Control and lalistat-treated THP-1 macrophages were incubated under the same conditions as described above and the efferocytic index was quantified by flow cytometry 16 hours later. (G). MertK transcript levels (normalized to m36B4) were determined under the same conditions as described in (F) and expressed in arbitrary units (a.u.). (H) Control and lalistat-treated THP-1 macrophages were incubated in the presence or absence of 3 μM LXR agonist (TO901317) and 25 nM Nlrp3 inflammasome inhibitor (CP-456773) together with CellTracker Red-prelabeled apoptotic Jurkat cells and the efferocytic index was quantified by flow cytometry 16 hours later. The results are expressed as the mean ± SEM of two to five independent experiments. *P<0.05 *vs.* controls. #P<0.05 treatment effect.

Figure 5. Inhibition of lysosomal lipid hydrolysis promotes defective efferocytosis in vivo leading to pathogenic inflammation and splenic iron deposition under hypercholesterolemia. (A) Representative dot plots of gating for F4/80^{high}CD11b^{int} KCs, F4/80^{low}CD11b^{high} myeloid cells, and F4/80^{high}CD11b^{high} tMΦ in the liver (top) as well as F4/80^{high}CD11b^{int} RPMs and F4/80^{low}CD11b^{high} myeloid cells in the spleen (bottom) 16 hours after *i.v.* injection of CellTracker^{+} stressed erythrocytes (sRBCs, red) or apoptotic lymphocytes (UV-T, green). Black dot plots represent cells gated on CD45^{+} leukocytes in the liver and

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

spleen, and the red or green dot plot overlays show CellTracker^{+} cells. Quantification of (B-C) the efferocytic index of each cell type in the liver (myeloid, T-mac and KC) or the spleen (myeloid and RPM). (D) mRNA expression of efferocytic and inflammatory markers in 12-week high-fat-fed WT or *Ldlr*$^{-/-}$ mice treated for the last 2 weeks with subcutaneous injections of either saline or 20 mg/kg lalistat every two days. (E) Perl's Prussian stain for ferric iron in the spleens of these mice (original magnification, 40x and 100x). (F) Iron levels and (G) ferritin levels in spleen, liver and adipose tissue of WT or saline and lalistat-treated *Ldlr*$^{-/-}$ mice on a high-fat diet. The data are expressed as the mean ± SEM of 4 to 6 animals per group. *$P<0.05$ *vs.* saline-injected control or *Ldlr*$^{-/-}$ mice.

Figure 6. Graphical abstract.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

American Heart Association
Circulation Research
ONLINE FIRST

Novelty and Significance

What Is Known?

- Macrophages accumulate a substantial amount of cholesterol following the ingestion of apoptotic cells (ACs).

- LIPA (lysosomal acid lipase) is an endocytic enzyme that hydrolyzes cholesteryl esters into free cholesterol.

- LIPA-deficiency causes macrophage foam cell formation and tissue inflammatory phenotypes.

What New Information Does This Article Contribute?

- LIPA hydrolyzes cholesteryl esters from ingested ACs, allowing efficient oxysterol production to transcriptionally prime macrophages for cholesterol efflux and clearance of ACs via liver X receptor activation.

- LIPA allows 25-hydroxycholesterol generation to repurpose mitochondrial metabolism, preventing activation of the Nlrp3 inflammasome and Rac1-dependent phagocytic cup disassembly.

- LIPA orchestrates disposal of stressed erythrocytes and apoptotic lymphocytes in vivo.

Everyday, billions of dying cells are phagocytosed through efferocytosis to prevent the inflammatory consequences associated with the accumulation of apoptotic debris. Therefore, it has been proposed that defective efferocytosis impairs tissue homeostasis. Here, we found that LIPA-dependent lysosomal cholesterol hydrolysis is essential to maintain an efficient efferocytic response. In vivo, defective clearance of stressed erythrocytes and apoptotic lymphocytes after LIPA inhibition led to an enhanced inflammatory response, culminating in splenomegaly under hypercholesterolemia. Thus, by controlling lysosomal cholesterol hydrolysis, LiPA links the macrophage efferocytic response to chronic inflammation.

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

American Heart Association
Circulation Research
ONLINE FIRST

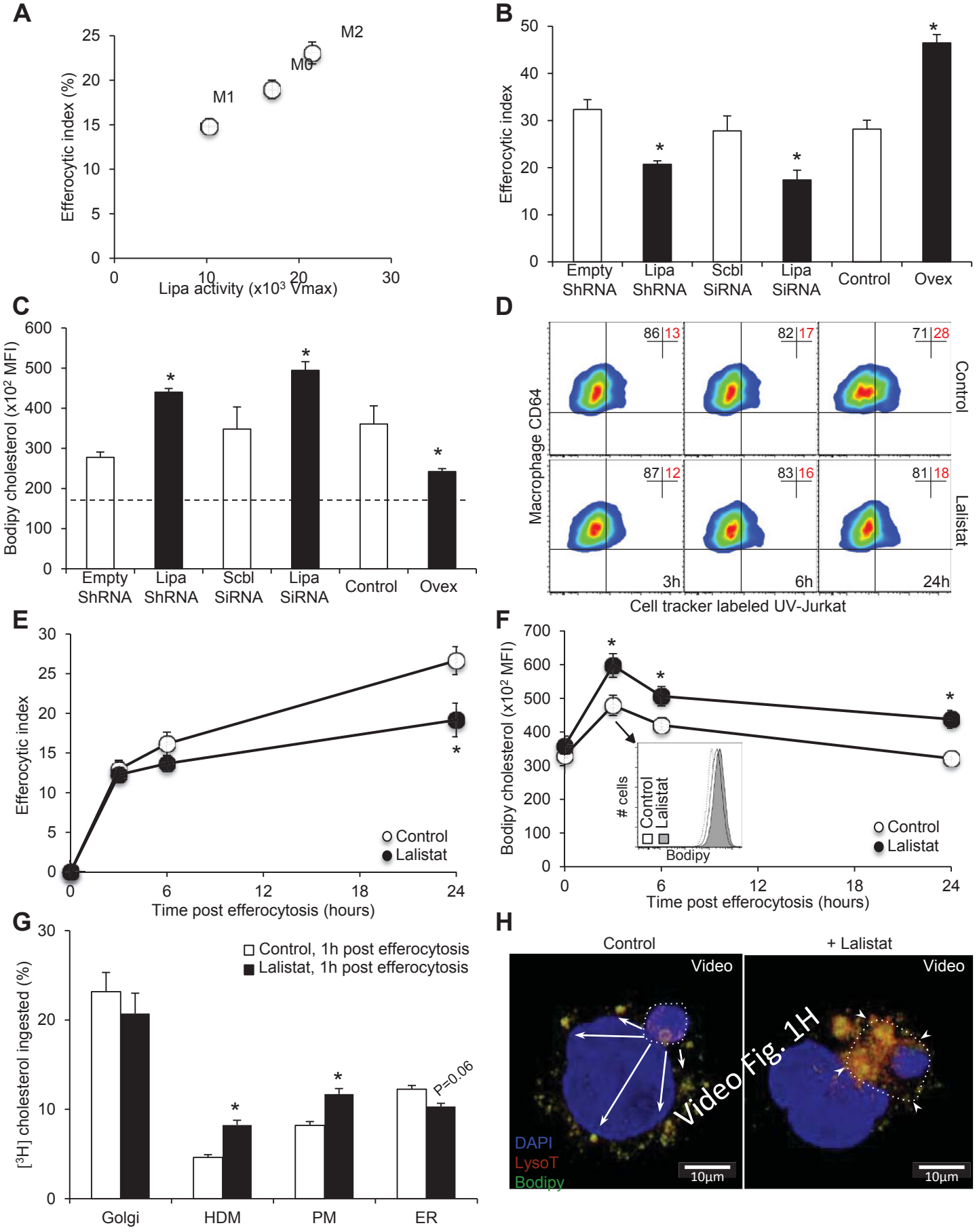
Table 1

	Saline-treated $Ldr^{-/-}$	Lalistat-treated $Ldr^{-/-}$
Body weight (g)	24.97 ± 0.32	24.60 ± 1.02
Epidydimal adipose tissue (mg)	563 ± 133	485 ± 98
Spleen (mg)	109 ± 13	178 ± 37*
Plasma cholesterol levels (mg/mL)	2.14 ± 0.26	2.18 ± 0.25
Plasma triglyceride levels (mg/mL)	3.69 ± 0.85	4.42 ± 0.19
Plasma ALT levels (U/L)	8.71 ± 1.24	9.77 ± 0.64
Plasma AST levels (U/L)	16.31 ± 3.48	17.63 ± 0.31
Plasma BUN levels (mg/dL)	13.7 ± 3.2	16.5 ± 1.5
Plasma cystatin C levels (mg/L)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Plasma iron levels (mg/L)	6.19 ± 1.77	6.49 ± 1.44
Plasma ferritin levels (mg/L)	0.34 ± 0.03	0.34 ± 0.01
Plasma IL-1b levels (pg/mL)	*ND*	21.5 ± 5.9
Splenic IL-1b content (pg/mg protein)	114 ± 29	331 ± 37*

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

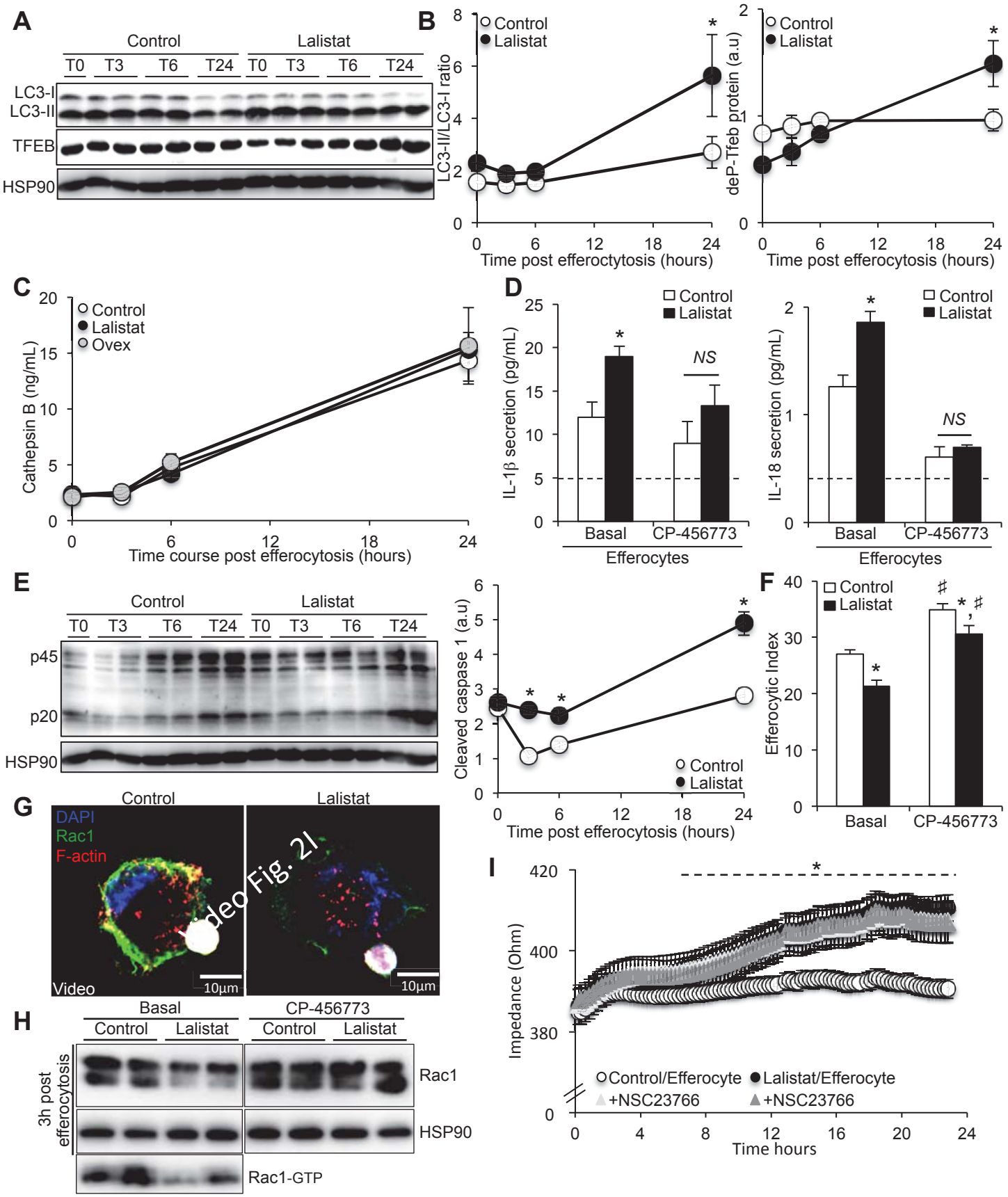
American Heart Association
Circulation Research
ONLINE FIRST

Fig. 1



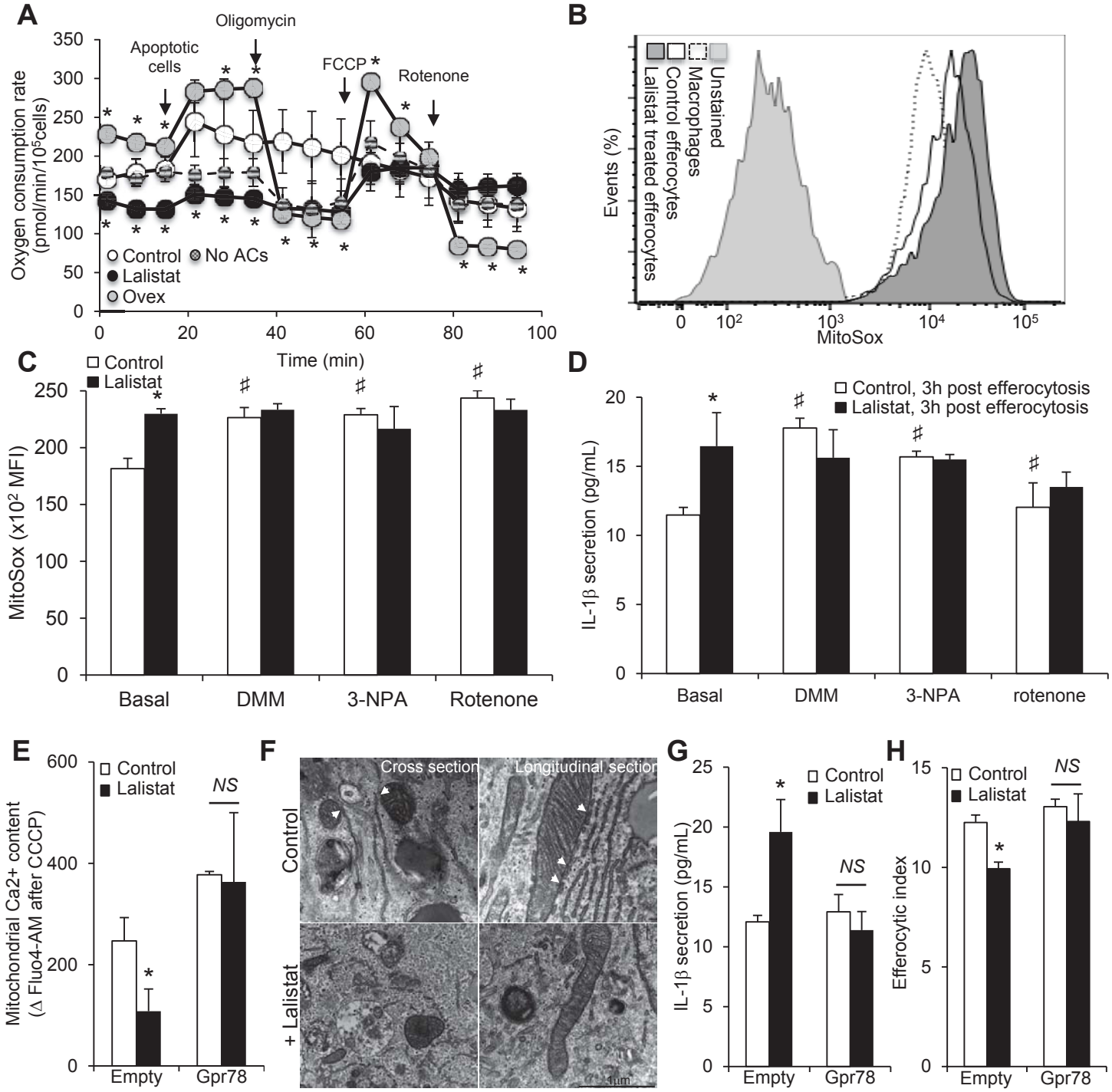
Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

Fig. 2



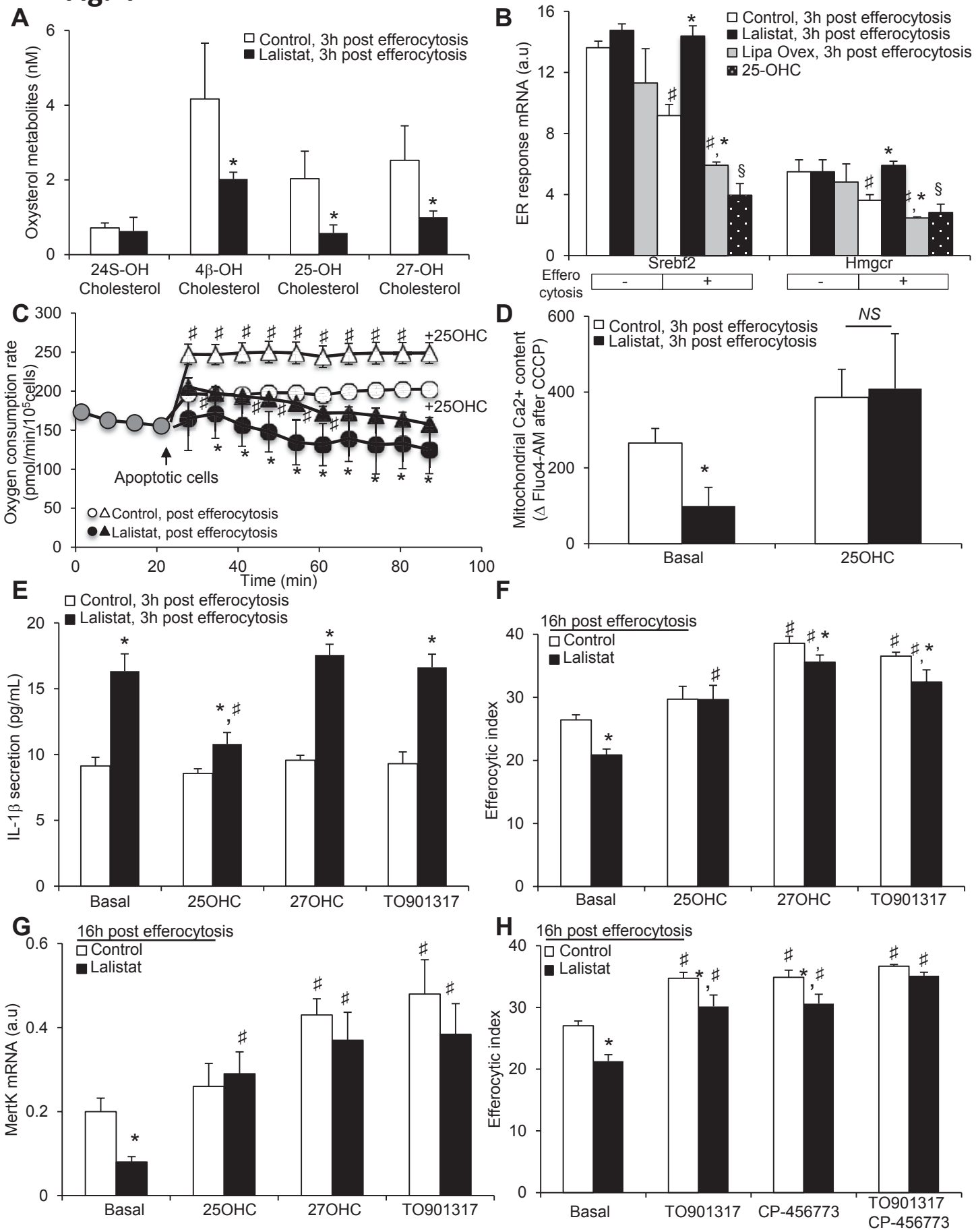
Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

Fig. 3



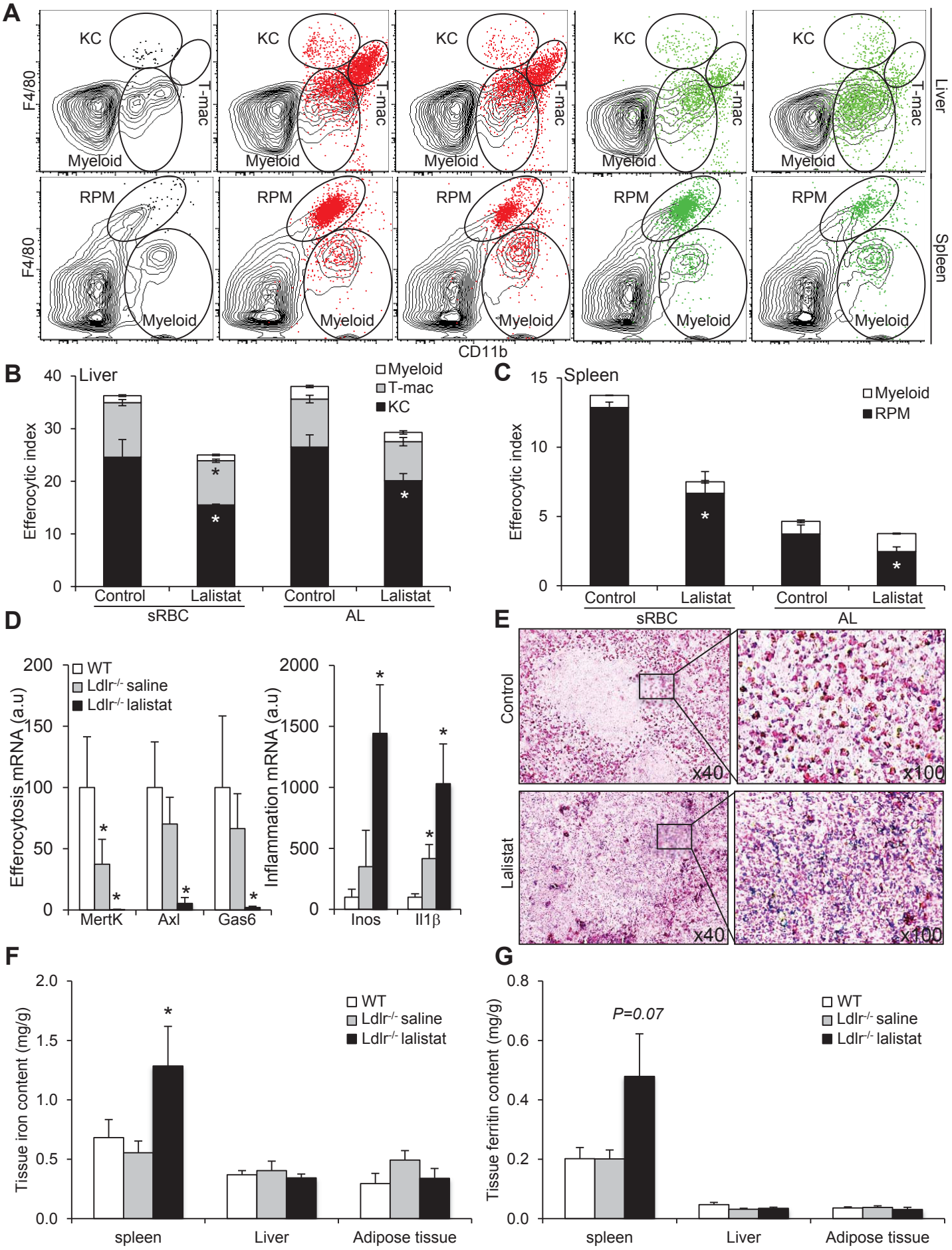
Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

Fig. 4



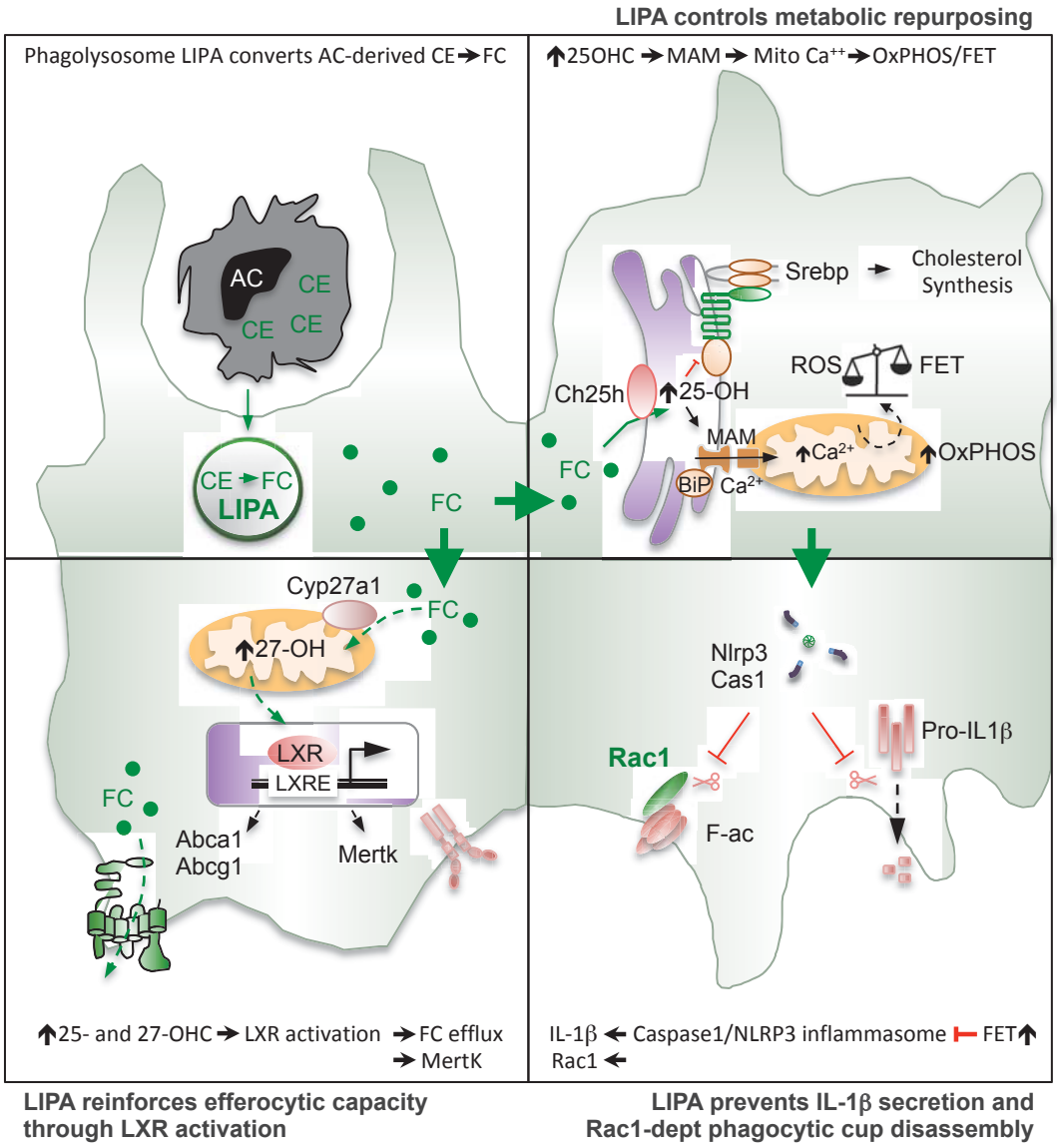
Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

Fig. 5



Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

Fig. 6 (Graphical abstract)



Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

Circulation Research
Journal of the American Heart Association

Lysosomal Cholesterol Hydrolysis Couples Efferocytosis to Anti-Inflammatory Oxysterol Production

Manon Viaud, Stoyan Ivanov, Nemanja Vujic, Madalina Duta-Mare, Lazaro-Emilio Aira, Thibault Barouillet, Elsa Garcia, François Orange, Isabelle Dugail, Isabelle Hainault, Christian Stehlik, Sandrine Marchetti, Laurent Boyer, Rodolphe Guinamard, Fabienne Foufelle, Andrea E Bochem, Kees G Hovingh, Edward B Thorp, Emmanuel L Gautier, Dagmar Kratky, Paul A Da Silva-Jardine and Laurent Yvan-Charvet

Circ Res. published online March 9, 2018;
Circulation Research is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75231
Copyright © 2018 American Heart Association, Inc. 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/content/early/2018/03/08/CIRCRESAHA.117.312333

Data Supplement (unedited) at:
http://circres.ahajournals.org/content/suppl/2018/03/08/CIRCRESAHA.117.312333.DC2

Permissions: Requests for permissions to reproduce figures, tables, or portions of articles originally published in *Circulation Research* can be obtained via RightsLink, a service of the Copyright Clearance Center, not the Editorial Office. Once the online version of the published article for which permission is being requested is located, click Request Permissions in the middle column of the Web page under Services. Further information about this process is available in the Permissions and Rights Question and Answer document.

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

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

Downloaded from http://circres.ahajournals.org/ by guest on April 29, 2018

Supplement Material

Reagents. Cell culture media and heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) were from Invitrogen. Chemical reagents were from Sigma unless specified below. Lalistat was purchased from Enamine ad used as previously described.[1] The antibodies were obtained as follows: p47^{phox} (sc-7660), caspase-1 (sc-1780), LIPA (sc-58374) and hsp90 (sc-13119) from Santa Cruz Biotechnology, Tfeb (A303-673A) from Bethyl Laboratories, LC3-I/II (2775S) from Cell Signaling and Rac1 (610651) from BD Biosciences. Flow cytometry probes were obtained as follows: Bodipy-cholesterol Green and AnnexinV from Life Technologies, FAM-Flica from AbCys Eurobio and Lysosensor Green, LysoTracker^{R} Deep Red, ROS (CM-H2DCFDA), MitoSox and Fluo4-AM from Molecular Probes.

Plasma content analysis. Plasma multi-analyte profiling was performed using a Cobas^{R} clinical chemistry analyzer (Roche Diagnostics).

Plasma HDL preparation. Apo-B containing particles was precipitated from plasma by adding 100µL plasma to 40µL of 20% polyethyleneglycol (PEG, Sigma P-2139 in 200mM glycine, pH 10) solution. This mixture was incubated at room temperature for 15 minutes. After this incubation, the solution was centrifuged at 4,000 rpm for 20 minutes. The supernatant, containing HDL fractions (PEG-HDL), was removed and used for experiments as previously described.[2].

***In vivo* clearance of apoptotic or stressed cells.** To generate apoptotic lymphocytes (ALs), thymi and spleens from 10- to 12- week-old C57BL/6J mice were harvested and mechanistically dissociated, filtered, pelleted and resuspended in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (1:1 mixture). Lymphocytes were labelled with Cell-Tracker red (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Apoptosis was induced by UV radiation at 312nm for 10min and cells were maintained in culture for an additional 2hours. This method results in 70-90% apoptotis.[2] Fluorescent ALs were washed twice with PBS and 6.5×10^7 ALs per mouse were injected intravenously as previously described.[3] A second *in vivo* clearance assay used mice that were injected with stressed red blood cells (sRBCs) as previously described.[4] Briefly, whole blood collected from C57BL/6J mice was pooled, centrifuged at 400*g* for 10min, and the buffy coat was removed. In a second step, RBCs were diluted in PBS and leukoreduced using an adapted Ficoll gradient protocol (Lymphocytes separation medium, AbCys Eurobio). Erythrocytes were labelled with Cell-Tracker red (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RBCs were then heated for 20min at 48°C under continuous shaking, generating stressed erythrocytes. Fluorescent sRBCs were washed twice with PBS and 400µL of sRBCs adjusted at approximately 16 to 17g/dL of hemoglobin level per mouse were injected intravenously. Mice were sacrificed 16h after injection, and the isolated liver and spleen cells were analyzed by flow cytometry for Cell-Tracker red labeling with up to six mice per group. At this time point, most sRBCs and ALs had disappeared from the circulation. The efferocytic index was determined by flow cyometry and calculated as the number of cells ingested per the total number of macrophages x 100.

***In vivo* flow cytometry analysis.** Leukocytes were collected from spleens, peritoneal cavities, livers and perigonadic adipose tissues. Splenocytes were extracted by pressing spleens through a stainless steel grid. Peritoneal leukocytes were harvested by PBS lavage. Liver and adipose tissue were cut in small piece and digested with 1mg/mL collagenase D (Roche) or collagenase A (Roche) for 30min at 37ºC, respectively. For liver preparation, and additional purification step was performed by Percoll gradient. Single-cell suspension was submitted to red blood cell lysis, filtration and centrifugation for 5min at 1,000rpm. Cell suspensions were stained with the appropriate antibodies for 30min on ice. The following antibodies were used for macrophage flow cytometric analysis: CD45 (30-F11, BD

Bioscience), CD64 (X54-5/7.1, BioLegend), CD11b (M1/70, BioLegend), CD115 (AFS98, BioLegend), CD206 (MR5D3, Bio-Rad) and F4/80 (BM8, BioLegend) using dilution recommended by the manufacturer. Cells were first gated using FSC/SSC characteristics, and doublets were excluded by comparing FSC-height and -area signals. CD45 antibody is used to exclude non-hematopoietic cells. Data were acquired on BD FACS Canto II cytometer and analysed with FlowJo (Tree Star).

Histochemical analysis. Mice were sacrificed and spleen was harvested and fixed in 4% paraformaldehyde. Spleen was embedded in paraffin and 5µm sections were performed using a Microm HM340E microtome (Microm Microtech, Francheville France). Tissue iron distribution was visualized using the Perl's Prussian blue staining method as previously described,[5] and counterstained with eosin.

Tissues and serum iron and ferritin contents. Spleens, livers, perigonadic adipose tissues and serum were analysed for non-heme iron as previously described.[5] Briefly, tissues were weighted and digested in 3M hydrochloric acid/10% trichloroacetic acid, at 65°C for 20h. Iron and ferritin levels were quantified in acid extracts or serum using Cobas^{R} clinical chemistry kits (Roche Diagnostics).

Human THP-1 macrophages and treatments. THP-1 monocytes (TIB-202, ATCC) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C in 5% CO_2. Cells were treated with 100nM PMA (Phorbol myristate acetate) for 3days to facilitate differentiation into macrophages. Adherent cells consisting of macrophages were used for experiments as described in the figure legend in absence or presence of 10µM lalistat during the course of the experiment. The use and concentration of different inhibitors are described in the figure legends. Where indicated, macrophages were incubated for the indicated period of time with 2.5% plasma, 2.5% PEG-HDL, 50ng/mL lipopolysaccharides (LPS, Escherichia coli 0111:B4, Sigma), 20ng/mL IL-4 or apoptotic Jurkat cells (see below). In some experiments, macrophages were incubated with 5 µM 25-hydroxycholesterol (25OHC), 3 µM LXR agonist (TO901317), 5µM 27-hydroxycholesterol (27OHC), 25 nM CP-4567773, 10 mM Dimethyl Malonate (DMM), 1 µM 3-nitropropionic acid (3-NPA), 1µM rotenone, 150 nM cell membrane-permeant derivative of nictotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP-AM), 20 µM Mucolipin TRP channel 1 agonist (ML-SA1), 100 µM 2-aminoethyl diphenylborinate (2-ABP) or 50 µM NSC23766 after incubation of the cells with apoptotic Jurkat cells for 30 minutes (see below). RNA interference to suppress CH25H expression was obtained from GE Dharmacon (On-Targetplus Smartpool siRNA) and deliverd into cells using lipofectamine 2000 as previously described in macrophages.[2] Stable LIPA overexpressing THP-1 macrophages and control cells were generated after electroporation of a neomycin resistant pCDN3.3 vector containing human LIPA gene. One out of 7 clones was selected for further analysis based on LIPA expression and activity.

Isolation of mouse peritoneal macrophages. Peritoneal macrophage cells were harvested from WT mice 3 days after receiving an i.p injection of thioglycollate and plated in 10% FBS in DMEM media. After a 1-hour incubation at 37°C, non-adherent cells were removed and adherent cells consisting of macrophages were used for experiment as described in the figure legend. In some experiments, caspase 1 deficient macrophages were used (B6N.129S2-Casp1^{tm1Flv}/J from Jax).

Lipa and Nlrp3 deficient macrophages. Lipa bone marrow cells and immortalized Nlrp3$^{-/-}$ bone marrow cells were kindly provided by Dr. Kratky (Medical University of Gratz, Austria) and Dr. Stelhik (Feinberg School of Medicine, Northwestern University), respectively. Bone-marrow-derived macrophages were cultured in 10% FBS in DMEM media supplemented with macrophage-colony stimulating factor (M-CSF; 20ng/mL; R&D Systems) for 5-10 days before the experiment.[2]

Gpr78 overexpressing macrophages. GRP78 adenoviruses were kindly provided by Dr. Foufelle (Inserm UMRS 1138, Centre de Recherche des Cordeliers). Adenoviruses were amplified in HEK 293 cells and purified on a cesium chloride gradient. THP-1 macrophages were infected at 10 Multiplicity of Infection 48 hours before the start of the experiment.

***In Vitro* Efferocytosis experiments.** Efferocytosis experiments were performed as previously described.[2] Briefly, apoptosis of Jurkat T cells (TIB-152, ATCC) was induced by UV radiation at 312nm for 10min and maintained in culture for 2hours before incubation with macrophages (ratio 5:1) for 30min. For measurement of uptake of apoptotic Jurkat T cells into macrophages, Jurkat T cells were prelabeled with Cell-Tracker red (invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The efferocytic index was determined by flow cytometry and calculated as the number of cells ingested per the total number of macrophages x 100. In some experiments, PI was confirmed by microscopy from at least three separate fields (containing ~1,000 cells) from triplicate wells.

Efferocyte cholesterol efflux. Jurkat cells were cultured for 24h in 10%FBS in RPMI containing 1μCi/mL [^{3}H]-cholesterol. Apoptosis of [^{3}H]-cholesterol labelled Jurkat cells was next induced and cells were incubated with human THP-1 macrophages as described above. After 3 extensive washes and an equilibration period of 15min, cholesterol efflux was performed for the indicated period of time in 0.2% BSA RPMI containing 25µg/mL apoA-I or 25µg/mL PEG-HDL. The cholesterol efflux was expressed as the percentage of the radioactivity released from the cells in the medium relative to the total radioactivity in cells plus medium.

Intracellular isotopic cholesterol distribution. A sucrose gradient was prepared by layering 1.98mL of 1.1M sucrose, 1.72mL of 0.88M sucrose, and 1.72mL of 0.58M sucrose in a 6.3mL centrifuge tube. Human THP-1 macrophages ($25x10^6$ cells) incubated for 1hour with [^{3}H]-cholesterol labelled apoptotic Jurkat cells (see protocol above) were collected and homogenized in 2.633mL of low-ionic strength buffer (10mM TrisHCl pH 7.5, 0.5mM $MgCl_2$, 1mM Phenyl Methane Sulfonyl Fluorid, 100U/mL aprotinin). The homogenates were then made isotonic by the addition of 0.527mL of low-ionic strength buffer (1.46M sucrose, 0.3M KCl, 6mM β-Mercapto-Ethanol, 49μM $CaCl_2$, 10mM TrisHCl pH 7.5) and then centrifuged at 10,000g for 15 min at 4°C. The supernatant was divided into two equal portions loaded onto two sucrose density gradient tubes, and centrifuged at 100,000g for 2 hours at 4 °C. This procedure resulted in visible bands at each of the four interfaces plus a pellet as previously described.[6] The pellet, which was enriched in endoplasmic reticulum was washed twice and then resuspended in 150 μl of Buffer A (0.25mM sucrose, 0.15M KCl, 3mM β-Mercapto-Ethanol, 20μM $CaCl_2$, 10mM Tris HCl pH 7.5). The radioactivity was quantified in the five fractions collected and expressed as the percentage of the radioactivity ingested.

Thin-Layer Chromatography (TLC)- Total lipid content was extracted according to the method of Bligh and Dyer. The organic phase containing lipids including the [^{3}H]-cholesterol was collected, evaporated under nitrogen flux and resuspended in 50μL isopropranol. The total amount of extracted lipids was dropped on silica gel POLYGRAM precoated TLC sheets (Sigma). Separation of [^{3}H]-free cholesterol (FC) and [^{3}H]-cholesteryl esters (CE) was achieved in hexane/diethylether/formic acid (80:20:1, v/v/v) running buffer. The radioactivity was quantified and expressed as the percentage of the radioactivity ingested.

Impedance reading of protrusion dynamics. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) analyser (Applied BioPhysics) was used for real time analysis of morphological changes of intact cells and analysis was performed by ECIS platform (Acquire Innovation). Briefly, human THP-1 monocytes were seeded at $5x10^5$ cells/well in ECIS plates containing gold film electrodes before differentiation into macrophages. After incubation with apoptotic Jurkat cells ($2.5x10^6$ cells/mL), the frequency dependent electrical impedance was measured

in cell-covered electrodes subject to an alternate small electric current. Results were expressed as Ohm normalized to baseline immediately after impedance recordings

Cellular respiration Assays. XPF extracellular flux analyzer (Seahorse Biosciences) was used for real time analysis of the Oxygen Consumption Rate (OCR) of intact cells according to manufacturer's instructions. Briefly, macrophages were seeded at $5x10^5$ cells/well in XPF plates. After incubation with apoptotic Jurkat cells ($2.5x10^6$ cells/mL), efferocytes were treated according to manufacturer's instructions to determine mitochondrial respiration. Results were normalized to the actual cell count immediately after OCR recordings

Lipa activity measurement. LIPA activity was performed as previously described.[7] Briefly, cells were homogenized in 10mM Tris pH8, 50 mM NaCl, 1% Triton X100 buffer containing proteases inhibitors. Protein concentration in cell lysates was determined using a BCA dosage kit (Pearce). A mixture of cell lysate (50μg of protein) was incubated for 30 minutes at 37°C with 250μM of 4-MethylUmbelliferyl Oleate (4-MUO, Sigma) reconstituted in 200mM sodium acetate solution pH 5. To stop the reaction, 1M Tris pH 8 (100μL) was added, and fluorescence intensity was measured.

Rac1 activity assay. Rac1 activity was determined by performing a pull-down of Rac1-GTP (PR-962, Jena Bioscience) according to manufacturer's instructions.

Mitochondrial calcium content. We carried out mitochondrial calcium measurements as previously described,[8] with minor modifications. Briefly, THP-1 macrophages were loaded with 5 μM of the calcium probe Fluo4-AM for 30 minutes at 37°C before the start of the efferocytosis experiments. At the end of the experiment, cells were treated for 10 minutes with 2 μM carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), a mitochondrial uncoupler to release mitochondrial calcium and cellular calcium was determined by flow cytometry. Mitochondrial calcium content was calculated as the difference in mean fluorescence intensity between conditions treated with or without CCCP.

Cellular lipid content. Total lipids were extracted with chloroform/methanol from total cell lysates. Cholesterol or triglyceride mass in cells was determined using colorimetric kits (Wako Chemicals).

Directed lipidomic assays. Lipidomic analyses were performed with mass spectrometry by Biocrate Life Sciences using AbsoluteIDQ^R p180-oxysterol assay kit. Briefly, Metabolites from sterol pathway (sterol precursors : lanosterol, 24-dihydrolanosterol, 7-dehydrocholesterol and desmosterol); toxic sterols : alpha triol (cholesterol-3beta, 5alpha, 6beta-triol), alpha epox (cholesterol-5alpha, 6alpha-epoxide), 7alpha-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol; oxysterols : 24S-, 4β-, 25- and 27-hydroxy(OH)cholesterol) were analyzed in human THP-1 efferocytes as indicated in the figure legends. Sterols were extracted according to manufacturer's instructions and analyzed by reversed phase liquid chromatography-mass spectrometry (LC-ECI-MS/MS) to realize liquid chromatography separation, and thus individual quantification of isobaric sterols. The most selective detection was performed in positive MRM detection mode using a SCIEX 4000QTrap tandem mass spectrometry instrument (Applied Biosystems). Data were quantified with Analyst software.

Secretion analysis- Secretion levels of IL1-β, IL-18, Cathepsin D, Cathepsin B and Cathepsin K in human THP-1 macrophages were measured using enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) (R&D systems and RayBiotech, Inc.).

***In vitro* flow cytometry assays.** Cells were harvested after trypsin or 5mM EDTA treatment of adherent cells and stained for flow cytometry during 30min at 4°C with labeled antibodies as previously described.[9] Briefly, most of the staining were performed on live cells but for staining performed on fixed cells, one additional step of permeabilization and fixation was

added prior of staining using BD Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) according to manufacturer instructions. Flow cytometry analysis was performed on BD FACS Canto II (BD Biosciences) and analysed with FlowJo (Tree Star). All antibodies were from Biolegend and BD Bioscience and gating strategies are depicted in the Figures. All conditions were performed in triplicates with at least n=3 experiments. Cellular cholesterol content was quantified using the Bodipy-cholesterol probe (Life Technologies), lysosomal content and acidification using the LysoTracker^{R} Deep Red and Lysosensor Green probes (Molecular Probes), Ros production using the CM-H2DCFDA probe (Molecular Probes) and caspase-1 activation was monitored in live cells using the FAM-FLICA assay with the flurosescent FAM-YVAD-FMK probe (Fluorescent Labeled Inhibitor of Caspases) (AbCys Eurobio) according to manufacturer's instructions.

Transmission Electronic Microscopy. Cells were observed with transmission electron microscopy (TEM) for ultrastructural analysis. Cells were fixed in a 1.6 % glutataraldehyde solution in 0.1 M sodium phosphate buffer at room temperature (RT) and stored overnight at 4°C. After three rinsing in 0.1 M cacodylate buffer (15 min each), cells were postfixed in a 1 % osmium tetroxide and 1 % potassium ferrocyanide solution in 0.1 M cacodylate buffer for 1 hour at RT. Cells were subsequently dehydrated in a series of acetone baths (90 %, 100% three times, 15 min each) and progressively embedded in Epon 812 resin (acetone / resin 1:1, 100 % resin two times, 2 hours for each bath). Resin blocs were finally left to harden in a 60 °C oven for 2 days. Ultrathin sections (70 nm) were obtained with a Reichert Ultracut S ultramicrotome equipped with a Drukker International diamond knife and collected on 200 mesh copper grids. Sections were stained with lead citrate and uranyl acetate. TEM observations were performed with a JEOL JEM-1400 transmission electron microscope, equipped with a Morada camera, at a 100 kV acceleration voltage. For analysis of cell adhesive/contact properties, digitized images acquired by TEM were analyzed with ImageJ and data were expressed as percentage of cell contact.

Immunohistochemistry. Human THP-1 macrophages were cultured on coverslips and incubated with the different preparations described below. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma) for 15 min at 4°C. Unspecific staining was avoided with a blocking step in PBS 0.1% Triton X100 1% BSA. The coverslips were mounted using Mowiol (Calbiochem) and visualized with a Axioskop 2 FS MOT upright confocal microscope (Nikon 1AR+). Images were obtained by implementing z-scanning, enhanced for publication purposes and analyzed using the ImageJ software as previously described.[2] 3D reconstruction from confocal Z-stack images was also generated. At least three separate fields from triplicate wells for each treatment condition were randomly analyzed.
- *Bodipy-cholesterol diffusion.* UV-induced apoptotic Jurkat cells were stained with 5μM Bopidy-cholesterol for 30min and incubated with THP-1 macrophages for an additional 30min. Then, cells were stained with LysoTracker^{R} Deep Red during 30 minutes at 37°C, as recommended by the manufacturer (Molecular Probes). Cells were washed several times and fixed in 4% formaldehyde solution. Slides were counterstained with DAPI (Sigma). For the quantification of Bopidy-cholesterol in phagolysosome, the mean gray intensity of Bopidy-cholesterol was divided by the mean gray intensity of LysoTracker^{R} Deep Red.
- *Lysosome acidification*. UV-induced apoptotic Jurkat cells were incubated with THP-1 macrophages for 30min as described above and after several washes, 1μM LysoSensor Green was added to cell medium for an additional 30min at 37°C as recommended by the manufacturer's instructions. Cells were washed several times and fixed in 4% formaldehyde solution. Nuclei were counter-stained by addition of DAPI (Sigma). Quantification of LysoSensor Green intensity was performed using the ImageJ software and expressed as mean LysoSensor intensity.
- *p47^{phox} clustering.* Human THP-1 macrophages were incubated with apoptotic Jurkat cells for 30min as described above. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at 4°C and permeabilized with 0.5% Triton for 5min before overnight immunostaining with p47^{phox} antibody as previously described.[2] For the quantification of p47^{phox} in phagolysosome,

the mean gray intensity of $p47^{phox}$ was divided by the mean gray contrast of apoptotic Jurkat cells.
- *Membrane ruffling.* UV-induced apoptotic Jurkat cells were stained with LysoTracker Deep Red for 30min and incubated with THP-1 macrophages for an additional 30min. Then, cells were kept in culture for an additional 30min and washed several times before staining. THP-1 efferocytes were immunostained overnight with Rac1 antibody (Clone 610651, BD Biosciences) in PBS 0,1% Triton X-100, 1% BSA. F-actin was stained with Texas Red-X Phalloidin as recommended by the manufacturer (ThermoScientific). Slides were counterstained with DAPI (Sigma).

Western Blotting. The expression of caspase-1, Nlrp3, Tfeb, LC3-I/II, Rac-1 and LIPA were measured in human THP-1 macrophages or in the cell and supernatant of bone marrow derived macrophages by Western blot analysis. Briefly, cell extracts were electrophoresed on 4-20% gradient SDS-PAGE gels and transferred to 0.22-μm nitrocellulose membranes. The membrane was blocked in Tris-buffered saline, 0.1% Tween20 containing 5%(w/v) nonfat milk (TBST-nfm) at room temperature (RT) for 1h and then incubated with the primary antibody in TBST-nfm at RT for 4h, followed by incubation with the appropriate secondary antibody coupled to horseradish peroxidase. Proteins were detected by ECL chemiluminescence (Pierce). References for primary antibodies are provided in the 'Materials' section. Intensity of each protein strips was quantified using Image J software.

RNA analysis. Total RNA extraction, cDNA synthesis and real-time PCR were performed as described previously.[2] m36B4 RNA expression was used to account for variability in the initial quantities of mRNA.

Statistical analysis
Data are shown as mean ± SEM. Statistical significance was performed using two-tailed parametric student's t test or by one-way analysis of variance (ANOVA, 4-group comparisons) with a Bonferroni multiple comparison post-test according to the dataset (GraphPad software, San Diego, CA). Results were considered as statistically significant when $P<0.05$.

References

1. Rosembaum A, I., Cosner, C.C., Mariani, C.J., Maxfield, F.R., Wiest, O., Helquist, P. (2010). Thiadiazole carbamates: potent inhibitors of lysosomal acid lipase and potential Niemann-Pick type C disease therapeutics. J. Med. Chem. *53*, 5281-9.

2. Yvan-Charvet, L., Pagler, T.A., Seimon, T.A., Thorp, E., Welch, C.L., Witztum, J.L., Tabas, I., and Tall, A.R. (2010). ABCA1 and ABCG1 protect against oxidative stress-induced macrophage apoptosis during efferocytosis. Circ. Res. *106*, 1861–1869.

3. Scott, R.S., McMahon, E.J., Pop, S.M., Reap, E.A., Caricchio, R., Cohen, P.L., Earp, H.S., and Matsushima, G.K. (2001). Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. Nature *411*, 207–211.

4. Theurl, I., Hilgendorf, I., Nairz, M., Tymoszuk, P., Haschka, D., Asshoff, M., He, S., Gerhardt, L.M.S., Holderried, T.A.W., Seifert, M., et al. (2016). On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver. Nat. Med. *22*, 945–951.

5. Kohyama, M., Ise, W., Edelson, B.T., Wilker, P.R., Hildner, K., Mejia, C., Frazier, W.A., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2009). Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis. Nature *457*, 318–321.

6. Li, Y., Ge, M., Ciani, L., Kuriakose, G., Westover, E.J., Dura, M., Covey, D.F., Freed, J.H., Maxfield, F.R., Lytton, J., et al. (2004). Enrichment of endoplasmic reticulum with cholesterol inhibits sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase-2b activity in parallel with increased order of membrane lipids: implications for depletion of endoplasmic reticulum calcium stores and apoptosis in cholesterol-loaded macrophages. J. Biol. Chem. *279*, 37030–37039.

7. Emanuel, R., Sergin, I., Bhattacharya, S., Turner, J.N., Epelman, S., Settembre, C., Diwan, A., Ballabio, A., and Razani, B. (2014). Induction of lysosomal biogenesis in atherosclerotic macrophages can rescue lipid-induced lysosomal dysfunction and downstream sequelae. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *34*, 1942–1952.

8. Lloyd-Evans, E., Morgan, A., He, X., Smith, D.A., Elliot-Smith, E., Sillence, D.J., Churchill, G.C., Schuchman, E.H., Galione, A., Platt, F.M. (2008). Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. Nat Med. *14*, 1247-55.

9. Sarrazy, V., Sore, S., Viaud, M., Rignol, G., Westerterp, M., Ceppo, F., Tanti, J.-F., Guinamard, R., Gautier, E.L., and Yvan-Charvet, L. (2015). Maintenance of Macrophage Redox Status by ChREBP Limits Inflammation and Apoptosis and Protects against Advanced Atherosclerotic Lesion Formation. Cell Rep *13*, 132–144.

Supplemental Figure I. Defective lysosomal cholesterol hydrolysis promotes lysosomal cholesterol accumulation during efferocytosis. (A) Lysosomal acid lipase (LIPA) mRNA expression (normalized to m36B4) was determined by real-time polymerase chain reaction (PCR) in human THP-1 macrophages after LIPA knockdown (using lentiviral ShRNA particles or siRNA) or after LIPA inhibition achieved with 10 μM lalistat. (B, upper panel) Immunoblot of LIPA from control and LIPA-overexpressing THP-1 macrophages (LIPA Ovex) generated by lentiviral transfection. LIPA Ovex THP-1 macrophage clone #2 was selected for further analysis. (B, lower panel) LIPA activity from control, lalistat-treated and LIPA-overexpressing (clone #2) THP-1 macrophages. Enzymatic activity (normalized to control DMSO) was quantified at acidic pH at 37°C after the reaction was initiated by adding 250 μM 4MUO substrate and monitored for 30 minutes. (C) WT and Lipa deficient bone marrow-derived macrophages were incubated for the indicated times in the presence or absence of 10 μM lalistat together with Cell-Tracker Deep Red-prelabeled apoptotic Jurkat cells, and the efferocytic index was quantified by flow cytometry. (D) WT and Lipa deficient bone marrow-derived macrophages incubated in the presence or absence of 10 μM lalistat were stimulated with apoptotic Jurkat cells for the indicated times. BODIPY staining was quantified by flow cytometry. (E) Control and LIPA-overexpressing THP-1 efferocytes, cultured for 1 hour after the ingestion of [^{3}H]-cholesterol-prelabeled apoptotic Jurkat cells, were fractionated by sucrose step gradient, and fractions were assayed for [^{3}H]-cholesterol incorporation as described in the Methods section. (F) Quantification of [^{3}H]-free cholesterol (FC) and cholesteryl ester (CE) incorporation by thin-layer chromatography (TLC) in high-density membrane (HDM) containing lysosomes, plasma membrane (PM) and endoplasmic reticulum (ER) of control or lalistat-treated THP-1 efferocytes 1 hour after the ingestion of [^{3}H]-cholesterol-prelabeled apoptotic Jurkat cells. (G) Representative images of transmission electron microscopy of control or lalistat-treated THP-1 macrophages (eight to ten different transmission electron microscopy images from individual cells with over four hundred lysosomes were analyzed per condition) showing higher lysosome numbers with similar structures (left panels). Lysosomal membrane structure including 'onion-ring' or 'whorl-shaped' phospholipid-rich lysosomes is shown in control cells (upper right panels) and cholesterol crystal-containing lysosomes is shown in lalistat-treated cells (lower right panel; 1 identified among more than 400 visualized lysosomes) (scale bar, 5 and 1 μm). (H) Control, lalistat-treated and LIPA Ovex THP-1 macrophages were stimulated with BODIPY green-prelabeled apoptotic Jurkat cells for 30 minutes. The cells were counterstained with LysoTracker^R Deep Red (phagolysosome staining) and DAPI (nuclear staining), and representative confocal images (magnification 80x and 160x) are depicted (eight to ten different confocal images were analyzed per condition from experiments performed in triplicate). The data represent the averages ± SEM of at least three independent experiments. *P<0.05 *vs.* controls.

Supplemental Figure II. Defective lysosomal cholesterol hydrolysis does not initiate phagolysosome dysfunction but promotes lysosomal biogenesis after efferocytosis to prevent cell from apoptosis. (A) Representative immunoblots of LC3I/II and phospho-Tfeb from control or LIPA overexpressing (Ovex) THP-1 macrophages incubated for 30 minutes with apoptotic Jurkat cells and cultured for various times. (B) Visualization of the phagolysosome (gray contrast) surrounding p47^{phox} staining after performing 3D reconstruction from confocal Z-stack images of an ingested apoptotic cell. Quantification of p47^{phox} in phagolysosomes 1 hour post-efferocytosis was performed as described in the Methods section with the use of ImageJ software. (C) Confocal analysis of LysoSensor-stained (green) control or lalistat-treated THP-1 macrophages exposed to apoptotic Jurkat cells for 1 hour. Cells were counterstained with DAPI (nuclear staining). The quantification of LysoSensor fluorescence intensity was performed as described in the Methods section with the use of ImageJ software. **(**D) The lysosomal acidification of control, lalistat-treated or LIPA-Ovex THP-1 efferocytes was analyzed by flow cytometry with the fluorescent LysoSensor probe at the indicated time points and was expressed as the mean fluorescence intensity (MFI). (E) Flow cytometry analysis of fluorescent LysoTracker^R Deep Red at the

indicated time points and expressed as the mean fluorescence intensity (MFI) in control, lalistat-treated or LIPA-Ovex efferocytes. (F). The percentage of apoptosis was determined using the Annexin V probe by flow cytometry in THP-1 macrophages after LIPA knockdown (using lentiviral ShRNA particles or siRNA), LIPA inhibition (10 μM lalistat treatment) or LIPA overexpression (Ovex) and exposure to apoptotic cells for 16 hours. The data are given as the mean ± SEM from three independent experiments. *P<0.05 *vs.* controls.

Supplemental Figure III. Defective lysosomal cholesterol hydrolysis activates the NLRP3 inflammasome and promotes Rac1-dependent phagocytic cup disassembly. (A) Cathepsin K secretion levels from control or lalistat-treated THP-1 efferocytes cultured for the indicated times after the ingestion of apoptotic cells were measured and expressed in pmol/L. (B) IL-1β secretion levels (expressed in pg/mL) from control or lalistat-treated murine thyoglycollate-elicited peritoneal macrophages cultured for 16 hours after the ingestion of apoptotic cells. (C) IL-1β secretion levels from control or LIPA overexpressing (Ovex) THP-1 efferocytes cultured for the indicated times after the ingestion of apoptotic cells were measured and expressed in pg/mL. (D) Caspase-1 activity determined by flow cytometry with the FAM-FLICA assay kit in control and lalistat-treated THP-1 efferocytes cultured for 16 hours after the ingestion of apoptotic cells in the presence or absence of 25 nM of the Nlrp3 inflammasome inhibitor (CP-456773). The data are expressed as the mean fluorescence intensity (MFI). (E) IL-1β secretion levels from control and immortalized Nlrp3$^{-/-}$ bone marrow-derived macrophages incubated in the presence or absence of 10 μM lalistat and cultured for an additional 16 hours after the ingestion of apoptotic Jurkat cells. (F) Treatment of control and Nlrp3$^{-/-}$ bone marrow-derived efferocytes in the presence or absence of 10 μM lalistat and cultured for 16 hours. Caspase-1 cleavage was quantified by Western blot. (G) Control and lalistat-treated thyoglycollate-elicited peritoneal macrophages isolated from WT or caspase 1 deficient mice were incubated in the presence or absence of 25 nM Nlrp3 inflammasome inhibitor (CP456773) together with Cell-Tracker Red-prelabeled apoptotic Jurkat cells, and the efferocytic index was quantified by flow cytometry 16 hours later. (H) Representative transmission electron microscopy images of control or lalistat-treated THP-1 efferocytes showing membrane structure (scale bar, 20 μm). (I) THP-1 macrophages incubated in the presence or absence of 10 μM lalistat were stimulated with cell tracker Deep Red-prelabeled apoptotic Jurkat cells for 30 minutes. After an additional culture period, the cells were counterstained with Rac1 (green), F-actin (red) and DAPI (nuclear staining); representative confocal images are depicted (eight to ten different confocal images were analyzed per condition from experiments performed in triplicate). The results are expressed as the mean ± SEM of at least two experiments performed in triplicate. *P<0.05 *vs.* controls.

Supplemental Figure IV. Impaired mitochondrial metabolic repurposing but not lysosomal calcium release is the culprit of the inflammasome activation after LIPA inhibition. (A) Oxygen consumption rate (OCR) recordings of control or lalistat-treated THP-1 macrophages incubated with apoptotic Jurkat cells for the indicated times. The OCR of apoptotic Jurkat cells was also recorded. (B) OCR of control or lalistat-treated thyoglycollate-elicited murine peritoneal macrophages in presence or absence of apoptotic Jurkat cells and in Lipa deficient efferocytes. (C-D) mRNA expression of *Ucp-2* and *Hmox1* in control or lalistat-treated THP-1 efferocytes at the indicated time points. The expression of mRNA was normalized to m36B4 and expressed in arbitrary units (a.u.). (E) Caspase-1 activity determined by flow cytometry with the FAM-FLICA assay kit in control and lalistat-treated THP-1 efferocytes cultured for 3 hours after ingestion of apoptotic cells in the presence or absence of 150 nM of the cell membrane-permeant derivative of nictotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP-AM), 20 μM of the lysosomal Mucolipin TRP channel 1 agonist (ML-SA1) that release calcium from the acidic compartment or 10 μM of 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB), a membrane permeable IP3 receptor modulator that stimulates store-operated calcium release at 10 μM concentration. Data are expressed as mean fluorescence intensity (MFI). (F) IL-1β secretion levels in these cells at the end of the

incubation period. The results are expressed as the mean ± SEM of at least two independent experiments performed in triplicate. *P<0.05 *vs.* controls.

Supplemental Figure V. LIPA favors the generation of 25-OHC during efferocytosis to down-regulate the expression of cholesterol biosynthesis genes and prevent activation of the inflammasome. Effect of LIPA inhibition on (A) sterol precursors (lanosterol, 24-dihydrolanosterol, 7-dehydrocholesterol and desmosterol) and (B) toxic sterols (alpha-triol (cholesterane-3beta,5alpha,6beta-triol), alpha-epox (cholesterol-5alpha, 6alpha-epoxide), 7alpha-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol) determined by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) in THP-1 macrophages 3 hours post-efferocytosis. (B) mRNA expression of oxysterol-producing enzymes in THP-1 macrophages 3 hours post-efferocytosis. (D-E) Transcript levels of endoplasmic cholesterol biosynthesis genes (*Srebf2* and *Hmgcr*) in control or lalistat-treated THP-1 efferocytes at the indicated time points. Quantified transcript levels (normalized to m36B4) are expressed in arbitrary units (a.u.). (F) WT and Lipa deficient murine efferocytes were incubated in the presence or absence of 5 μM 25-hydroxycholesterol (25-OHC) and the efferocytic index was quantified by flow cytometry 16 hours later. (G) LIPA-overexpressing (Ovex) THP-1 macrophages treated with scrambled or *Ch25h* SiRNA were incubated for 30 minutes with apoptotic Jurkat cells, extensively washed, and cultured for an additional 16 hours. Ch25h mRNA expression, normalized to m36B4, was expressed in arbitrary units (a.u.) and IL-1β secretion levels were expressed in pg/mL. The results are expressed as the mean ± SEM of two to five independent experiments performed in triplicate. *P<0.05 *vs.* controls. #P<0.05 treatment effect.

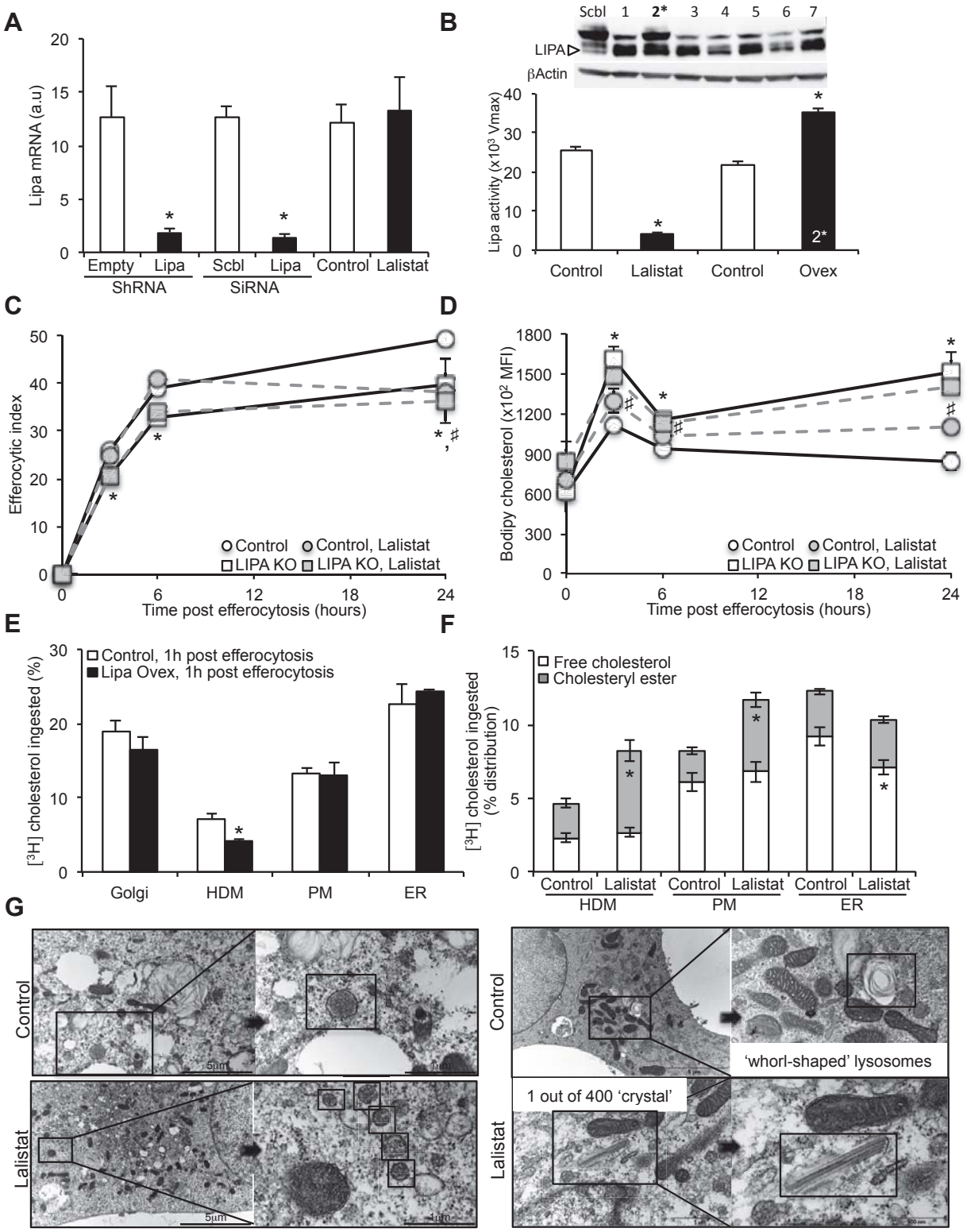
Supplemental Figure VI. LIPA induces liver X receptor (LXR) activation during efferocytosis. (A-B) THP-1 macrophages were incubated for the indicated times in the presence or absence of 10 μM lalistat together with apoptotic Jurkat cells, and the transcript levels of *Abca1* and *Abcg1* (normalized to m36B4) were determined by real-time polymerase chain reaction (PCR; n=3). (C-D) THP-1 macrophages were incubated for 30 minutes in the presence or absence of 10 μM lalistat together with [^{3}H]-cholesterol-prelabeled apoptotic Jurkat cells. Then, apoA-I or polyethylene glycol (PEG)-HDL was added as an acceptor and incubated for 6 or 24 hours before the media and cells were collected for isotopic cholesterol efflux analysis. (E) Control and LIPA Ovex THP-1 macrophages were incubated in the presence or absence of apoptotic Jurkat cells for 30 minutes, extensively washed, and cultured for an additional 24 hours. At the end of the incubation, *Abca1*, *Abcg1* and *MertK* transcript levels (normalized to m36B4) were quantified and expressed in arbitrary units (a.u). (F) Control and LIPA Ovex THP-1 macrophages were incubated for 30 minutes with [^{3}H]-cholesterol-prelabeled apoptotic Jurkat cells. After an equilibration period, polyethylene glycol (PEG)-HDL was added as an acceptor and incubated for 6 or 24 hours before the media and cells were collected for isotopic cholesterol efflux analysis. (G) mRNA expression of LXR target genes (*Abca1* and *Abcg1*) in control or lalistat-treated THP-1 macrophages 24 hours after efferocytosis in the presence or absence of 3 μM LXR agonist (TO901317). The expression of mRNA was normalized to m36B4 and expressed in arbitrary units (a.u). (H) THP-1 macrophages were incubated for 30 minutes in the presence or absence of 10 μM lalistat or 3 μM LXR agonist (TO901317) together with [^{3}H]-cholesterol-prelabeled apoptotic Jurkat cells. Then, polyethylene glycol (PEG)-HDL was added as an acceptor and incubated for 24 hours before the media and cells were collected for isotopic cholesterol efflux analysis. The data are given as the mean ± SEM from three independent experiments. *P<0.05 *vs.* controls. #P<0.05 treatment effect.

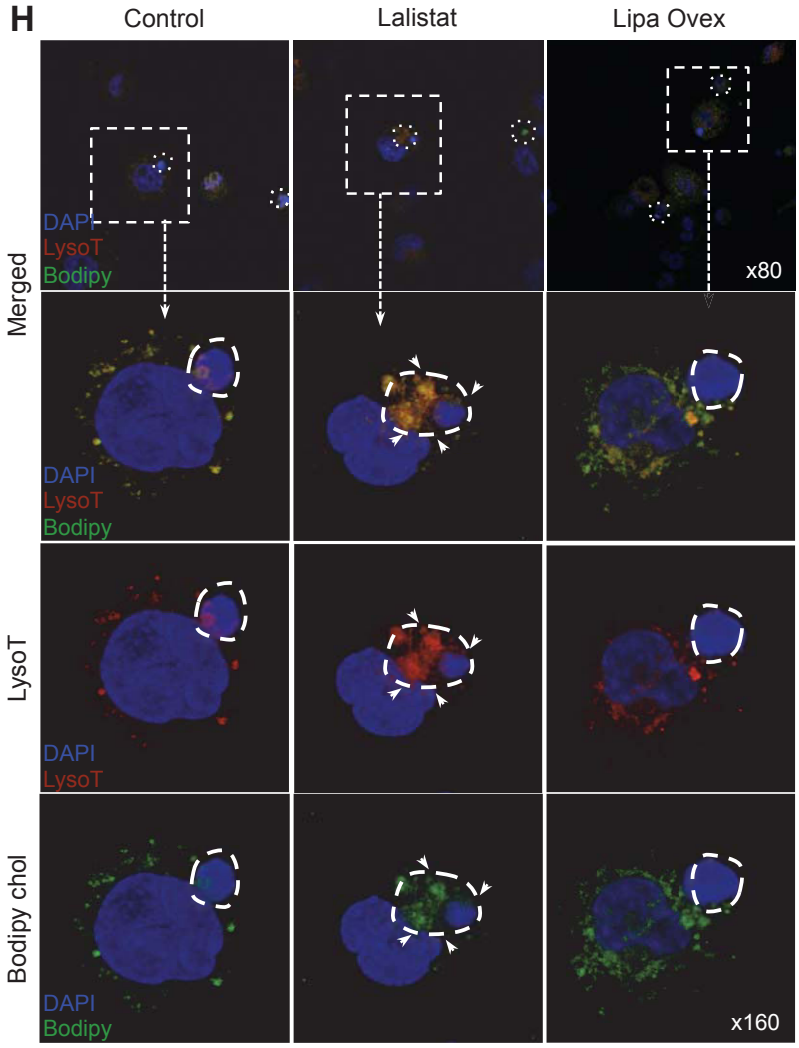
Supplemental Figure VII. Targeted gene expression profiling of LIPA and related lysosomal and efferocytic functions in tissue-resident immune cells and effects of LIPA inhibition on the efferocytosis of stressed erythrocytes and apoptotic lymphocytes. (A) Heat map of LIPA, lysosomal and efferocytic functions, LXR target genes,

heme/iron metabolism and inflammasome markers in various hematopoietic, lymphoid and myeloid cell populations generated from a publicly available Immgen dataset. (B) Representative dot plots showing the uptake of CellTracker^{+} stressed erythrocytes (sRBCs, red) or apoptotic lymphocytes (UV-T, green) in the liver (top) and spleen (bottom) 16 hours after *i.v.* injection. (C-D) Quantification of the percentage of efferocytic cells of each cell type in the liver (myeloid, T-mac and KC) or the spleen (myeloid and RPM). The results are expressed as the mean ± SEM of 4 to 6 animals per group. *P<0.05 *vs.* saline-injected control mice.

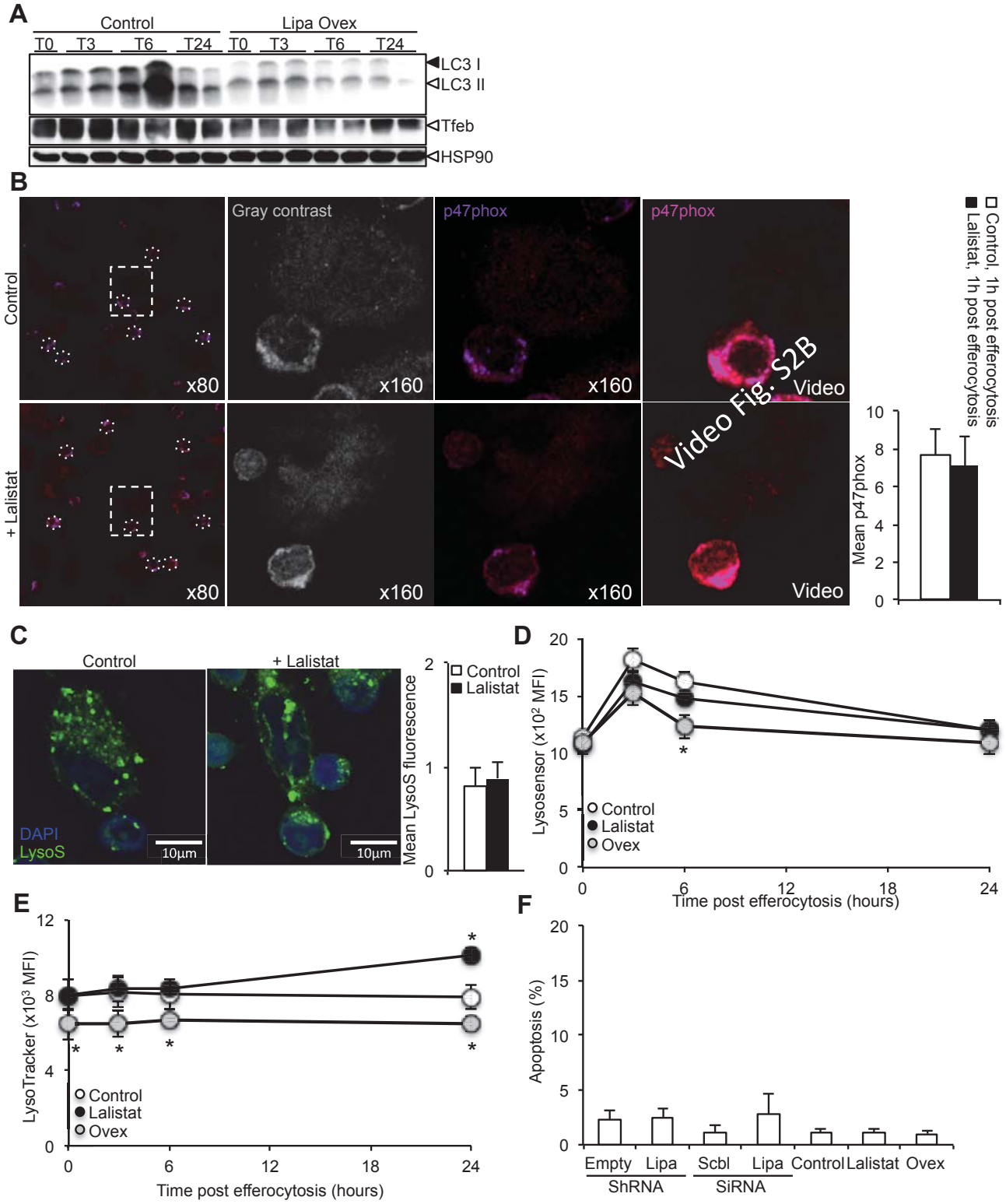
Supplemental Figure VIII. Inhibition of lysosomal lipid hydrolysis promotes pathogenic tissue-resident macrophage expansion and lysosomal dysfunction. (A) Representative dot plots of tissue-resident macrophages (F4/80^{+}CD64^{+} splenic RPMs, liver KCs and adipose tissue ATMs and F4/80^{+}CD115^{+} peritoneal PCMs) by flow cytometry from 12-week high-fat-fed WT or *Ldlr*$^{-/-}$ mice treated for the last 2 weeks with subcutaneous injections of either saline or 20 mg/kg lalistat every two days. (B) Quantification of tissue-resident macrophages expressed as a percentage of whole tissue. (C) Representative histograms and quantification of CD206 cell surface expression in splenic RPMs by flow cytometry and expressed as the mean fluorescence intensity (MFI). (D) Lysosomal content and acidification in tissue-resident macrophages quantified by flow cytometry using LysoTracker^{R} Deep Red and LysoSensor Green, respectively, and expressed as the mean fluorescence intensity (MFI). The results expressed as are the mean ± SEM from 4 to 6 animals per group. *P<0.05 *vs.* saline injected *Ldlr*$^{-/-}$ mice.

Supplemental Figure I.

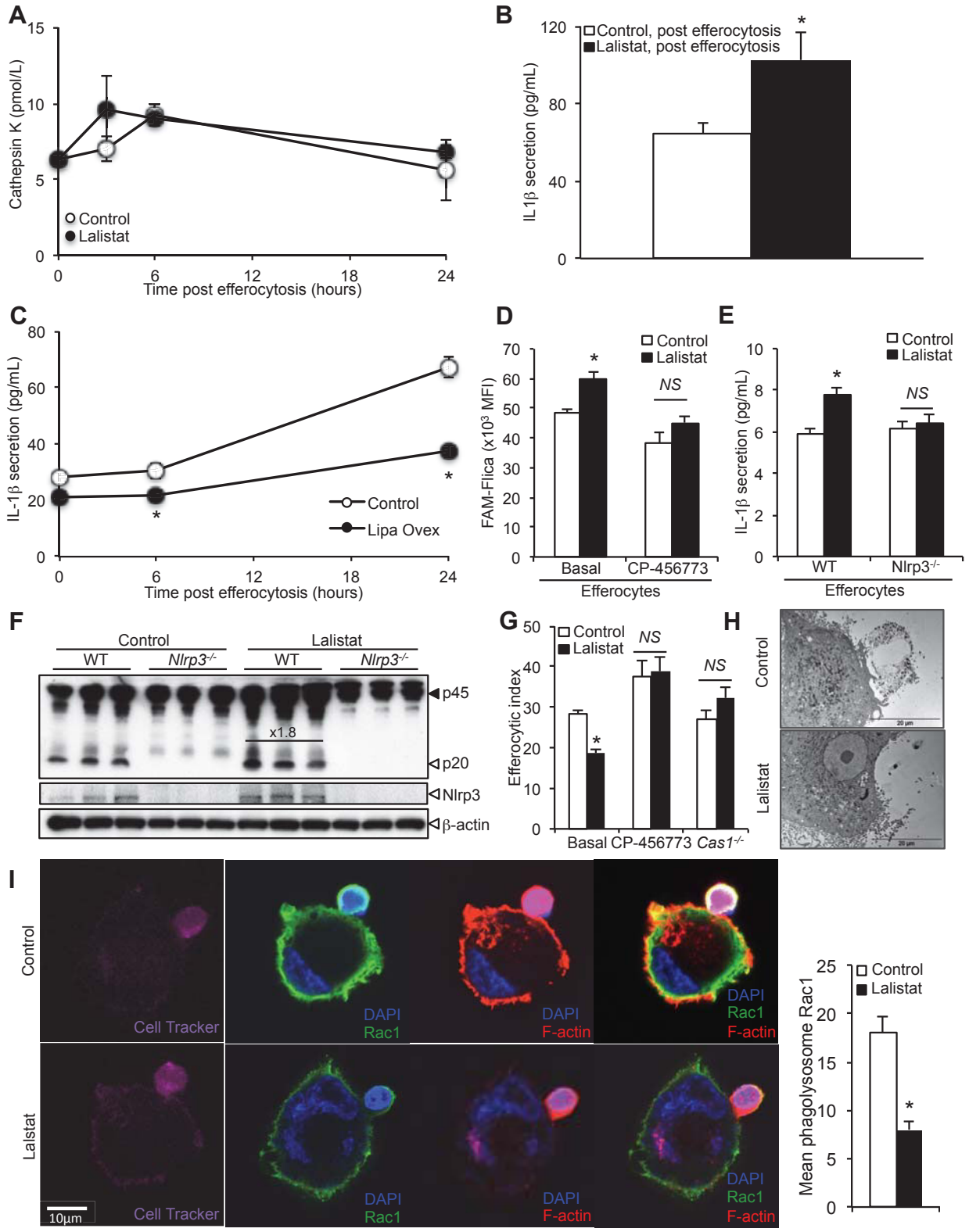



H
Control
Lalistat
Lipa Ovex
Merged
LysoT
Bodipy chol
DAPI
LysoT
Bodipy
x80
x160

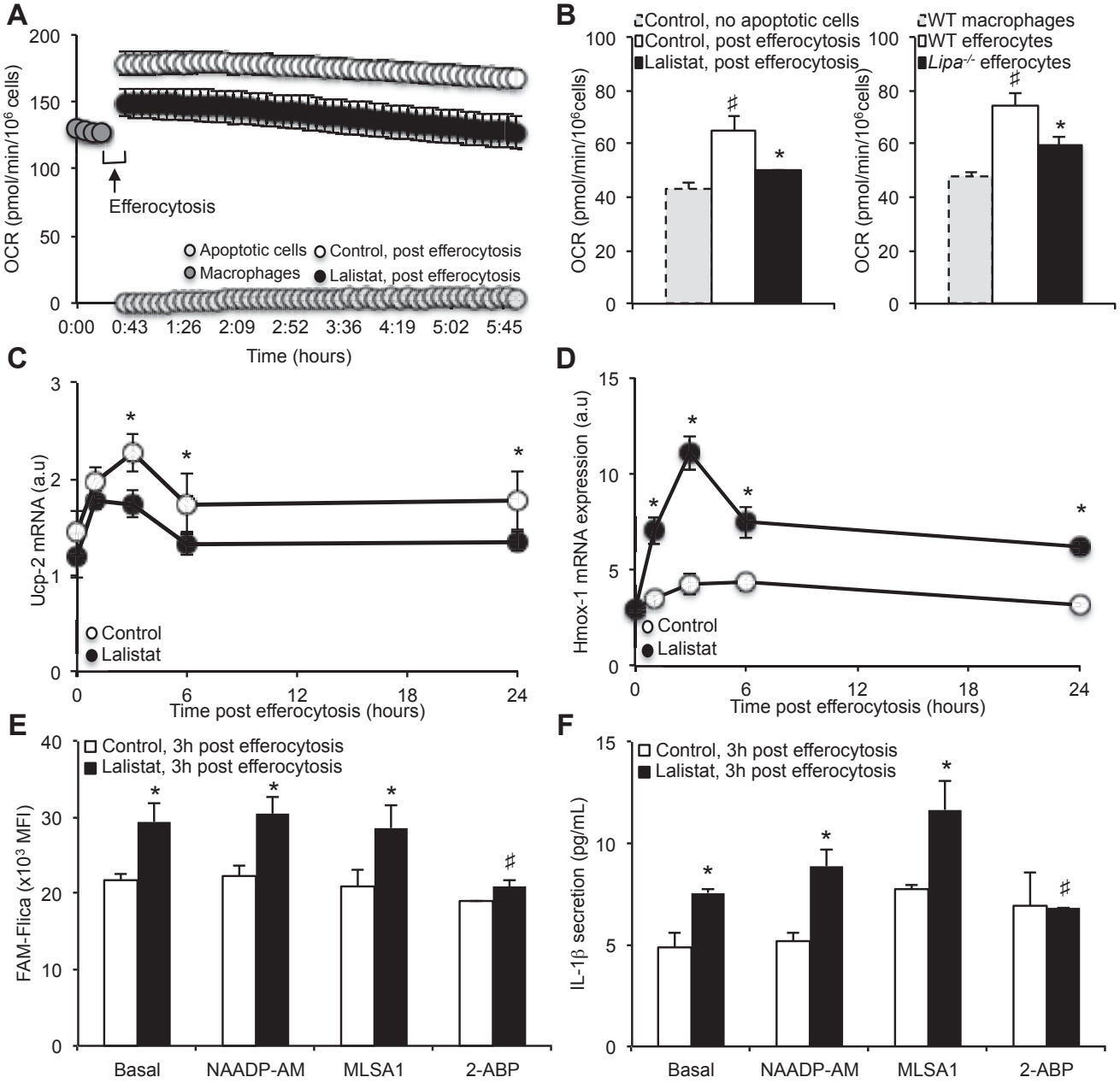
Supplemental Figure II.



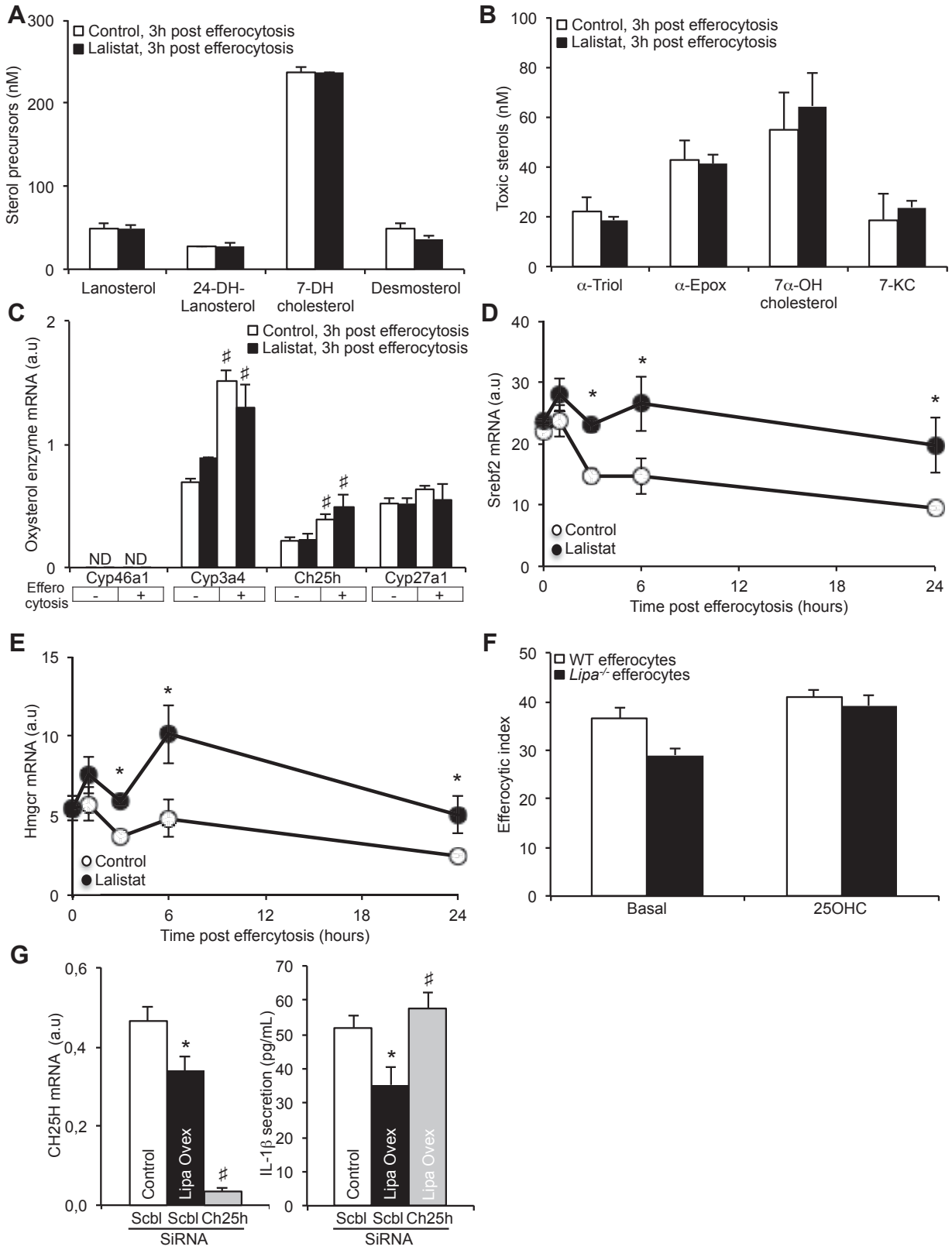
Supplemental Figure III.



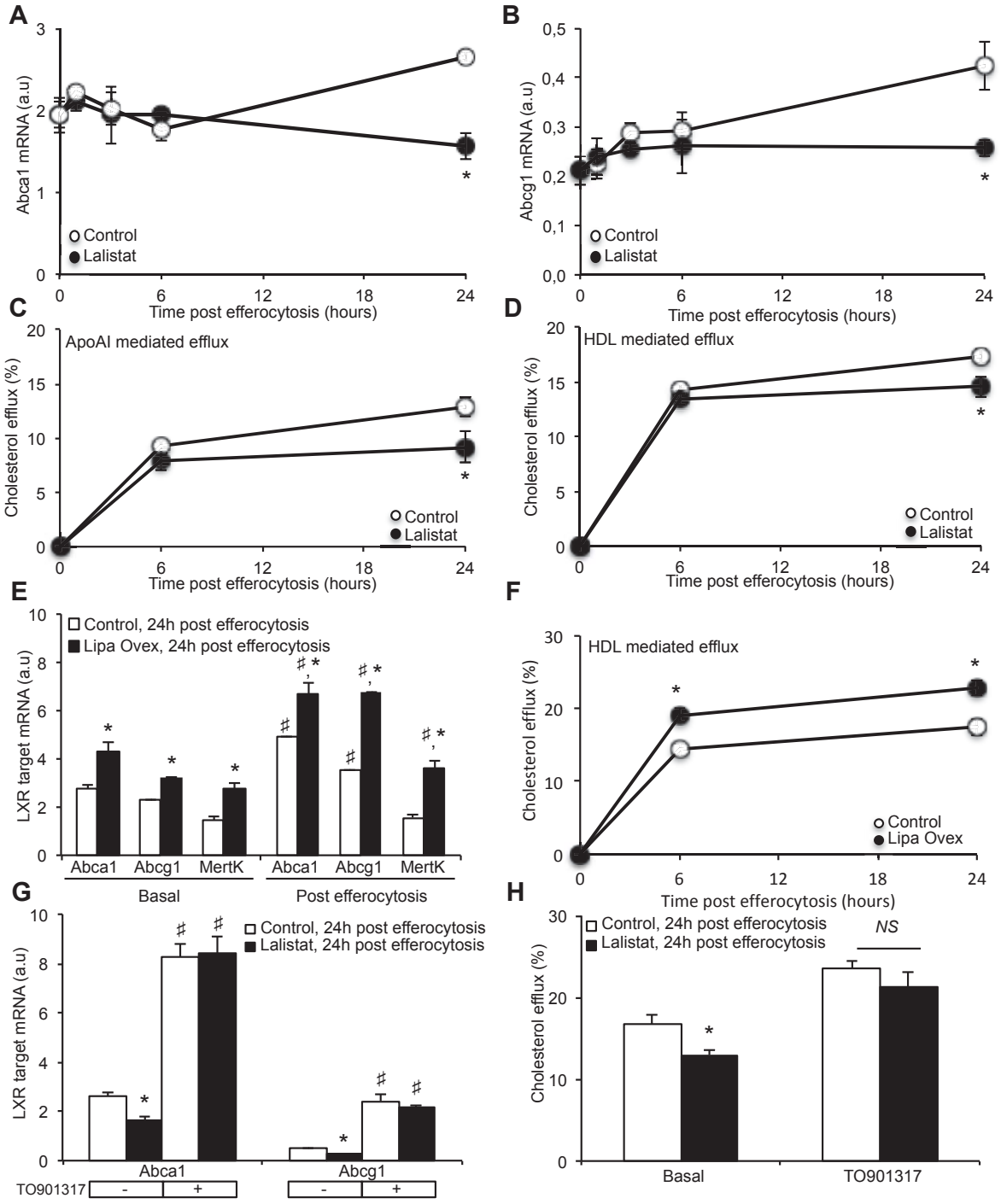
Supplemental Figure IV.



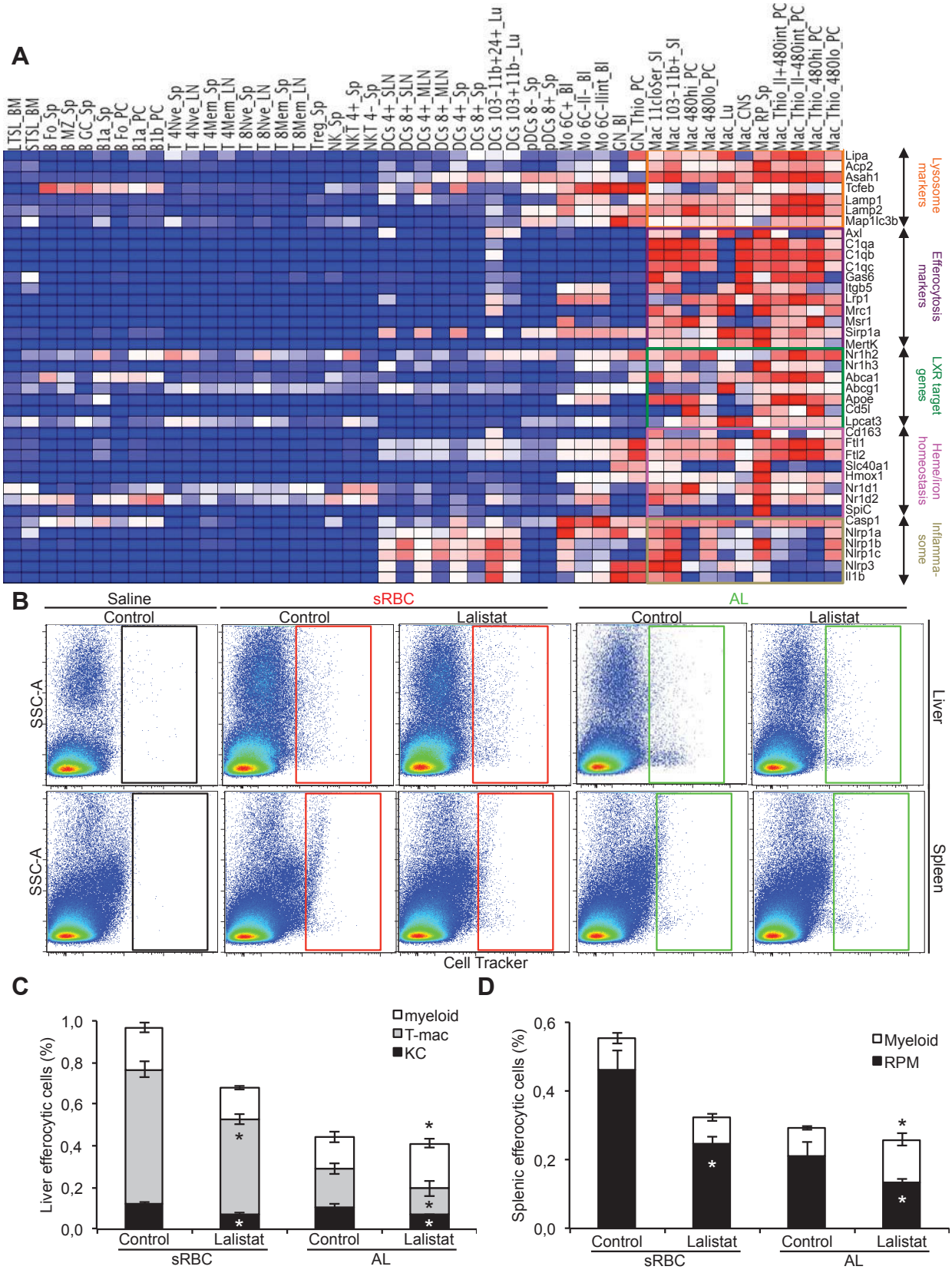
Supplemental Figure V.



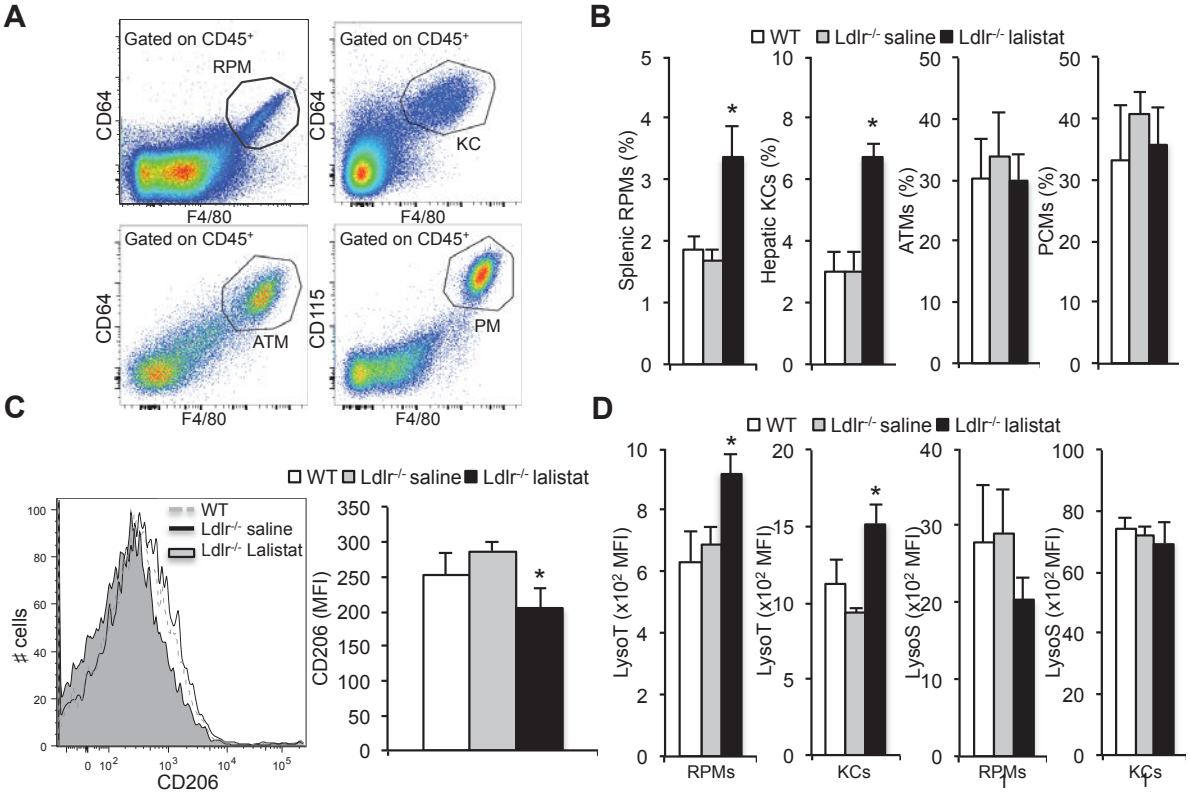
Supplemental Figure VI.



Supplemental Figure VII.



Supplemental Figure VIII.



*** Long In Vivo Checklist**

Circulation Research - Preclinical Animal Testing: A detailed checklist has been developed as a prerequisite for every publication involving preclinical studies in animal models. ***Checklist items must be clearly presented in the manuscript, and if an item is not adhered to, an explanation should be provided.*** *If this information (checklist items and/or explanations) cannot be included in the main manuscript because of space limitations, please include it in an online supplement. If the manuscript is accepted, this checklist will be published as an online supplement. See the explanatory editorial for further information.*

This study involves use of animal models:
Yes

Study Design

The experimental group(s) have been clearly defined in the article, including number of animals in each experimental arm of the study.	Yes
An overall study timeline is provided.	Yes
The protocol was prospectively written	Yes
The primary and secondary endpoints are specified	Yes
For primary endpoints, a description is provided as to how the type I error multiplicity issue was addressed (e.g., correction for multiple comparisons was or was not used and why). (Note: correction for multiple comparisons is not necessary if the study was exploratory or hypothesis-generating in nature).	Yes
A description of the control group is provided including whether it matched the treated groups.	Yes

Inclusion and Exclusion criteria

Inclusion and exclusion criteria for enrollment into the study were defined and are reported in the manuscript.	N/A
These criteria were set *a priori* (before commencing the study).	N/A

Randomization

Animals were randomly assigned to the experimental groups. If random assignment was not used, adequate explanation has been provided.	Yes
Type and methods of randomization have been described.	Yes
Allocation concealment was used.	N/A
Methods used for allocation concealment have been reported.	N/A

Blinding

Blinding procedures with regard to masking of group/treatment assignment from the experimenter were used and are described. The rationale for nonblinding of the experimenter has been provided, if such was not performed.	Yes
Blinding procedures with regard to masking of group assignment during outcome assessment were used and are described.	Yes
If blinding was not performed, the rationale for nonblinding of the person(s) analyzing outcome has been provided.	N/A

Sample size and power calculations

Formal sample size and power calculations were conducted before commencing the study based on *a priori* determined outcome(s) and treatment effect(s), and the data are reported.	Yes
If formal sample size and power calculation was not conducted, a rationale has been provided.	N/A

Data Reporting

Baseline characteristics (species, sex, age, strain, chow, bedding, and source) of animals are reported.	Yes
The number of animals in each group that were randomized, tested, and excluded and that died is reported. If the experimentation involves repeated measurements, the number of animals assessed at each time point is provided is provided for all experimental groups.	Yes
Baseline data on assessed outcome(s) for all experimental groups are reported.	N/A
Details on important adverse events and death of animals during the course of the experiment are reported for all experimental groups.	N/A
Numeric data on outcomes are provided in the text or in a tabular format in the main article or as supplementary tables, in addition to the figures.	Yes
To the extent possible, data are reported as dot plots as opposed to bar graphs, especially for small sample size groups.	N/A
In the online Supplemental Material, methods are described in sufficient detail to enable full replication of the study.	Yes

Statistical methods

The statistical methods used for each data set are described.	Yes
For each statistical test, the effect size with its standard error and *P* value is presented. Authors are encouraged to provide 95% confidence intervals for important comparisons.	Yes
Central tendency and dispersion of the data are examined, particularly for small data sets.	N/A
Nonparametric tests are used for data that are not normally distributed.	Yes
Two-sided *P* values are used.	N/A
In studies that are not exploratory or hypothesis-generating in nature, corrections for multiple hypotheses testing and multiple comparisons are performed.	Yes
In "negative" studies or null findings, the probability of a type II error is reported.	N/A

Experimental details, ethics, and funding statements

Details on experimentation including formulation and dosage of therapeutic agent, site and route of administration, use of anesthesia and analgesia, temperature control during experimentation, and postprocedural monitoring are described.	Yes
Both male and female animals have been used. If not, the reason/justification is provided.	Yes
Statements on approval by ethics boards and ethical conduct of studies are provided.	Yes
Statements on funding and conflicts of interests are provided.	Yes

---

Date completed: 03/05/2018 13:28:32
User pid: 134917

Projet 3

Caractérisation de nouvelles mutations somatiques du gène ABCA1 dans la leucémie myélomonocytaire chronique :
lien entre le métabolisme du cholestérol et la production de cellules myéloïdes.

RESULTATS PRELIMINAIRES

INTRODUCTION

Les cancers du sang et de la moelle osseuse, ou leucémies, sont encore aujourd'hui un enjeu de santé publique. En effet les cancers du sang représentent environ 10% des cancers en France en 2012. Malgré la découverte de nouveaux traitement comme l'imatinib et les inhibiteurs de tyrosine kinase qui ont révolutionné le traitement de la leucémie myéloïde chronique induite par la recombinaison chromosomique BCR-ABL. Cependant, de nouvelles thérapies sont nécessaires pour combattre l'ensemble des troubles myéloprolifératifs. Les troubles myéloprolifératifs regroupent un large nombre de pathologies comme la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC).

a- Définition de la leucémie myélomonocytaire (LMMC)

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est définie comme une maladie clonale de la cellule souche hématopoiétique. Selon l'organisation mondiale de la santé, ce cancer du sang ou hémopathie est caractérisé par plusieurs critères. Le premier est une monocytose périphérique, soit une accumulation de monocytes dans le sang, durant plus de 3 mois (>$1x10^9$ monocytes/L). Deuxièmement, les monocytes ne doivent pas être porteurs du chromosome de Philadelphie, issu du réarrangement chromosomique permettant l'expression du gène de fusion *bcr-abl* (Pickeral et al., 2000) (Rampal et al., 2014). Troisièmement, ils ne doivent pas exprimer le gène de réarrangement *pdgfrb*. Quatrièmement, les patients sont atteints d'une blastocytose sanguine et médullaire, cela se caractérise par une accumulation de cellules indifférenciées dans ces compartiments (<20% de blastes). Cinquièmement, les patients sont aussi atteints d'une dysplasie qui touche au moins une des populations cellulaires de la lignée myéloïde. Le quatrième critère permet aussi de sous-classer les patients. Pour ceux qui présentent un pourcentage de blastes sanguins inférieur à 5% et un pourcentage de blastes médullaires inférieur 10%, ils sont atteints de la LMMC de type 1. De même, pour ceux qui présentent un pourcentage de

blastes sanguins et/ou médullaires supérieur à 10% mais inférieur à 20%, ils sont atteints de la LMMC de type 2.

La LMMC est une maladie rare, donc l'incidence est de 1 à 5 nouveaux cas pour 100000 habitants par an. Elle touche essentiellement les sujets de plus de 60 ans, et présente une médiane de survie entre 20 et 40 mois. La LMMC atteint préférentiellement l'homme (avec un sex ratio de 2 hommes pour 1 femme). Dans 15 à 20% des cas, la pathologie se transforme en leucémie aigue myéloïde (LAM). Bien que la classification des syndromes myéloprolifératifs et myélodysplasiques soit complexe et évolutive, la LMMC est classée dans les deux catégories et elle représente 10% de ces syndromes (Patnaik and Tefferi, 2016). En effet, la LMMC présente à la fois les critères d'un syndrome myélodysplasique puisque une ou plusieurs lignées myéloïdes sont affectées. Elle fait aussi partie des syndromes myéloproliferatifs puisqu'une accumulation de monocytes dans le sang est observée. Le plus souvent, ce sont les monocytes classiques qui sont augmentés à défaut des monocytes non-classiques (Selimoglu-Buet et al., 2015).

b- La physiopathologie de la LMMC

Bien que la caractérisation clinique de la LMMC permette un diagnostic solide, l'origine de cette maladie reste encore mal connue. De part l'étude de cellules issues de patients atteints de la LMMC, certaines anomalies ont pu être mises en cause.

b-1- Les anomalies cytogénétiques

Les anomalies chromosomiques sont souvent présentes chez les patients atteints de LMMC (Itzykson et al., 2017). En effet, 20 à 40% des patients présentent des anomalies cytogénétiques, ils présentent notamment la trisomie 8, la délétion 5q, la trisomie 10, la délétion 11q et 12q, les trisomies 19 et 21, ainsi que des aberrations du chromosome 7 et des caryotypes complexes mais ces anomalies ne semblent pas spécifiques de la LMMC (Such et al., 2011). En revanche, ces anomalies permettent une classification des patients en trois catégories. Les patients à haut risque sont ceux présentant une trisomie 8 et/ou des anomalies du chromosome 7 et/ou un caryotype complexe. Les patients qui ne présentent pas ces trois critères mais qui possèdent des anomalies du caryotype sont classés dans la catégorie du risque intermédiaire. Enfin, les patients présentant un caryotype normal ou une perte du chromosome Y sont des patients à faible risque. Les pourcentages de survie de ces patients à 5 ans sont respectivement de 4%, 26% et 35%.

b-2- Les anomalies cytogénétiques

Les mutations génétiques sont très fréquentes chez les patients atteints de LMMC. En effet, près de 90% des patients atteints de LMMC sont porteurs de mutations génétiques. Ces mutations peuvent être classées en 4 catégories : celles qui touchent les gènes de la méthylation de l'ADN, celles qui touchent les gènes de la modification des histones, celles qui touchent les gènes de l'épissage et celles qui touchent la voie de signalisation du GM-CSF (Itzykson et al., 2017).

- Les mutation des gènes régulant la méthylation de l'ADN

Les mutations de ces gènes impliquent une dérégulation épigénétique. Dans cette catégorie, le gène *tet2* (Ten-Eleven Translocation 2) est le gène le plus fréquemment muté. En effet, il est muté chez plus de la moitié des patients. Le gène *tet2* code pour une dioxygénase qui catalyse la conversion de la 5-méthylcytosine (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (h5mC). L'activité enzymatique de Tet2 est dépendante du 2-OG et du fer ferreux (FeII). L'hydroxylation de la 5mC est une étape clé de la déméthylation de l'ADN. Ainsi, les mutations perte de fonction de ce gène induit une protéine non-fonctionnelle. Cela se traduit pas une augmentation de la forme 5mC et donc une hyperméthylation de l'ADN (Ko et al., 2010). Cependant, les conséquences des mutations Tet2 restent controversées. En effet, les patients porteurs de mutations pour le gène *tet2* présentent soit une hypométhylation soit une hyperméthylation (Pérez et al., 2012). Cependant, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, la perte de fonction de *tet2* provoque un auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques (CSH), ce qui provoque une expansion des cellules différenciées qui en découlent et notamment les cellules de la lignée myéloïde (Moran-Crusio et al., 2011) (Quivoron et al., 2011). En effet, il est démontré que *tet2* est très exprimé dans les tissus hématopoïétiques. Son expression commence dans le compartiment « progéniteurs » (cellules CD34+) et elle augmente au cours de la différenciation myéloïde pour être maximale dans les cellules granulocytaires et monocytaires (Itzykson and Fenaux, 2012). Ces résultats mettent en évidence le rôle déterminant des mutations *tet2* dans l'émergence d'un clone leucémique, élément clé dans l'initiation de la pathogénèse de la LMMC (Itzykson et al., 2017).

Les 2-OG nécessaires à l'activité de Tet2 sont générés grâces aux isocitrate déshydrogénases (IDH1 à IDH3), qui catalysent la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en 2-OG. La mutation de l'enzyme IDH2 est présente dans 8 à 10% des patients atteints de

LMMC. Cela a pour conséquence d'inhiber de nombreuses enzymes dépendantes du 2-OG, donc l'activité Tet2. Cela explique en partie la diminution du taux de 5hmC chez des patients non mutés pour Tet2 (Figueroa et al., 2010). Les mutations des IDH affectent aussi l'activité enzymatique des PHD, ce qui aboutit à l'accumulation de HIF-1α et permet une croissance tumorale efficace même dans des conditions hypoxiques.

Enfin, des mutations de la DNMT3A (DNA Méthyl Transférase 3) sont peu fréquentes dans la LMMC, environ 10% (Jankowska et al., 2011). Ces mutations touchent la méthylation du génome. En effet, les ADN méthyltransférases permettent d'addition d'un groupement méthyl sur les résidus cytosines, en particulier celles présentes dans les îlots CpG situés en amont des gènes, ce qui induit une diminution de l'expression de ces gènes.

- Les mutations des gènes modificateurs des histones

Le complexe répresseur PRC2 (Polycomb repressive complex 2) est un complexe protéique associant les protéines EZH1 et EZH2 à un grand nombre d'autres protéines. Ce complexe catalyse la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3). La H3K27me3 est un marquage de la chromatine qui réprime la transcription. Le complexe PRC2 régule l'autorenouvellement des CSH et la réponse des cellules cancéreuses aux dommages à l'ADN. Dans ce complexe, ce sont les gènes *ezh2* et *utx* qui sont les plus mutés dans la LMMC (Score et al., 2012).

La protéine EZH2 ayant une activité méthyltransférase au sein du complexe PRC2. Des mutations inhibitrices du gène *Ezh2* ont été mises en évidence dans les cancers myéloïdes. En effet, dans la LMMC, le gène *Ezh2* est muté dans 5 à 10% des cas et un marqueur de mauvais pronostic (Jankowska et al., 2011).

Les mutations inactivatrices affectant la protéine UTX qui catalyse la déméthylation de H3K27me3 sont aussi retrouvées dans environ 10% des cas et seraient de mauvais pronostic (Jankowska et al., 2011). Cette observation paradoxale suggère tout de même que la dérégulation du niveau de méthylation de l'ADN, quel que soit le sens de la dérégulation, est oncogénique.

Les mutations qui affectent *asxl1* (additional sex combs-like protein 1) sont fréquentes puisqu'elles sont présentes chez 40% des patients atteints de LMMC. Ce gène appartient à la famille des gènes *etp* (Enhancer of trithorax and polycomb). Chez l'Homme, il

existe trois gènes *asxl*, de 1 à 3, qui possèdent un domaine PDH qui permet l'interaction avec la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4). AXL1 a plusieurs fonctions, notamment la régulation transcriptionnelle de p53 et le recrutement de PRC2 au niveau de ses gènes cibles.

- Les mutations des gènes de la machinerie d'épissage

Les mutations affectant la machinerie de l'épissage des ARNm sont très fréquemment retrouvées chez les patients atteints de LMMC. Le gène le plus fréquemment muté est le gène *srsf2* (serine/arginine-rich splicing factor 2), dans environ 50% des cas (Yoshida et al., 2011). Les conséquences de ces mutations ne sont pas bien connues mais il semblerait que cela affecte la stabilité génomique. De manière intéressante, les mutations de *srsf2* sont souvent retrouvées en même temps que des mutations de *tet2*.

Moins fréquemment (mois de 10% des patients), des mutations des gènes *zrsr2*, *u2af1* ou *sf3b1* qui sont également impliquées dans l'épissage alternatif sont retrouvées. Tous ces gènes codent pour des protéines impliquées dans la reconnaissance du site 3' lors de la maturation des ARNm.

Une dysfonction de la machine d'épissage conduit à une instabilité génétique ainsi qu'à une dérégulation de l'épigénétique. Cependant, à l'heure actuelle, les conséquences de ces mutations ne sont pas connues (Alexander and Beggs, 2010).

- Les mutations des facteurs de transcription

Le facteur de transcription RUNX1 (Runt-related transcription factor 1) est considéré comme un suppresseur de tumeur dont les mutations peuvent induire une cancérisation des cellules. Dans la LMMC, les mutations de RUNX1 sont retrouvées dans 10 à 30% des cas (Kohlmann et al., 2010). Ce facteur de transcription joue un rôle essentiel dans l'hématopoïèse normale. En effet, il active PU1 qui permet la différenciation erythrocytaire, granulocytaire mais aussi la différenciation monocytaire. Les mutations sont souvent non sens ou faux sens, et touchent préférentiellement la partie C-terminale de la protéine et elles sont associées à une thrombocytopénie et sont marqueurs de mauvais pronostic.

Les mutations du gène *npm1* (nucleophosmine B23 numatrine) code pour une protéine impliquée dans la synthèse des ribosomes. Lieu où la régulation de la transcription peut avoir lieu mais ces mutations sont extrêmement rare (moins de 5%) dans LMMC.

- Les mutations affectant la signalisation intracellulaire

Les gènes codant pour des facteurs de transcription ou pour des protéines nécessaires à l'épissage alternatif ne sont pas les seuls gènes mutés dans la LMMC. En effet, des protéines impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire peuvent être aussi mutées.

- les mutations de la protéine Ras.

Les mutations du gène *ras* (Rous Avian Sarcoma) sont longtemps restées les seules mutations connues dans la LMMC et sont les mutations les plus fréquentes qui affectent la signalisation cellulaire. Les protéines Ras, comme NRas, KRas ou HRas sont des petites protéines G, actives lorsqu'elles sont liées au GTP. Elles régulent la prolifération et la différenciation cellulaire via l'activation de la voie des MAPKinases. Les mutations oncogéniques de *ras* conduisent au blocage des protéines Ras dans leur conformation active et activent de façon constitutive les voies de signalisation MEK/MAPK, PI3K/AKT et STAT5. Les mutations *nras* et *kras* sont chacune présentes chez 10% des patients et sont à l'origine de l'hyperleucocytose (Kohlmann et al., 2010).

Les mutations *ras* sont associées à une monocytose accrue et à un mauvais pronostic. Il est important de souligner que les mutations KRas apportent un avantage compétitif majeur lorsqu'elles touchent les CSH. Les CSH présentant des mutations de Ras sont hypersensibles au GM-CSF et à l'IL-3 et présentent une activation constitutive des voies ERK et STAT5.

Les mutations *ras* sont fréquentes et sont mutuellement exclusives. D'autres mutations des voies de signalisation peuvent avoir lieu comme celle de CBL, JAK2 et FLT3, qui peuvent être associées à des mutations *ras*.

- les mutations de la protéine CBL.

Le gène *cbl* (Casistas B-lineage lymphoma) code pour trois protéines homologues (c-CBL, CBL-b et CBL-c) qui possèdent une activité ubiquitine ligase. L'expression de ces protéines diffère selon les tissus. Dans les CSH, l'expression de CBL est très forte où elle joue un rôle dans l'auto-renouvellement des précurseurs. L'expression de CBL-b augmente au cours de la différenciation myéloïde (Rathinam et al., 2010). Ces protéines possèdent un domaine N-terminal de liaison aux tyrosines kinases, un domaine linker et un domaine RING, qui porte l'activité ubiquitine ligase. Après la liaison à un récepteur tyrosine kinase activé tels que c-Kit, FLT3, MCSF-R, TCR ou BCR, la protéine CBL permet le recrutement des

molécules de signalisation puis permet l'endocytose du récepteur afin qu'il soit dégradé. De façon pertinente, de part son activité ubiquitine ligase, CBL permet la dégradation des kinases SFK, JAK2 et STAT5, ce qui permet l'inhibition de la voie JAK/STAT. Ainsi, *cbl* joue un rôle suppresseur de tumeur. Les mutations de *cbl* sont retrouvées chez 5 à 20% des patients et ont pour conséquence une perte de l'activité de CBL, ce qui réduit la dégradation des molécules de signalisation. Ainsi, les voies de signalisation restent actives, ce qui provoque une hypersensibilité aux cytokines telles que le GM-CSF (Naramura et al., 2010).

- La mutation V617F de la protéine JAK2.

La mutation V617F de la protéine JAK2 (Janus Kinase 2) est une mutation fréquente dans les syndromes myélodysplasiques. Elle est retrouvée chez 10% des patients atteints de LMMC (Levine et al., 2005). Brièvement, cette mutation augmente l'activité de la kinase ce qui induit une hypersensibilité aux cytokines telles que la thrombopoïétine, le G-CSF et conduit à une surractivation des voies STAT5 et PI3K.

- Les mutations FLT3.

Ces mutations sont connues pour être impliquées dans d'autres leucémies que la LMMC, notamment la leucémie aigue myéloïde. Dans la LMMC, elles sont retrouvées dans seulement 3% des cas (Lee et al., 2007). Le plus souvent la mutation retrouvée est une duplication en tandem du domaine juxtamembranaire de la protéine (FLT3-ITD).

Pour conclure cette partie, nous venons de voir que la production de monocytes pouvait être augmentée dans d'autres circonstances que lors d'une inflammation chronique comme c'est le cas dans l'athérosclérose. Dans ce contexte, le gène *tet2* est un acteur clé dans la régulation de la production monocytaire lors d'une hématopoïèse normale ou altérée comme dans le cadre de la LMMC.

b- LMMC et le métabolisme du cholestérol

De manière intéressante, l'homéostasie du cholestérol est modifiée chez des patients atteints de cancers du sang. En effet, une baisse du taux de HDL sanguins est observée chez ces patients qui n'est pas entièrement expliquée par la malnutrition (Fiorenza et al., 2000). Il semble aussi que la baisse de l'HDL-cholestérol suive la progression de la pathologie. Comme nous l'avons aussi décrit dans l'introduction, la fonction majeure et cruciale des HDL est de maintenir l'homéostasie cellulaire en cholestérol en enlevant l'excès de cholestérol cellulaire vers le foie pour qu'il y soit éliminé (fonction aussi appelée retour inverse du cholestérol). Malgré des changements importants des niveaux de cholestérol

chez ces patients, aucune évidence génétique n'a été mise en lumière (Fiorenza et al., 2000) (Zyada et al., 1990) (Dessì et al., 1995).

Le retour inverse du cholestérol est dépendant de nombreux acteurs comme les transporteurs ABCA1 et ABCG1 ou l'apolipoprotéine A1. La cancérisation des cellules est dépendante d'une grande coopération entre différents processus cellulaires. Dans ce cadre, il est important de noter que les gènes de l'homéostasie du cholestérol, comme celui du transporteur ABCA1, sont des cibles régulées lors de la cancérisation des cellules (McMurray et al., 2008). De manière intéressante, les voies de signalisation des tyrosine kinases sont induites par les facteurs de croissance hématopoïétiques et la mutation oncogénique Flt3-ITD est directement liée à une baisse de l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1 (Yvan-Charvet et al., 2010) (Westerterp et al., 2012).

Dans un cadre plus large, des mutations du gène *abca1* ont été identifiées dans COSMIC (Catalog of Somatic Mutations In Cancer) et deux mutations, A140T et A2109T, potentiellement mutations perte de fonction, ont été mises en évidence dans un modèle de cancer colorectal (Smith and Land, 2012). Cependant, des études mécanistiques dans un modèle murin présentant une déficience totale en ABCA1 et ABCG1 ne mettent pas en évidence l'apparition d'un cancer colorectal (Yvan-Charvet et al., 2010). Au contraire, dans un modèle murin présentant une déficience totale du transporteur ABCA1 et ABCG1 spécifiquement dans la moelle osseuse, il est mis en évidence que les souris présentent une expansion et une prolifération massive des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs cellulaires, une monocytose et une leucocytose, ainsi qu'une infiltration de cellules myéloïdes dans divers organes, présentant ainsi un phénotype proche de la leucémie myélomonocytaire chronique humaine.

HYPOTHESES DE TRAVAIL

L'hypothèse centrale de ce projet est que les patients atteints de LMMC pourraient être porteurs de mutations du transporteur ABCA1 induisant la perte de fonction du transporteur, en affectant sa capacité d'efflux du cholestérol et/ou son activité anti-tumorale. Le principal objectif de ce projet est de tester la relevance fonctionnelle des nouvelles mutations identifiées du transporteur ABCA1 dans un contexte de LMMC. Pour cela, nous avons mis en place plusieurs modèles aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. *In vivo*, nous avons essayé de répondre à deux questions différentes. La première était de savoir si les mutations ABCA1 étaient nécessaires et suffisantes au développement d'une LMMC (modèle one-hit). Pour cela nous avons étudier la prolifération de lignées cellulaires sur-exprimant les

mutations d'ABCA1 *in vitro*. Nous avons aussi mis en place des modèles *in vivo*, en sur-exprimant les formes mutées d'ABCA1 dans les cellules souches de moelle osseuse sous un fond sauvage (modèle one-hit). Cela nous a permis de déterminer l'impact des mutations d'ABCA1 seules, sur l'apparition de la LMMC.

La deuxième question était de savoir si les mutations agissaient en coopération avec d'autres mutations oncogéniques, comme la perte de fonction de Tet2, connue pour être à l'origine de la cancérisation des cellules myéloïdes (modèle two-hit). Pour cela, nous avons sur-exprimé les formes mutées d'ABCA1 dans des souris déficientes pour Tet2, modèle Mx1-Cre^{+} Tet2$^{fl/fl}$, modèle limitant la déficience en Tet2 au compartiment hématopoïétique (Quivoron et al., 2011). Nous avons pu déterminer la coopération entre la déficience en Tet2 et les mutations d'ABCA1 dans l'apparition de la pathologie.

RESULTATS PRELIMINAIRES

Mise en évidence des mutations d'ABCA1 dans des échantillons de patients atteints de leucémie myélomonocytaire chronique- En collaboration avec le Docteur Ross Levine (Memorial Sloan-Kettering, New York, NY), nous avons mis en évidence cinq nouvelles mutations dans le gène ABCA1 dans 26 échantillons provenant de patients atteints de leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC), en utilisant la technique du criblage à haut débit, avec une fréquence élevée et inattendue de 19% (**Figure 1A** et **Supplemental Figure 1A**). Toutes ces mutations sont des mutations faux-sens. Elles impliquent toutes des acides aminés très conservés et ne sont pas retrouvées dans des tissus sains de ces patients. De manière intéressante, ces mutations sont retrouvées ou non en combinaison avec d'autres mutations oncogéniques comme Flt3, Jak2, N-Ras ou K-Ras (**Supplemental Figure 1A**). Ces 5 nouvelles mutations touchent des régions très distinctes du transporteur ABCA1 (**Figure 1B**). **Le nom des mutations n'est pas mentionné pour des raisons confidentielles, un brevet est en cours de dépôt, mais leur localisation sur le transporteur ABCA1 est précisée** (**Figure 1C**). La mutation 1 est localisée dans le domaine NH2 du transporteur. La mutation 2 touche la PEST séquence, impliquée dans la dégradation du transporteur. Les mutations 3 et 4 se localisent dans la poche de liaison à l'apolipoprotéine A1 (apoA1). Enfin, la mutation 5 se situe dans la région COOH du transporteur (**Figure 1C**). Cette hétérogénéité de localisation suggère que ces mutations peuvent altérer différentes fonctions du transporteur. A ce jour, aucune caractérisation de ces mutations n'a été faite.

La sur-expression des formes mutées d'ABCA1 induit une prolifération accrue des cellules in vitro- Premièrement, nous avons créé les outils nécessaires afin de répondre

aux hypothèses posées. Pour cela nous avons utilisé des cellules THP-1, lignée monocytaire leucémique. Nous avons confirmé que cette lignée exprime le transporteur ABCA1 dans des conditions basales (**Supplemental Figure 1B**). En parallèle, nous avons utilisé une lignée cellulaire non leucémique, les cellules HEK293. Dans un premier temps, nous avons utilisé la technique de nucléoporation afin d'induire une sur-expression transitoire des formes mutées d'ABCA1. Nous avons étudié l'incorporation de la thymidine tritiée ([^{3}H]-Thymidine) dans les cellules HEK293 (**Figure 1D**) et les cellules THP-1 (**Figure 1F**). Cela permet de réaliser une mesure de la prolifération cellulaire *in vitro*. Comme attendu, nous démontrons que la sur-expression de la forme sauvage d'ABCA1 induit une réduction de la prolifération des cellules HEK293 et THP-1 en comparaison avec les cellules ayant incorporé un vecteur vide (empty). Cela confirme le rôle anti-prolifératif que possède le transporteur ABCA1. Deuxièmement, nous mettons en évidence que l'ensemble des formes mutées d'ABCA1 induisent une augmentation de l'incorporation de thymidine tritiée aussi bien dans les cellules HEK293 que dans les cellules THP-1 (**Figure 1D** et **Figure 1F**). Ce résultat suggère que les mutations étudiées sont capables d'induire un phénotype proliferatif. De plus, nous confirmons que les mutations d'ABCA1 induisent une augmentation de la concentration cellulaire en culture dans des conditions basales (**Figure 1E**). Dans un second temps, nous avons mis en place un modèle de sur-expression stable des formes mutées d'ABCA1 dans les cellules THP-1. Pour cela, nous avons choisi une approche d'infection lentivirale. Après avoir sélectionné les clones et confirmer la sur-expression d'ABCA1 (**Supplemental Figure 1C**), nous avons étudié l'incorporation de la thymidine tritiée dans ces cellules. Nous mettons en évidence que l'expression stable de la forme mutée d'ABCA1 permet de réduire la prolifération des cellules THP-1 (**Supplemental Figure 1E**). De plus, nous mettons en évidence que l'expression stable des mutations 3 et 5 du transporteur ABCA1 induit une augmentation de la prolifération des cellules en comparaison avec la sur-expression de la forme sauvage (**Supplemental Figure 1E**). De manière intéressante, nous démontrons qu'il existe un parallèle entre l'expression des formes mutées d'ABCA1 et l'expression du transporteur Glut-1. Ce résultat met en lumière une interaction possible entre l'altération du métabolisme du cholestérol et l'augmentation du flux glucidique dans les cellules cancéreuses.

La sur-expression des formes mutées du transporteur ABCA1 provoque un phénotype myéloproliferatif chez la souris : étude des cellules myéloïdes périphériques- Comme suggéré dans l'introduction de ce projet, nous avons souhaité étudié l'impact des mutations du transporteur ABCA1 seules (modèle Mx1-Cre$^+$) mais aussi en coopération avec la déficience en Tet2 (modèle Mx1-Cre$^+$/Tet2$^{fl/fl}$). Pour cela nous avons infecté les moelles osseuses de souris Mx1-Cre$^+$ ou Mx1-Cre$^+$/Tet2$^{fl/fl}$ avec des lentivirus exprimant la forme

sauvage d'ABCA1 ($ABCA1^{WT}$) ou les formes mutées d'ABCA1 ($ABCA1^{mut}$) (**Figure 2A**), comme nous l'avons fait pour les cellules THP-1. Une fois les moelles infectées, nous avons réalisé une greffe de moelle osseuse dans des souris sauvage (WT) afin de limiter l'expression des mutations d'ABCA1 au compartiment hématopoïétique (**Figure 2A**). Dans un premier temps, comme attendu, nous démontrons que la déficience en Tet2 dans le compartiment hématopoïétique induit une splénomégalie (**Figure 2D**). Dans un second temps, nous démontrons que la coopération entre la défience en Tet2 et la sur-expression des formes mutées 4 et 5 induit une splénomégalie (**Figure 2B** et **Figure 2D**). Comme attendu, la sur-expression de la forme $ABCA1^{WT}$ permet de limiter ce phénotype (**Figure 2B** et **Figure 2D**). Par l'étude de la composition cellulaire de la rate de ces souris par cytométrie en flux, nous avons déterminé le nombre de cellules myéloïdes présentes (cellules $CD11b^+$ $Gr1^+$) dans la rate. Nous mettons ainsi en évidence que la coopération entre la déficience en Tet2 et la sur-expression des mutations 1, 3, 4 et 5 d'ABCA1 ($ABCA1^{mut}$) provoque une accumulation de cellules myéloïdes dans la rate en comparaison avec la sur-expression de la forme sauvage ($ABCA1^{WT}$). De manière intéressante, malgré une absence de splénomégalie chez les souris uniquement porteuses des mutations d'ABCA1 (modèle Mx1-Cre^+) (**Figure 2D**), nous mettons en évidence une accumulation des cellules myéloïdes spléniques (cellules $CD11b^+$ $Gr1^+$) lorsque les mutations 1, 3, 4 et 5 sont sur-exprimées (**Figure 2E**). Ce résultat suggère que les mutations d'ABCA1 seules peuvent induire une altération de la production des cellules myéloïdes.

La sur-expression des formes mutées du transporteur ABCA1 provoque une accumulation de cellules progénitrices dans la moelle osseuse et la rate- Nous avons étudié le nombre de progéniteurs myéloïdes (CMP), en progéniteurs granulocytaires (GMP) et en progéniteurs erythrocyaire (MEP) dans la moelle osseuse (**Figure 3A**). Dans un premier temps, nous montrons qu'une augmentation du pourcentage des CMP est observée lorsque les mutations d'ABCA1 sont sur-exprimées que ce soit seules ou en coopération avec la déficience en Tet2. Ces résultats suggèrent que la sur-expression des formes mutées d'ABCA1 est capable d'induire un engagement des cellules progénitrices spécifiquement envers le compartiment myéloïde, en particulier lors de la coopération des mutations d'ABCA1 avec la déficience en Tet2. De plus cette observation est confortée par les résultats obtenus par l'étude du pourcentage de cellules myéloïdes ($CD11b^+$ GrI^+) après culture des cellules de moelle osseuse totale *ex vivo* en conditions basales ou en présence hormones de croissance (IL-3 et GM-CSF). En effet, nous observons que l'expression des formes mutées d'ABCA1 en coopération avec la déficience en Tet2 induit une augmentation du nombre de cellules myéloïdes, suggérant un engagement des progéniteurs envers la lignée myéloïde.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble de ces résultats préliminaires démontre que les mutations du transporteur ABCA1 mises en évidence chez des patients atteints de LMMC induisent une augmentation de la prolifération des cellules *in vitro*. De plus, malgré une réelle difficulté dans la mise en place des modèles murins, nous sommes en mesure de conclure que les mutations étudiées du transporteur ABCA1 induisent un phénotype myéloprolifératif chez la souris. Evidemment, ces résultats préliminaires nécessitent d'être approfondis. Pour cela, je souhaiterai étudier les voies moléculaires et cellulaires qui sous-tendent l'augmentation de la prolifération *in vitro*. Notamment, il est nécessaire d'étudier les voies de signalisation impliquées dans la prolifération, en étudiant les niveaux d'expression et de phosphorylation de protéines clés comme Jak2, Tyk2, STAT3, STAT5, Akt et Erk par Western Blot (WB) et/ou cytométrie en flux. Nous souhaitons aussi caractériser le contenu cellulaire en cholestérol, notamment les zones riches en cholestérol de la membrane cellulaire en utilisant un marquage de la filipine et de la sous-unité B de la toxine cholérique. Il sera aussi intéressant de traiter ces cellules avec de la β-cyclodextrine afin de vérifier que l'élimination du cholestérol membranaire induit une diminution de la prolifération de ces cellules. L'étude de l'efflux du cholestérol est aussi une étape primordiale qui pourrait aider à la compréhension du phénotype observé. La distribution intracellulaire du cholestérol devra aussi être étudiée, notamment le contenu mitochondrial, notamment via l'utilisation du fractionnement cellulaire par gradient sucrose que nous maitrisons au laboratoire.

Concernant les modèles *in vivo*, nous avons une banque d'échantillons biologique importante grâce auxquels nous allons pouvoir compléter la caractérisation du phénotype. Notamment, je souhaiterai étudier la répartition du cholestérol au niveau des cellules myéloïdes de la rate par immuno-histochimie via un co-marquage des cellules myéloïdes et l'utilisation du Bodipy-cholestérol. De la même manière que pour le modèle in vitro, il est nécessaire d'étudier les voies de signalisation impliquées dans la prolifération des progéniteurs par WB. De plus il serait intéressant d'étudier le profil inflammatoire de ces souris, notamment la sécrétion de l'IL-1β dans la rate, la moelle osseuse et le sang de ces souris. Au vue de nos résultats, je poursuivrais cette étude en étudiant deux cohortes de souris. Premièrement, il serait intéressant de réaliser un transfert de moelle osseuse sur-exprimant les formes mutées sous fond sauvage ou sous un fond déficient pour Tet2 dans des souris sur-exprimant l'ApoA1 humaine. Cela permettrait de tester le potentiel thérapeutique de l'apoA1. En effet, il a été démontré que, dans le cadre d'une déficience médullaire des transporteurs ABCA1 et ABCG1, la sur-expression de l'ApoA1 humaine

réduisait l'apparition du phénotype myéloprolifératif (Yvan-Charvet et al., 2010b). Deuxièmement, au vue de la coopération entre les mutations d'ABCA1 et la déficience en Tet2, l'étude d'une cohorte de souris présentant une double déficience pour ABCA1 et Tet2 permettrait d'obtenir un phénotype plus drastique. Cela permettrait de mettre en évidence les voies de régulation qui agissent de manière synergique dans la mise en place du phénotype myéloprolifératif.

Figure. 1

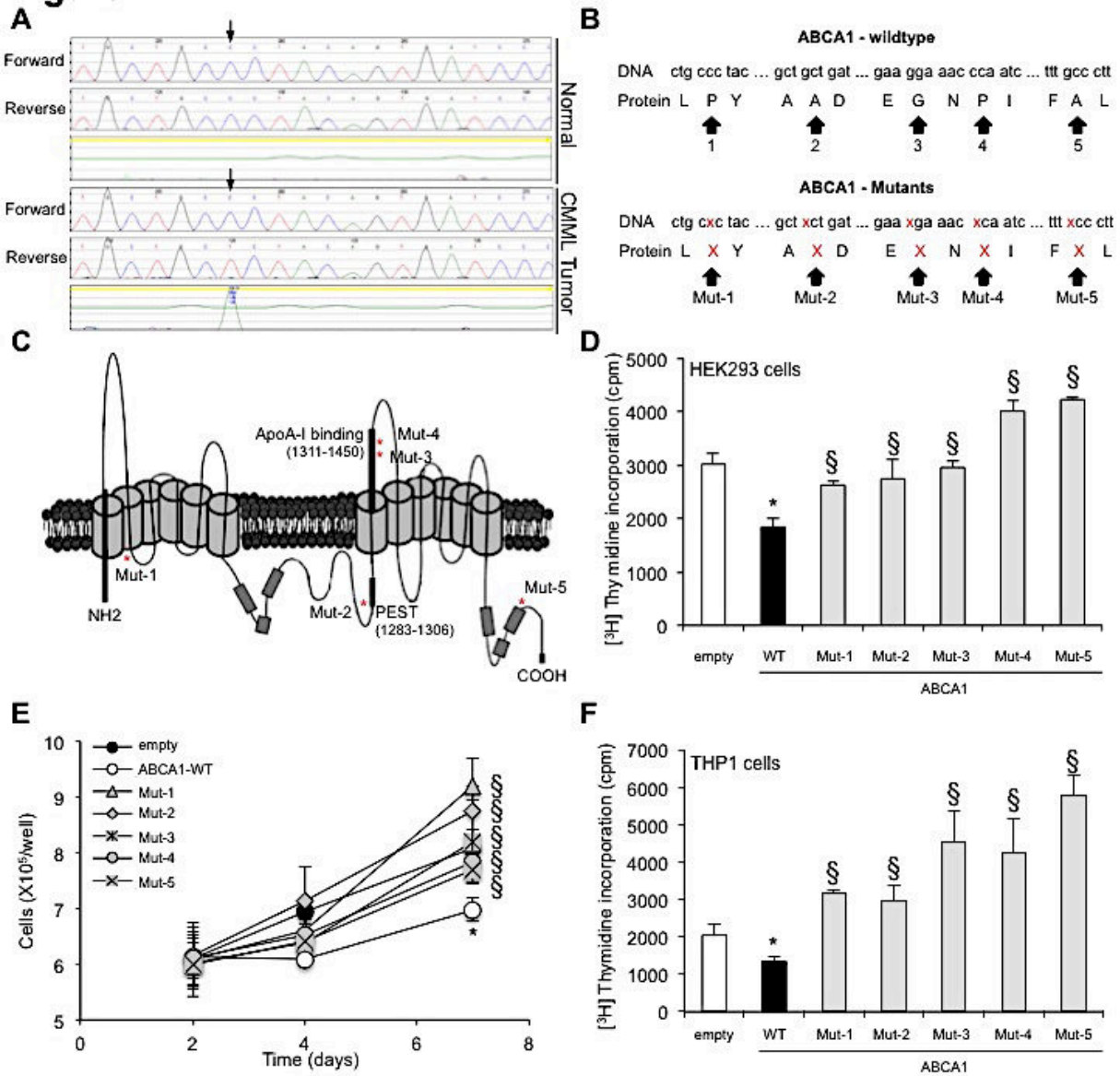

A
Forward
Reverse
Normal
Forward
Reverse
CMML Tumor
B
ABCA1 - wildtype
DNA ctg ccc tac ... gct gct gat ... gaa gga aac cca atc ... ttt gcc ctt
Protein L P Y A A D E G N P I F A L
1 2 3 4 5
ABCA1 - Mutants
DNA ctg cxc tac ... gct xct gat ... gaa xga aac xca atc ... ttt xcc ctt
Protein L X Y A X D E X N X I F X L
Mut-1 Mut-2 Mut-3 Mut-4 Mut-5
C
ApoA-I binding
(1311-1450)
Mut-4
Mut-3
Mut-1
NH2
Mut-2
PEST
(1283-1306)
Mut-5
COOH
D
HEK293 cells
[3H] Thymidine incorporation (cpm)
empty
WT
Mut-1
Mut-2
Mut-3
Mut-4
Mut-5
ABCA1
E
empty
ABCA1-WT
Mut-1
Mut-2
Mut-3
Mut-4
Mut-5
Cells (X10^5/well)
Time (days)
F
THP1 cells
[3H] Thymidine incorporation (cpm)
empty
WT
Mut-1
Mut-2
Mut-3
Mut-4
Mut-5
ABCA1

Figure. 2

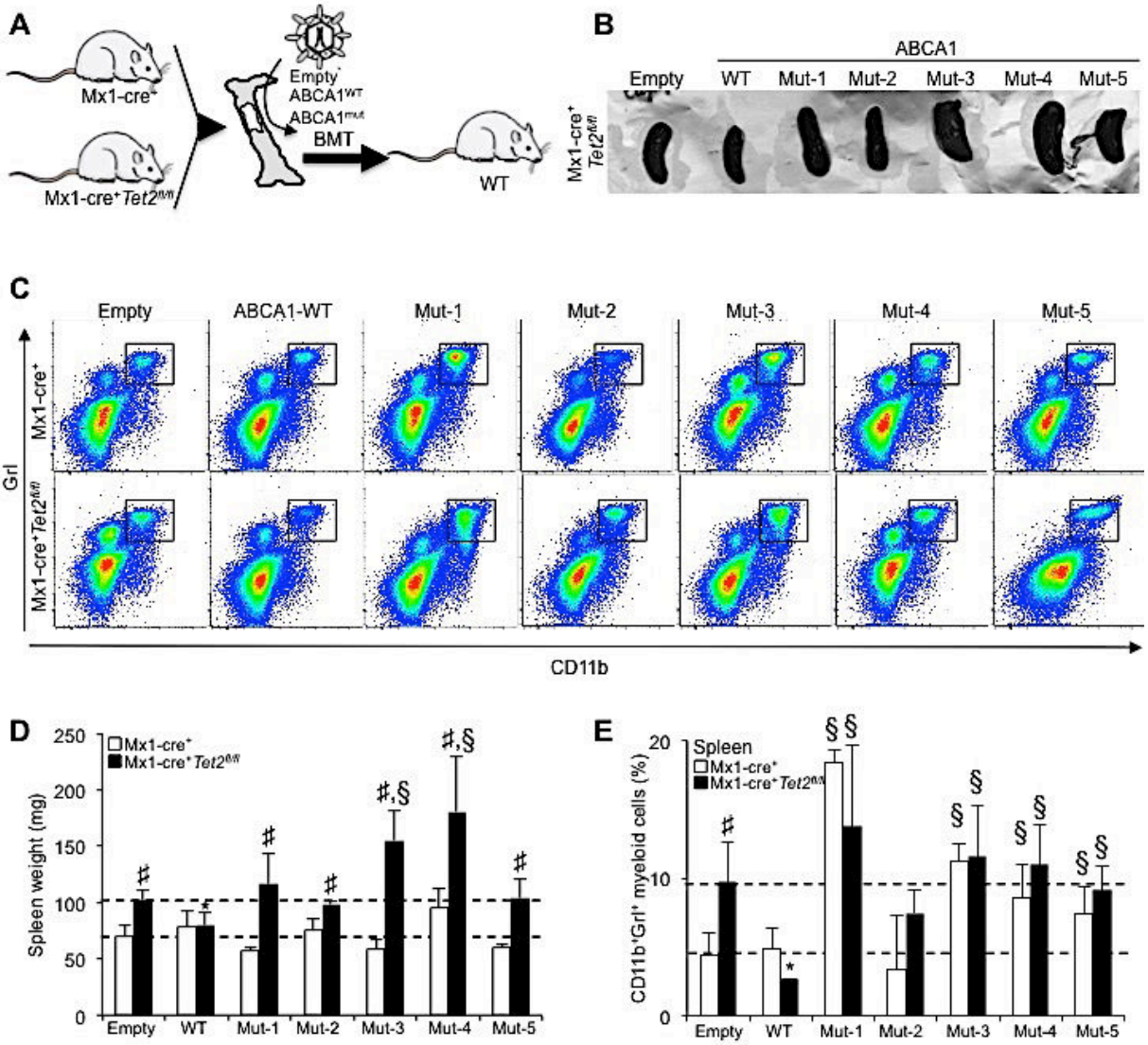
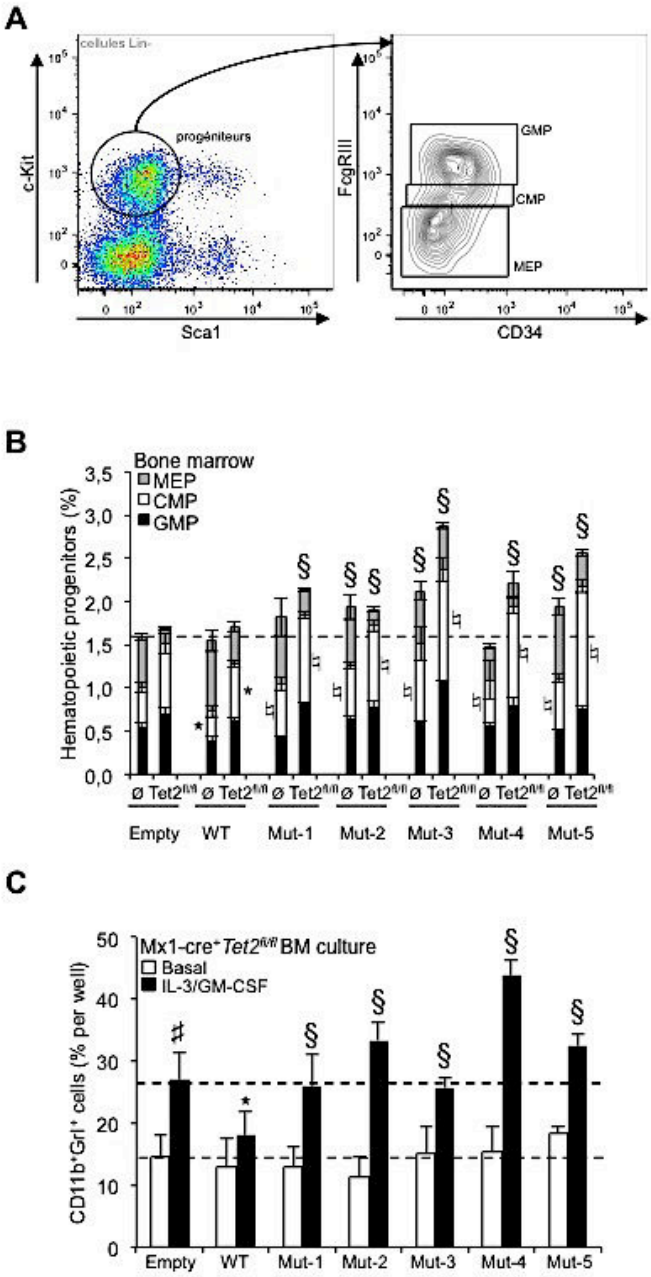

A
Mx1-cre+
Mx1-cre+Tet2fl/fl
Empty
ABCA1WT
ABCA1mut
BMT
WT
B
ABCA1
Empty
WT
Mut-1
Mut-2
Mut-3
Mut-4
Mut-5
Mx1-cre+ Tet2fl/fl
C
Empty
ABCA1-WT
Mut-1
Mut-2
Mut-3
Mut-4
Mut-5
Mx1-cre+
Mx1-cre+Tet2fl/fl
Gr1
CD11b
D
Mx1-cre+
Mx1-cre+Tet2fl/fl
Spleen weight (mg)
250
200
150
100
50
0
Empty
WT
Mut-1
Mut-2
Mut-3
Mut-4
Mut-5
E
Spleen
Mx1-cre+
Mx1-cre+Tet2fl/fl
CD11b+Gr1+ myeloid cells (%)
20
10
0
Empty
WT
Mut-1
Mut-2
Mut-3
Mut-4
Mut-5

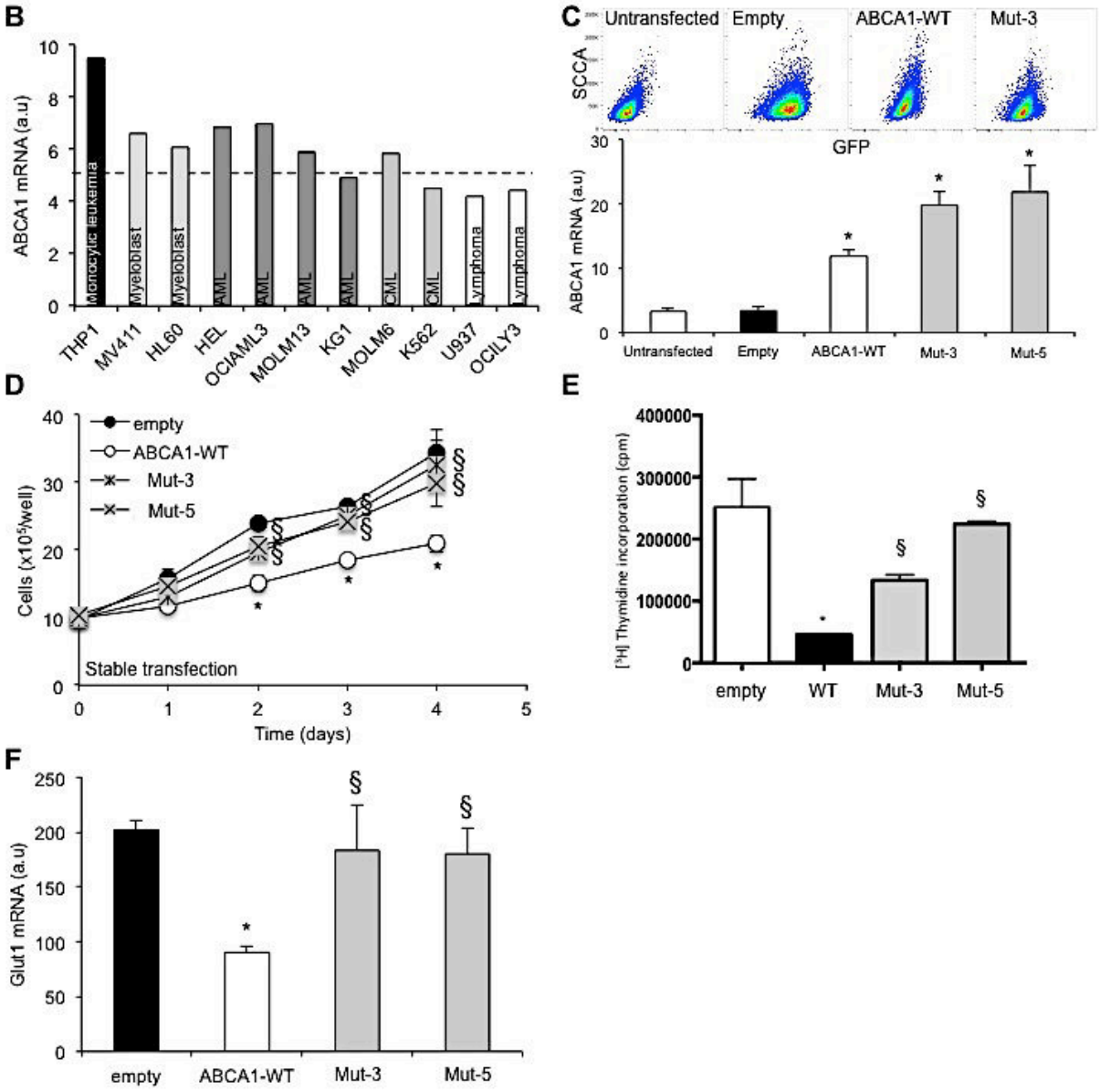
Figure. 3


A
cellules Lin-
progéniteurs
c-Kit
Sca1
FcgRIII
CD34
GMP
CMP
MEP
B
Bone marrow
MEP
CMP
GMP
Hematopoietic progenitors (%)
Empty
WT
Mut-1
Mut-2
Mut-3
Mut-4
Mut-5
C
Mx1-cre+Tet2fl/fl BM culture
Basal
IL-3/GM-CSF
CD11b+Gr1+ cells (% per well)
Empty
WT
Mut-1
Mut-2
Mut-3
Mut-4
Mut-5

Supplemental Figure. 1

A

Genes sequenced	CMML mutations				
ABCA1	Mut-1	Mut-2	Mut-3	Mut-4	Mut-5
JAK2	WT	V617F	WT	WT	WT
Flt3	ITD	WT	WT	WT	ITD
N/K-Ras	WT	G12D	WT	G12D	WT



Légendes des figures

Figure 1- Etude de la prolifération des cellules sur-exprimant les formes mutées d'ABCA1 de manière transitoire. A- Représentation des résultats obtenus après le séquencage à haut débit réalisé sur des cellules saines ou des cellules du sang de patients atteints de LMMC. **B-** Représentation des séquences sauvage (ABCA1-Wildtype) ou mutées (ABCA1-Mutants) au niveau de l'ADN ou de la protéine. Pour des raisons de confidentialité, les bases et les acides aminés mutés ont été remplacés par la lettre X. **C-** Représentation schématique de la structure de transporteur ABCA1 (*adapté de Kang MH. et al., TCM, 2010*) portant les mutations étudiées. **D-** Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée en coup par minute (cpm) au sein des cellules HEK293 sur-exprimant transitoirement les formes WT ou mutées d'ABCA1. **E-** Mesure de la concentration cellulaire (10^5 cellules/puits) au cours du temps (en jour) pour les cellules THP-1 exprimant transitoirement les formes WT ou mutées d'ABCA1. **F-** Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée en coup par minute (cpm) au sein des cellules THP-1 sur-exprimant transitoirement les formes WT ou mutées d'ABCA1. Ces résultats sont issus de trois expériences indépendantes. Les données sont représentées avec l'écart standard à la moyenne (SEM). * p<0,05 empty vs WT et § p<0,05 WT vs ABCA1 mutants.

Figure 2- Etude du phénotype murin des souris sur-exprimant les formes mutées du transporteur ABCA1. A- Représentation du plan expérimental. **B-** Photographie des rates représentatives des souris sur-exprimant des formes mutées d'ABCA1 sous fond Mx1-Cre^+/$Tet2^{fl/fl}$. **C-** Stratégie de gating des cellules myéloïdes dans la rate (cellules $CD11b^+$ $Gr1^+$). **D-** Histogramme des poids des rates des souris au moment du sacrifice. **E-** Histrogramme du pourcentage de cellules myéloïdes (cellules $CD11b^+$ $Gr1^+$) dans la rate des souris au moment du sacrifice. Les données sont représentées avec l'écart standard à la moyenne (SEM). * p<0,05 empty vs WT, § p<0,05 WT vs ABCA1 mutants et # p<0,05 Mx1-Cre^+ vs Mx1Cre^+/$Tet2^{fl/fl}$.

Figure 3- Etude des progéniteurs myéloïdes de la rate et de la moelle osseuse des souris sur-exprimant les formes mutées du transporteur ABCA1. A- Stratégies de gating des progéniteurs GMP (granulocyte macrophage progenitor), CMP (common myeloid progenitor) et MEP (megakaryocyte erythroid progenitor). **B-** Pourcentage des différents progéniteurs (CMP, GMP et MEP) dans la moelle osseuse. Les données sont représentées avec l'écart standard à la moyenne (SEM). * p<0,05 empty vs WT, § p<0,05 WT vs ABCA1 mutants, ♮ p<0,05 WT vs ABCA1 mutants, # p<0,05 Mx1-Cre^+ vs Mx1Cre^+/$Tet2^{fl/fl}$. **C-** Pourcentage des cellules myéloïdes CD11b+ GrI+ dans la moelle osseuse après 72 heures en culture avec ou sans hormones de croissance (IL-3 et GM-CSF). * p<0,05 empty vs WT, § p<0,05 WT vs ABCA1 mutants, # p<0,05 basal vs IL-3/GM-CSF.

Supplemental Figue 1- Etude de la prolifération des cellules sur-exprimant les formes mutées d'ABCA1 de manière stable. A- Tableau représentant la co-expression des mutations fréquemment retrouvées dans la LMMC et les mutations ABCA1 étudiées. **B-** Niveau d'expression de l'ARNm d'ABCA1 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses. AML : Leucémie Aigue Myéloïde, CML : Leucémie Myéloïde Chronique. **C-** Mesure de l'expression de l'ARNm d'ABCA1 dans les lignées exprimant stablement les mutations d'ABCA1 (Mut-3 et Mut-5). **D-** Mesure de la concentration cellulaire (10^5 cellules/puits) au cours du temps (en jour) pour les cellules THP-1 exprimant stablement les formes WT ou mutées d'ABCA1. **E-** Mesure de l'incorporation de thymidine tritiée en coup par minute (cpm) au sein des cellules THP-1 sur-exprimant stablement les formes WT ou mutées d'ABCA1. **F-** Etude de l'expression de l'ARNm codant pour le transporteur Glut-1 dans les cellules THP-1 sur-exprimant stablement les formes WT ou mutées d'ABCA1. Les données sont représentées avec l'écart standard à la moyenne (SEM). * p<0,05 empty vs WT, § p<0,05 WT vs ABCA1 mutants.

BIBLIOGRAPHIE

Alexander, R., and Beggs, J.D. (2010). Cross-talk in transcription, splicing and chromatin: who makes the first call? Biochem. Soc. Trans. *38*, 1251–1256.

Dessì, S., Batetta, B., Spano, O., Sanna, F., Tonello, M., Giacchino, M., Tessitore, L., Costelli, P., Baccino, F.M., and Madon, E. (1995). Clinical remission is associated with restoration of normal high-density lipoprotein cholesterol levels in children with malignancies. Clin. Sci. *89*, 505–510.

Figueroa, M.E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P.S., Patel, J., Shih, A., Li, Y., Bhagwat, N., Vasanthakumar, A., Fernandez, H.F., et al. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. Cancer Cell *18*, 553–567.

Fiorenza, A.M., Branchi, A., and Sommariva, D. (2000). Serum lipoprotein profile in patients with cancer. A comparison with non-cancer subjects. Int. J. Clin. Lab. Res. *30*, 141–145.

Itzykson, R., and Fenaux, P. (2012). Predicting the outcome of patients with higher-risk myelodysplastic syndrome treated with hypomethylating agents. Leuk. Lymphoma *53*, 760–762.

Itzykson, R., Duchmann, M., Lucas, N., and Solary, E. (2017). CMML: Clinical and molecular aspects. Int. J. Hematol. *105*, 711–719.

Jankowska, A.M., Makishima, H., Tiu, R.V., Szpurka, H., Huang, Y., Traina, F., Visconte, V., Sugimoto, Y., Prince, C., O'Keefe, C., et al. (2011). Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. Blood *118*, 3932–3941.

Ko, M., Huang, Y., Jankowska, A.M., Pape, U.J., Tahiliani, M., Bandukwala, H.S., An, J., Lamperti, E.D., Koh, K.P., Ganetzky, R., et al. (2010). Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. Nature *468*, 839–843.

Kohlmann, A., Grossmann, V., Klein, H.-U., Schindela, S., Weiss, T., Kazak, B., Dicker, F., Schnittger, S., Dugas, M., Kern, W., et al. (2010). Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. J. Clin. Oncol. *28*, 3858–3865.

Lee, B.H., Tothova, Z., Levine, R.L., Anderson, K., Buza-Vidas, N., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Adelsperger, J., Fröhling, S., Huntly, B.J.P., et al. (2007). FLT3 mutations confer enhanced proliferation and survival properties to multipotent progenitors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia. Cancer Cell *12*, 367–380.

Levine, R.L., Loriaux, M., Huntly, B.J.P., Loh, M.L., Beran, M., Stoffregen, E., Berger, R., Clark, J.J., Willis, S.G., Nguyen, K.T., et al. (2005). The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. Blood *106*, 3377–3379.

McMurray, H.R., Sampson, E.R., Compitello, G., Kinsey, C., Newman, L., Smith, B., Chen, S.-R., Klebanov, L., Salzman, P., Yakovlev, A., et al. (2008). Synergistic response to oncogenic mutations defines gene class critical to cancer phenotype. Nature *453*, 1112–1116.

Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Patel, J., Zhao, X., et al. (2011). Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. Cancer Cell *20*, 11–24.

Naramura, M., Nandwani, N., Gu, H., Band, V., and Band, H. (2010). Rapidly fatal myeloproliferative disorders in mice with deletion of Casitas B-cell lymphoma (Cbl) and Cbl-b in hematopoietic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *107*, 16274–16279.

Patnaik, M.M., and Tefferi, A. (2016). Chronic myelomonocytic leukemia: 2016 update on diagnosis, risk stratification, and management. Am. J. Hematol. *91*, 631–642.

Pérez, C., Martínez-Calle, N., Martín-Subero, J.I., Segura, V., Delabesse, E., Fernandez-Mercado, M., Garate, L., Alvarez, S., Rifon, J., Varea, S., et al. (2012). TET2 mutations are associated with specific 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine profiles in patients with chronic myelomonocytic leukemia. PLoS ONE *7*, e31605.

Pickeral, O.K., Li, J.Z., Barrow, I., Boguski, M.S., Makałowski, W., and Zhang, J. (2000). Classical oncogenes and tumor suppressor genes: a comparative genomics perspective. Neoplasia *2*, 280–286.

Quivoron, C., Couronné, L., Della Valle, V., Lopez, C.K., Plo, I., Wagner-Ballon, O., Do Cruzeiro, M., Delhommeau, F., Arnulf, B., Stern, M.-H., et al. (2011). TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. Cancer Cell *20*, 25–38.

Rampal, R., Al-Shahrour, F., Abdel-Wahab, O., Patel, J.P., Brunel, J.-P., Mermel, C.H., Bass, A.J., Pretz, J., Ahn, J., Hricik, T., et al. (2014). Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. Blood *123*, e123-133.

Rathinam, C., Thien, C.B.F., Flavell, R.A., and Langdon, W.Y. (2010). Myeloid leukemia development in c-Cbl RING finger mutant mice is dependent on FLT3 signaling. Cancer Cell *18*, 341–352.

Score, J., Hidalgo-Curtis, C., Jones, A.V., Winkelmann, N., Skinner, A., Ward, D., Zoi, K., Ernst, T., Stegelmann, F., Döhner, K., et al. (2012). Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. Blood *119*, 1208–1213.

Selimoglu-Buet, D., Wagner-Ballon, O., Saada, V., Bardet, V., Itzykson, R., Bencheikh, L., Morabito, M., Met, E., Debord, C., Benayoun, E., et al. (2015). Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. Blood *125*, 3618–3626.

Smith, B., and Land, H. (2012). Anticancer Activity of the Cholesterol Exporter ABCA1 Gene. Cell Reports *2*, 580–590.

Such, E., Cervera, J., Costa, D., Solé, F., Vallespí, T., Luño, E., Collado, R., Calasanz, M.J., Hernández-Rivas, J.M., Cigudosa, J.C., et al. (2011). Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. Haematologica *96*, 375–383.

Westerterp, M., Gourion-Arsiquaud, S., Murphy, A.J., Shih, A., Cremers, S., Levine, R.L., Tall, A.R., and Yvan-Charvet, L. (2012). Regulation of hematopoietic stem and progenitor cell mobilization by cholesterol efflux pathways. Cell Stem Cell *11*, 195–206.

Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nowak, D., Nagata, Y., Yamamoto, R., Sato, Y., Sato-Otsubo, A., Kon, A., Nagasaki, M., et al. (2011). Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. Nature *478*, 64–69.

Yvan-Charvet, L., Pagler, T., Gautier, E.L., Avagyan, S., Siry, R.L., Han, S., Welch, C.L., Wang, N., Randolph, G.J., Snoeck, H.W., et al. (2010). ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. Science *328*, 1689–1693.

Zyada, L.E., Hassan, H.T., Rees, J.K., and Ragab, M.H. (1990). The relation between hypocholesterolemia and degree of maturation in acute myeloid leukemia. Hematol Oncol *8*, 65–69.

Annexe 1

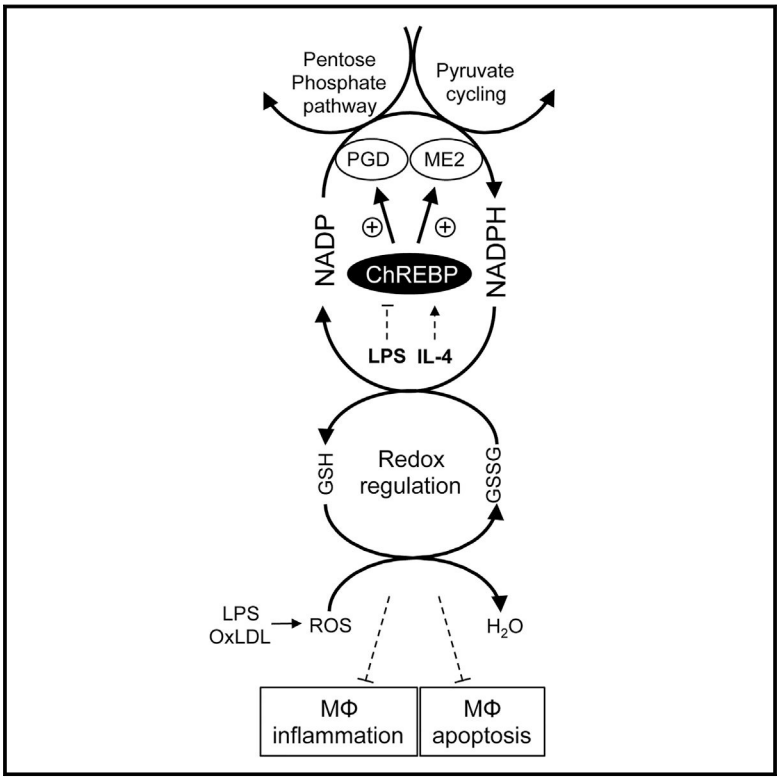
« Maintenance of Macrophage Redox Status by ChREBP Limits Inflammation and Apoptosis and Protects against Advanced Atherosclerotic Lesion Formation. »

Cell Reports

Article

Maintenance of Macrophage Redox Status by ChREBP Limits Inflammation and Apoptosis and Protects against Advanced Atherosclerotic Lesion Formation

Graphical Abstract



Authors

Vincent Sarrazy, Sophie Sore, Manon Viaud, ..., Rodolphe Guinamard, Emmanuel L. Gautier, Laurent Yvan-Charvet

Correspondence

laurent.yvan-charvet@unice.fr

In Brief

Sarrazy et al. show that the carbohydrate-responsive element binding protein ChREBP is required for metabolic reprogramming in activated macrophages and provide evidence that changes in ChREBP-dependent macrophage redox status influence macrophage polarization and survival with physiopathological consequences on atherosclerosis.

Highlights

- ChREBP prevents macrophage inflammatory responses and apoptosis
- ChREBP maintains macrophage redox status
- ChREBP protects against atherosclerosis development

Sarrazy et al., 2015, Cell Reports *13*, 132–144
October 6, 2015 ©2015 The Authors
http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.068

OPEN ACCESS
CellPress

Cell Reports
Article

Maintenance of Macrophage Redox Status by ChREBP Limits Inflammation and Apoptosis and Protects against Advanced Atherosclerotic Lesion Formation

Vincent Sarrazy,[1] Sophie Sore,[1] Manon Viaud,[1] Guylène Rignol,[1] Marit Westerterp,[2] Franck Ceppo,[1] Jean-Francois Tanti,[1] Rodolphe Guinamard,[1] Emmanuel L. Gautier,[3] and Laurent Yvan-Charvet[1,*]
[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1065, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), Atip-Avenir, 06204 Nice, France
[2]Division of Molecular Medicine, Department of Medicine, Columbia University, New York, NY 10032, USA
[3]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) UMR_S 1166, Pierre and Marie Curie University Paris 6, ICAN Institute of Cardiometabolism and Nutrition, 75006 Paris, France
*Correspondence: laurent.yvan-charvet@unice.fr
http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.068
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

SUMMARY

Enhanced glucose utilization can be visualized in atherosclerotic lesions and may reflect a high glycolytic rate in lesional macrophages, but its causative role in plaque progression remains unclear. We observe that the activity of the carbohydrate-responsive element binding protein ChREBP is rapidly downregulated upon TLR4 activation in macrophages. ChREBP inactivation refocuses cellular metabolism to a high redox state favoring enhanced inflammatory responses after TLR4 activation and increased cell death after TLR4 activation or oxidized LDL loading. Targeted deletion of ChREBP in bone marrow cells resulted in accelerated atherosclerosis progression in *Ldlr*$^{-/-}$ mice with increased monocytosis, lesional macrophage accumulation, and plaque necrosis. Thus, ChREBP-dependent macrophage metabolic reprogramming hinders plaque progression and establishes a causative role for leukocyte glucose metabolism in atherosclerosis.

INTRODUCTION

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease driven by the accumulation of macrophage foam cells in the artery walls (Ross, 1999; Hansson et al., 2006; Moore and Tabas, 2011). Circulating monocytes traverse the inflamed arterial endothelium to fuel developing lesions (Swirski and Nahrendorf, 2013; Zernecke and Weber, 2014; Randolph, 2014; Tall and Yvan-Charvet, 2015). In addition, local environmental cues lead to alterations in the phenotype and survival of lesional macrophages (Tabas, 2005; Mosser and Edwards, 2008; Van Vré et al., 2012; Chinetti-Gbaguidi and Staels, 2011; Hasty and Yvan-Charvet, 2013), altering plaque composition and increasing the vulnerability of the plaques to rupture (Libby et al., 1996; Kolodgie et al., 2004).

Although extensive research has focused on elucidating the roles of cytokines and the microenvironment in the migration, proliferation, differentiation, and apoptosis of monocytes and macrophages, the cellular metabolic pathways that regulate these processes are not well understood. Inflamed atherosclerotic plaques can be visualized by non-invasive positron emission tomography-computed tomography (PET-CT) imaging with ^{18}FDG, a glucose analog, which correlates with macrophage accumulation and inflammation (Rogers and Tawakol, 2011; Garcia-Garcia et al., 2014). Increasing glucose metabolism is thought to be crucial for macrophage activation. For instance, glucose consumption and glycolysis are enhanced in macrophages during inflammatory responses (Fukuzumi et al., 1996; Gamelli et al., 1996), and pharmacological inhibition of glucose metabolism can prevent the inflammatory responses induced by lipopolysaccharide (LPS) (Gautier et al., 2013). However, a recent study has called into question the relevance of these observations, as myeloid-specific overexpression of the glucose transporter Glut1, achieved by transducing bone marrow (BM) with CD68-Glut1 retroviral particles, did not aggravate atherosclerosis in *Ldlr*$^{-/-}$ knockout mice compared to Glut1-sufficient controls despite enhanced macrophage glycolysis (Nishizawa et al., 2014). Thus, there is a need for a better understanding of the metabolic pathways that link macrophage cellular glucose homeostasis and inflammation in atherosclerosis.

There are a number of pathways leading to aberrant metabolism of glucose that are thought to be pathological. Studies in mice have shown that glucose can be reduced by aldose reductase (AR) to sorbitol in macrophages, leading to the production of excess reactive oxygen species (ROS), which may contribute to accelerated atherosclerosis (Srivastava et al., 2009; Vedantham et al., 2011; Vikramadithyan et al., 2005). However, low levels of AR are present in mice, and this pathway has few effects in mouse macrophages unless they express a human AR transgene, suggesting that alternative metabolic pathways exist to drive the inflammatory responses observed during macrophage activation. Modulation of mitochondrial potential and the tricarboxylic (TCA) cycle has been clearly associated with the ability of macrophages to mount an inflammatory

response (Vats et al., 2006; O'Neill and Hardie, 2013; Tannahill et al., 2013; Jha et al., 2015). Recently, the sedoheptulose kinase CARKL, an enzyme involved in the pentose phosphate pathway (PPP), has been proposed to act upstream of these alterations by modulating glycolysis, oxidative phosphorylation (OXPHOS), and the TCA cycle in macrophages, with subsequent modulation of inflammatory responses (Haschemi et al., 2012). Intriguingly, the carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP), also known as MLX-interacting protein-like (MLXIPL), is a glucose-responsive transcription factor that regulates glycolysis and lipogenesis in hepatocytes. ChREBP can also be either positively regulated by glucose-derived metabolites or negatively regulated by AMPK and PKA, illustrating its pivotal role at the interface of different metabolic pathways (Filhoulaud et al., 2013). However, the relevance of this pathway to macrophage activation and atherosclerosis remains unknown.

To test the causal relationship between modulation of myeloid glucose utilization, inflammatory activation of myeloid cells, and the development of atherosclerotic lesions, we examined the role of ChREBP in inflammatory macrophages. We found that ChREBP activity was downregulated upon LPS stimulation, and knockdown of ChREBP in macrophages led to a major defect in the metabolic pathways that generate NADPH, the rate-limiting source of reduced glutathione. This led to increased inflammatory cytokine production and increased apoptosis in response to both LPS and oxidized LDL after ChREBP knockdown in macrophages. We next transplanted the BM of mice with ChREBP deficiency into atheroprone *Ldlr*$^{-/-}$ mice. Unexpectedly, we found that *Ldlr*$^{-/-}$ mice that had received *Chrebp*$^{-/-}$ BM showed accelerated atherosclerosis, with macrophage accumulation and enhanced necrotic core formation. These data demonstrate an important anti-inflammatory and pro-survival role for ChREBP in the prevention of atherosclerosis and necrotic core formation.

RESULTS

ChREBP Deficiency Increases Expression of Inflammatory Cytokines in Macrophages

Given the enhanced glucose flux observed in inflammatory macrophages (Fukuzumi et al., 1996; Gamelli et al., 1996; Gautier et al., 2013; Nishizawa et al., 2014), we first investigated whether the activity of ChREBP, a glucose-responsive transcriptional factor, was enhanced upon LPS stimulation in thioglycollate-elicited peritoneal macrophages. Surprisingly, ChREBP nuclear translocation, reflecting ChREBP activity, was reduced by ~2-fold after 3 hr of LPS stimulation in wild-type (WT) macrophages (Figures 1A and 1B). In an attempt to identify the underlying mechanism, we next tested whether reduced CARKL-dependent X5P production upon macrophage activation (Haschemi et al., 2012) could prevent ChREBP nuclear translocation and activity (Filhoulaud et al., 2013). Intriguingly, CARKL silencing using small interfering RNA (siRNA) reduced ChREBP nuclear translocation both at baseline and after LPS stimulation, but this most likely reflected reduced total ChREBP protein expression (Figure S1). Mechanistic studies were next carried out using siRNA that led to a significant decrease in ChREBP mRNA expression (Figure S2A). ChREBP protein expression and nuclear translocation confirmed the knockdown efficiency (Figures 1A and 1B). A time-course experiment showed a greater initial increase in the expression of genes encoding cytokines such as tumor necrosis factor α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) in macrophages after ChREBP silencing, which returned to basal levels after 10 hr of LPS exposure (Figures 1C and 1D). A 2-fold increase in TNF-α and IL-1β secretion paralleled the mRNA response 3 hr after LPS challenge (Figure 1E). These data, together with enhanced surface staining of the co-stimulatory molecule CD80 upon LPS stimulation in ChREBP knockdown macrophages (Figure 1F), demonstrated an enhanced activation state of these cells. LPS is known to signal via the Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor κB (NF-κB) pathway, and ChREBP knockdown resulted in a greater initial increase and sustained phosphorylation in the transactivation domain of the p65 subunit, which is essential for optimal NF-κB activation after LPS exposure (Figure 1G). An alkaline phosphatase reporter construct inducible by NF-κB in RAW-Blue cells confirmed an increase in NF-κB transcriptional activity after ChREBP silencing from 3 hr to 6 hr after LPS stimulation (Figure 1H). This appears to be specific to the NF-κB pathway, as similar phosphorylation of Akt, p38-MAPK, and mTor was observed after ChREBP knockdown in macrophages 3 hr after LPS treatment (Figure S2B). We finally evaluated cytokine gene expression BM-derived macrophages. Although there was no detectable basal expression of cytokines in either controls or ChREBP knockdown macrophages, an enhanced response to LPS was confirmed in ChREBP knockdown BM-derived macrophages (Figure S2C). Thus, ChREBP downregulation after LPS stimulation affects the inflammatory response in macrophages.

Metabolic Profiling Reveals Reduced Metabolic Pathways that Control NADPH Production in LPS-Stimulated *Chrebp*-Deficient Macrophages, Favoring Catabolic over Anabolic Pathways

Considering the substantial reprogramming of metabolism upon macrophage activation, we next quantified glycolytic metabolites by liquid chromatography-mass spectrometry in thioglycollate-elicited peritoneal macrophages after ChREBP knockdown with or without 3 hr LPS treatment. Unexpectedly, despite the role of ChREBP as a positive regulator of glycolysis in hepatocytes (Dentin et al., 2012), increases in glycolytic metabolites such as fructose 1,6-biphosphate (FBP) and 3-phosphoglycerate/2-phosphoglycerate (3PG+2PG) were observed in basal ChREBP knockdown macrophages even thought these effects were not sustained upon LPS stimulation (Figure 2A). Glucose 6-phosphate/fructose 6-phosphate (G6P+F6P) and citric acid cycle metabolites such as citrate/isocitrate (I/Citrate) and succinate were not statically different in macrophages following ChREBP silencing (Figures 2A and 2B). In contrast, a striking increase in malate (more than 3-fold) was observed in basal and LPS-stimulated ChREBP knockdown macrophages (Figure 2B). This was associated with a trend toward a higher ATP-to-ADP ratio in basal ChREBP knockdown macrophages (Figure 2C, left panel) and an ~1.6-fold increase in lactate content (a surrogate of glycolytic flux) in basal and LPS-stimulated ChREBP knockdown macrophages (Figure 2C, right panel). The metabolic plasticity of ChREBP-deficient macrophages

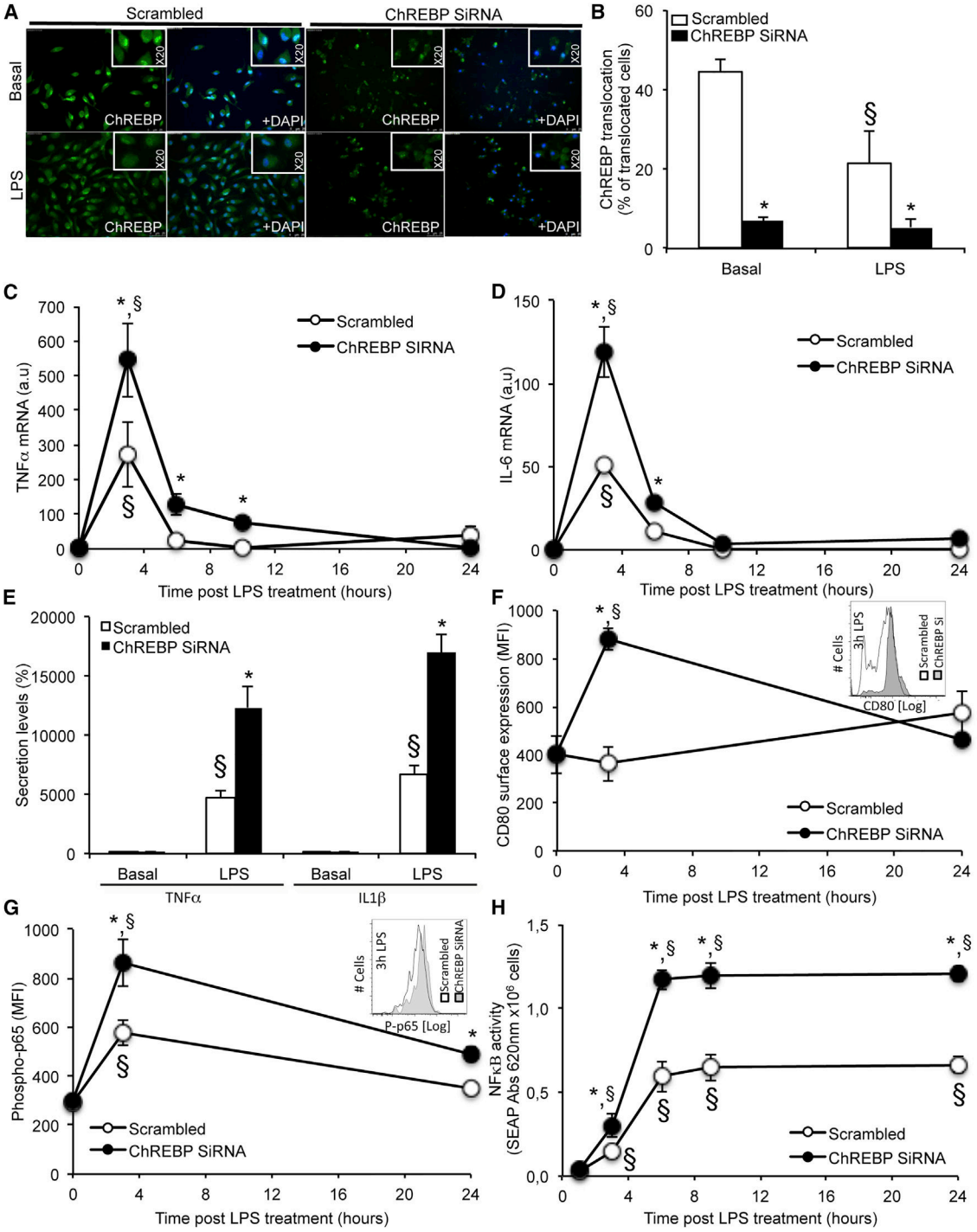


Figure 1. ChREBP Is Required for the Proper Inflammatory Response of Macrophages

Thioglycollate-elicited peritoneal macrophages transfected for 48 hr with scrambled or ChREBP siRNA were stimulated with or without 100 ng/ml LPS for 3 hr or the indicated period of time.

(A and B) Representative pictures and quantification of ChREBP translocation (magnification 5×, insert 20× with or without DAPI co-staining).

(C and D) mRNA expression over time of TNF-α and IL-6.

(E) Secretion of inflammatory cytokines normalized to cellular protein amount and expressed as a percentage of WT.

(F and G) CD80 surface expression (F) and phospho-p65 expression (G) over time.

(H) NF-κB activity measured by an alkaline phosphatase reporter construct in RAW-Blue cells.

Values are mean ± SEM of three independent experiments. *$p < 0.05$ compared to control; §$p < 0.05$ versus untreated condition.

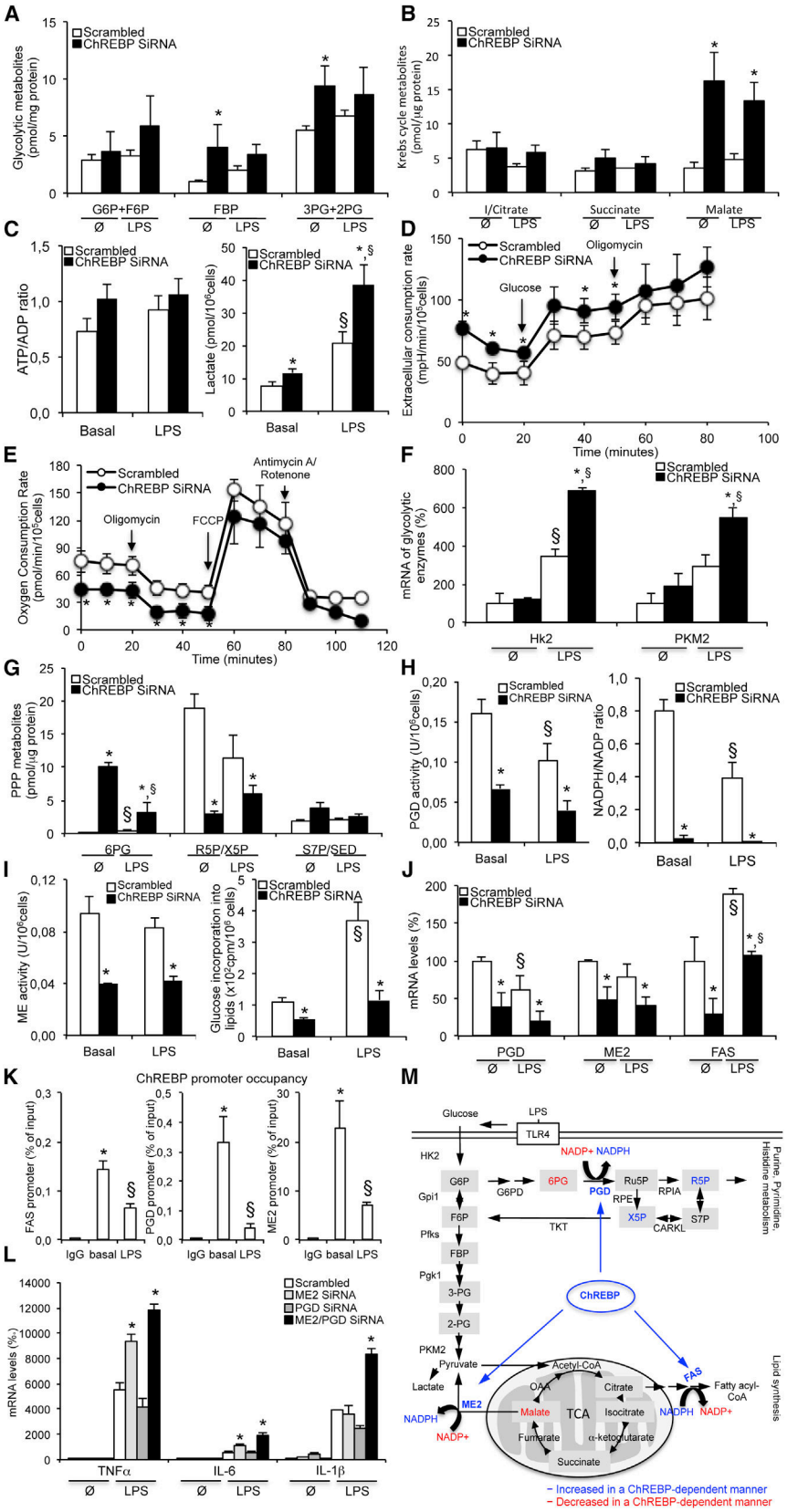


Figure 2. ChREBP Reprograms Carbohydrate Metabolism in LPS-Stimulated Macrophages

Thioglycollate-elicited peritoneal macrophages transfected with scrambled or ChREBP siRNA were stimulated with or without 100 ng/ml LPS for 3 hr or the indicated period of time.

(A–C) Effect of LPS treatment on glycolytic (A) and citric acid (B) metabolites and ATP/ADP ratio and lactate (C).

(D and E) ECAR (D) and OCR (E) recordings of 3-hr LPS-stimulated macrophages under the indicated conditions.

(F–J) Effect of LPS treatment on mRNA expression of glycolytic enzymes (F), metabolites from the pentose phosphate pathway (G), PGD activity and NADPH/NAD ratio (H), ME activity and glucose conversion into lipids (I), and mRNA expression of NADPH-dependent enzymes (J).

(K) ChIP assays were performed with amplicons flanking the proximal promoter region of putative ChREBP targets. qPCR (normalized to input) was used to assess ChREBP occupancy of the targeted promoter.

(L) Effect of LPS on cytokine gene expression in macrophages transfected with scrambled, ME2, and PDG siRNA.

Results are means ± SEM of an experiment performed in triplicate. *$p < 0.05$ compared to control; § $p < 0.05$ versus untreated condition.

(M) Schematic representation of the metabolic pathways regulated by ChREBP in LPS-treated macrophages.

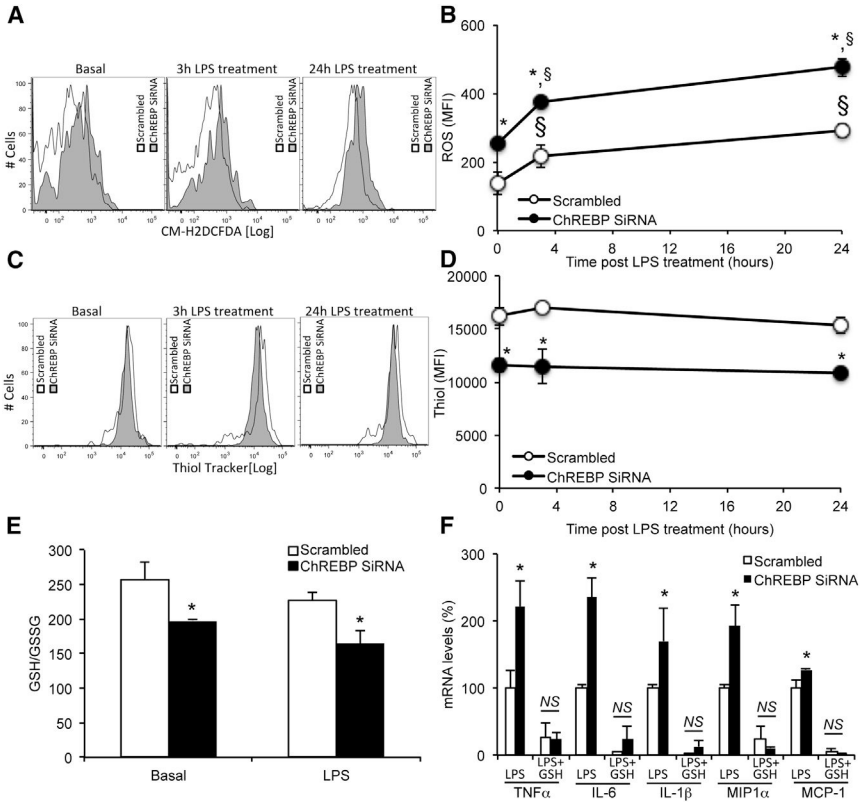


Figure 3. The Enhanced Inflammatory Response in *Chrebp*-Deficient Macrophages Is Metabolically Driven by Low Glutathione Redox Status

Thioglycollate-elicited peritoneal macrophages transfected with scrambled or ChREBP siRNA were stimulated with or without 100 ng/ml LPS for 3 hr or the indicated period of time.

(A–D) Representative histograms and quantification of ROS generation (A and B) and intracellular thiol content (C and D).

(E) Intracellular GSH/GSSG ratio.

(F) Effect of GSH on transcript levels of inflammatory cytokines (percentage over WT).

Results are means ± SEM of three independent experiments. *$p < 0.05$ compared to control; §$p < 0.05$ versus untreated condition.

upon activation was also confirmed by an increase in extracellular acidification rate (ECAR) at baseline and after glucose stimulation, but not after oligomycin treatment (Figure 2D), and a decrease in oxygen consumption rate (OCR) at baseline or after oligomycin treatment (Figure 2E). An ~2-fold increase in the expression of glycolytic enzymes such as hexokinase 2 (Hk2) and pyruvate kinase isozyme M2 (PKM2) in LPS-stimulated macrophages after ChREBP knockdown also correlated with higher glycolytic flux (Figure 2F). Although increased 6-phosphogluconate (6PG) was observed in basal and LPS-stimulated macrophages after ChREBP silencing, there was a significant decrease in ribulose-5-phosphate/xybulose-5-phosphate (R5P/X5P) levels, but not sedoheptulose-7phosphate/sedoheptulose (S7P/SED), in these cells (Figure 2G). This was associated with an ~2-fold decrease in phosphogluconate dehydrogenase (PGD; an enzyme that converts 6PG into R5P and NADP+ to NADPH) activity in basal and LPS-stimulated ChREBP knockdown cells (Figure 2H, left panel). Consistently, basal and LPS-stimulated macrophages exhibited a prominent 30-fold decrease in the NADPH/NADP ratio after ChREBP knockdown (Figure 2H, right panel). NADPH can also be produced by the pyruvate cycling pathway or consumed through anabolic pathways such as lipid synthesis, both pathways being targets of ChREBP (Ma et al., 2006; Burgess et al., 2008; Filhoulaud et al., 2013). Remarkably, we found a 2.5-fold decrease in malic enzyme (ME) activity (Figure 2I, right panel) and a 2-fold decrease in glucose conversion into lipids (Figure 2I, left panel) in basal and LPS-stimulated macrophages after ChREBP knockdown. At the transcriptional level, an ~2-fold decrease in phosphogluconate dehydrogenase (PGD), mitochondrial malic enzyme (ME2), and fatty acid synthase (FAS) mRNA expression was observed in basal and LPS-stimulated macrophages after ChREBP silencing (Figure 2J), and this correlated with an altered NADPH/NAPD ratio and impaired lipid synthesis. Then, specific binding of ChREBP on FAS, ME2, and PGD promoters was investigated in basal and LPS-stimulated macrophages using chromatin immunoprecipitation assays. The binding of ChREBP was demonstrated at different degrees on these promoters and declined after 3-hr LPS stimulation (Figure 2K). ME2 and PGD silencing using siRNA in thioglycollate-elicited peritoneal macrophages with or without 3-hr LPS treatment also confirmed that combined knockdown of these two genes led to an exacerbated inflammatory response after LPS stimulation (Figure 2L). Together, our results reveal that ChREBP does not contribute to the enhanced glycolysis in inflamed macrophages but rather controls the two main cellular pathways involved in NAPDH production, which could explain, together with reduced FAS expression, the diminished lipid synthesis capacity of these cells (Figure 2M).

Reduced PPP-Dependent Cellular Redox Status Drives the Macrophage Inflammatory Response in *Chrebp*-Deficient Macrophages

In metabolic terms, the reduced NADPH/NADP ratio observed in macrophages after ChREBP silencing could equate to a lack of reducing energy known to supply reduced glutathione and scavenge free radicals to prevent oxidative damage. Indeed, a time-course experiment revealed that ChREBP knockdown in thioglycollate-elicited peritoneal macrophages led to an ~1.7-fold increase in the oxidative stress response measured by flow cytometry (Figures 3A and 3B) that was inversely correlated with an ~1.4-fold decrease in thiol-tracker staining under basal or LPS-stimulated conditions (Figures 3C and 3D). Increased oxidative stress response was also observed to a less extent in

thioglycollate-elicited peritoneal macrophages cultured in low-glucose medium (5.6 mM versus 25 mM) after ChREBP silencing (Figure S3). The reduced GSH/GSSG balance in basal (1.3-fold) and LPS-stimulated (1.4-fold) macrophages after ChREBP knockdown confirmed an alteration of the glutathione redox balance in these cells (Figure 3E). Remarkably, exogenous addition of glutathione monoethyl ester clearly abolished the increased inflammatory cytokine expression induced by LPS in thioglycollate-elicited peritoneal macrophages after ChREBP silencing (Figure 3F). Together, these findings show that the increased inflammatory responses in macrophages with ChREBP silencing reflect a lack of NADPH-dependent reduction of glutathione disulfide.

Reduced M2 Polarization in *Chrebp*-Deficient Macrophages

As the modulation of the redox status alters macrophage M2 polarization (Vats et al., 2006; Haschemi et al., 2012; Jais et al., 2014), we next investigated the relevance of ChREBP in this pathway. Nuclear translocation of ChREBP was increased by almost 2-fold after IL-4 stimulation in thioglycollate-elicited peritoneal macrophages (Figures S4A and S4B). A time-course experiment showed that ChREBP silencing partially prevented the initial increase in Arg1 and Mrc1 mRNA expression induced by IL-4 (Figures S4C and S4D). Interestingly, treatment of IL-4-stimulated ChREBP knockdown macrophages with the antioxidant glutathione restored Arg1, Mrc1, and Fizz1 mRNA expression to the level of control cells, suggesting that ChREBP acts at the interface between macrophage M1-M2 polarization by controlling the redox status of the cells and most likely "pre-programming" macrophage skewing (Figure S4E) (Jais et al., 2014). As autophagy controls the delivery of lipids to lysosomes for hydrolysis (Ouimet et al., 2011) and lysosomal lipolysis has recently emerged as critical for M2 activation (Huang et al., 2014), we next wondered whether the altered fatty acid homeostasis in macrophages after ChREBP knockdown could modulate this pathway. ChREBP silencing prevented the rise in autophagic flux induced by IL-4 as quantified by flow cytometry (Figure S4F). Moreover, inhibition of autophagy by 3-methyladenine (3-MA) reduced the polarization of M2 macrophages induced by IL-4 in control macrophages to the same extent as that in ChREBP knockdown macrophages, as measured by Arg1, Mrc1, and Fizz1 mRNA expression (Figure S4E). Together, these findings suggest that ChREBP controls autophagy-dependent M2 polarization by maintaining macrophage redox status and fatty acid production.

Increased Susceptibility of *Chrebp*-Deficient Macrophages to Cell Death Induced by LPS and Oxidized LDL-Dependent ROS Generation

To test whether the reduced redox state of macrophages after ChREBP silencing contributes to an increased susceptibility to oxidative stress-induced apoptosis, thioglycollate-elicited peritoneal macrophages were treated with 100 ng/ml LPS or 50 μg/ml oxidized LDL for 24 hr. As expected, flow cytometry analysis revealed that WT macrophages were alive 24 hr after treatment (Figures 4A and 4B), whereas ChREBP knockdown macrophages showed a dramatic 4-fold increase in macrophage death, reflected by late apoptosis or necrosis (i.e., AnnexinV+ PI+) (Figures 4A and 4B). While reduced cellular thiols were present in viable, apoptotic, and necrotic macrophages after ChREBP knockdown in all the treatment groups (Figure 4C), the increase in ROS formation was mainly attributable to cells undergoing apoptosis and necrosis (Figure 4D). Because LPS and oxidized LDL-induced ROS production can promote caspase-dependent cell death in macrophage foam cells (Yvan-Charvet et al., 2010a), and recent data have shown an intimate link between glucose metabolism and caspase activation in experimental model of apoptosis induced by staurosporine (Pradelli et al., 2014), we next measured caspase activity. Flow cytometry analysis of fluorescent label carboxyfluorescein (FAM) fluorescent-labeled inhibitor of caspases (FICA) revealed an increase in caspase activity in apoptotic and necrotic ChREBP knockdown macrophages upon LPS or oxidized LDL stimulation compared to controls (Figures 4E and 4F). The addition of glutathione or pharmacological inhibition of caspases by Z-VAD-FMK confirmed marked antiapoptotic effects in oxidized LDL-stimulated *Chrebp*-deficient macrophages (Figure 4G). Together, these findings reveal a role of ChrREBP in maintaining macrophage redox status to limit caspase-dependent death.

Accelerated Atherosclerosis in *Ldlr*$^{-/-}$ Mice Transplanted with *Chrebp*$^{-/-}$ BM

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease dominated by a phenotypic switch of macrophages (Hasty and Yvan-Charvet, 2013) and alteration of macrophage survival (Tabas, 2005; Van Vré et al., 2012). We wondered whether expression of ChREBP by macrophages might affect atherosclerosis development. To test this hypothesis, we transplanted BM cells from WT and *Chrebp*$^{-/-}$ mice into irradiated *Ldlr*$^{-/-}$ recipients, thereby generating *Ldlr*$^{-/-}$ mice with either *Chrebp*$^{-/-}$ or WT macrophages. Four weeks after transplantation, mice were challenged with a Western-type diet for 11 weeks. Freshly isolated resident peritoneal macrophages at the end of the experiment showed no detectable ChREBP mRNA expression. TNF-α expression was increased by 2.5-fold and that of MCP-1 by 1.6-fold (Figure 5A), similar to the enhanced TNF-α and MCP-1 mRNA expression observed in LPS-stimulated *Chrebp*$^{-/-}$ thioglycollate-elicited peritoneal macrophages isolated from chow-fed animals compared to controls (Figure S5). This confirmed the efficiency of the transplantation procedure. Lipoprotein and metabolic parameters were measured before the start of the diet and at the time of sacrifice. As shown in Table S2, the two groups of mice did not differ significantly with regards to body weight, fat mass, plasma leptin, glucose and triglyceride levels, or plasma LDL and HDL cholesterol. We also did not observe changes in blood leukocytes, lymphocytes or spleen weight in *Chrebp*$^{-/-}$ BM transplanted mice before the start or at the end of the experiment (Table S2). A role of ChREBP in mediating glycolysis-induced T cell activation (Macintyre et al., 2014) was also excluded in *Chrebp*$^{-/-}$ BM recipients, as a similar percentage of CD44^{hi}CD62L^{lo} peripheral CD4^{+} and CD8^{+} lymphocytes was observed at sacrifice (Figure S6). Nevertheless, *Ldlr*$^{-/-}$ mice receiving *Chrebp*$^{-/-}$ BM showed an ~1.7-fold increase in atherosclerosis development

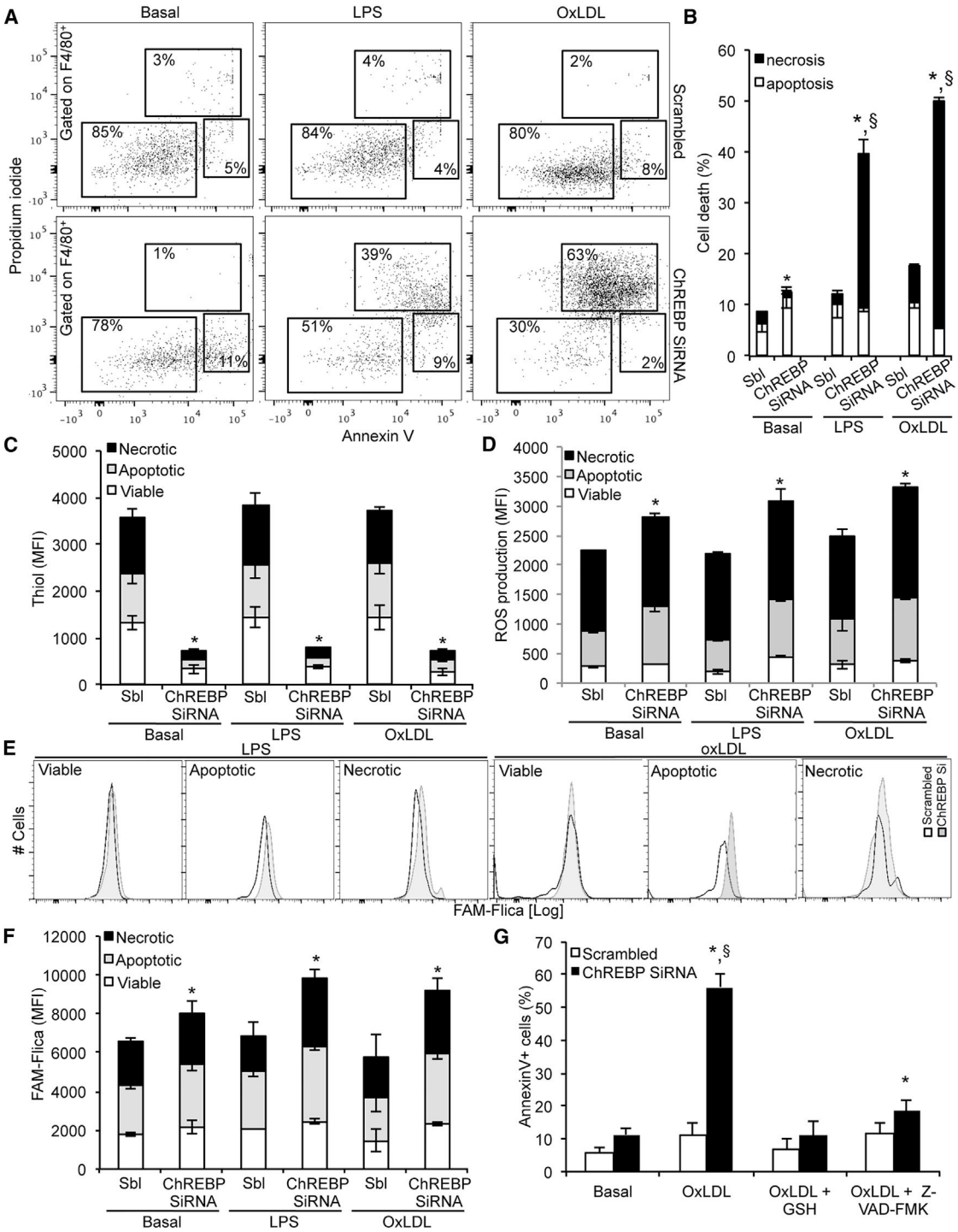


Figure 4. Enhanced Susceptibility to Cell Death in *Chrebp*-Deficient Macrophages Macrophages

(A and B) Representative FACS plots (A) and quantification of macrophage death (B) in thioglycollate-elicited peritoneal macrophages transfected with scrambled or ChREBP siRNA and treated with 100 ng/ml LPS or 50 μg/ml oxidized LDL (oxLDL) for 16 hr.

(C and D) Thiols (C) and ROS repartition (D) in necrotic, apoptotic, and viable cells.

(E and F) Representative histograms (E) and quantification (F) of caspase activation.

(G) Effect of GSH and Z-VAD-FMK caspase inhibitor on the percentage of Annexin V+ cells after 16-hr treatment with 50 μg/ml oxLDL.

Values are mean ± SEM. *p < 0.05 compared to control.

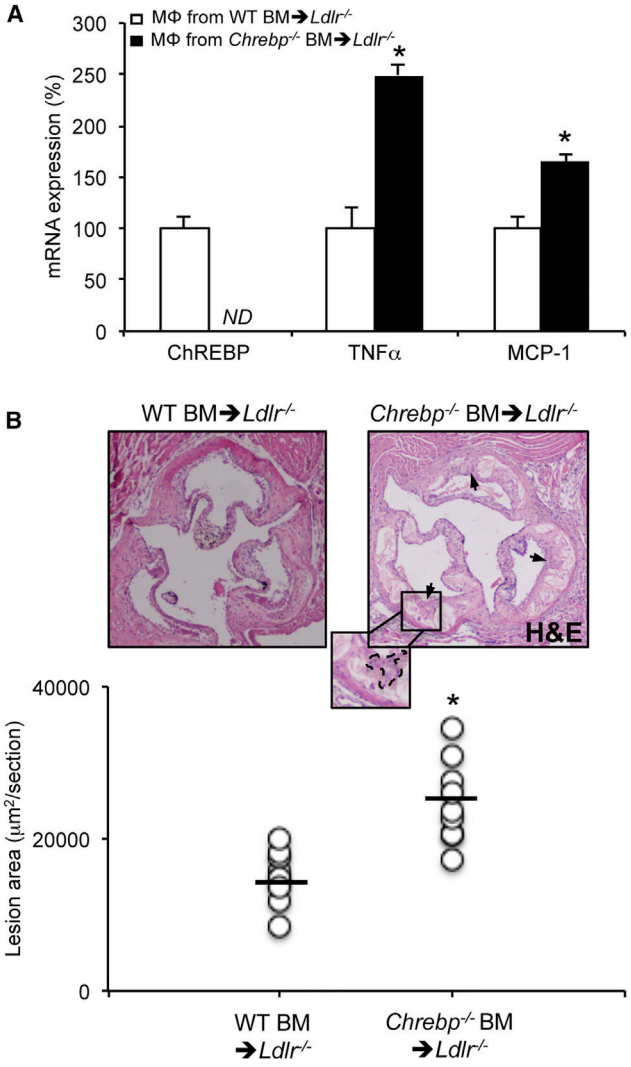


Figure 5. ChREBP Deficiency Promotes Accelerated Atherosclerosis
(A) mRNA levels in resident peritoneal macrophages isolated from high-fat diet (HFD)-fed *Ldlr*$^{-/-}$ recipient mice transplanted with WT or *Chrebp*$^{-/-}$ BM. (B) Representative H&E staining (magnification 100×, insert 200×) and quantification of atherosclerotic lesion development in the proximal aorta of HFD-fed *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with WT or *Chrebp*$^{-/-}$ BM (n = 10). Arrows and dashed lines depict inflammatory infiltrates.

in their proximal aortas and showed numerous inflammatory infiltrates compared to mice receiving WT BM, which developed only sparse foam cell-containing atherosclerotic lesions (Figure 5B).

Monocytosis in *Chrebp*$^{-/-}$ BM-Transplanted *Ldlr*$^{-/-}$ Mice Is Mediated through a Cell-Extrinsic Mechanism

Immunohistochemical staining of aortic root plaques confirmed a 2-fold increase in F4/80^{+} macrophages in *Chrebp*$^{-/-}$ BM-transplanted *Ldlr*$^{-/-}$ mice (Figure 6A). The increased plaque macrophage content in *Chrebp*$^{-/-}$ atheromata could reflect local inflammation or systemic monocytosis, which are known to contribute to atherosclerotic plaque progression in both mice and humans (Coller, 2005; Swirski et al., 2007; Tacke et al., 2007; Combadière et al., 2008). We observed a 2-fold increase in neutrophils and inflammatory blood Ly6C^{hi} monocyte subsets in *Chrebp*$^{-/-}$ BM-transplanted *Ldlr*$^{-/-}$ mice fed a high-fat diet (Figure 6B). We next undertook studies to elucidate the mechanisms underlying the peripheral inflammatory phenotype observed in these mice. Targeted gene expression profiling revealed that ChREBP was barely detectable in BM progenitors compared to macrophages (Figure S7A), even though ChREBP expression in these cells was much lower than in hepatocytes (Figure S7B). Gavage with a liver X receptor (LXR) agonist (TO-901317) that has been previously suggested to increase ChREBP expression in hepatocytes (Cha and Repa, 2007; Denechaud et al., 2008) did not modulate macrophage ChREBP expression (Figure S7A). ChREBP was also barely expressed in splenic dendritic cells or B and T lymphocytes compared to macrophages (Figure S7C). Taking advantage of a publically available gene expression dataset from Immgen (http://www.immgen.org), we observed that key enzymes of the PPP were predominantly expressed in cells derived from the macrophage lineage (Figure S7D), paralleling ChREBP expression. This further illustrated an important unrecognized role of this pathway in macrophages. Consistent with these findings, neither the Lin^{-}Sca1^{+}cKit^{+} (LSK) population, representing hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs), nor the granulocyte-monocyte progenitor (GMP) and common myeloid progenitor (CMP) populations were altered in the BM of mice transplanted with *Chrebp*$^{-/-}$ BM (Figure 6C). Nevertheless, monocyte counts were reduced in the BM of mice that had received *Chrebp*$^{-/-}$ BM, and this contrasted with the increase in Ly6C^{hi} monocytes observed in their spleen, most likely reflecting monocyte mobilization (Figures 2C and 2D). Measurement of various plasma factors known to promote BM hematopoietic cell mobilization did not reveal an alteration in growth factors such as GH, M-CSF or G-CSF (Figure S7E) or chemoattractant molecules such as MIP1α, MIP2, or KC (Figure S7F) in mice transplanted with *Chrebp*$^{-/-}$ BM. However, there was a significant 1.5-fold increase in levels of plasma MCP-1 and MCP-3, but not MCP-5, in these mice (Figure 6E). These chemokines have been previously been shown to be produced by macrophage foam cells (Westerterp et al., 2013) and to promote CCR2-dependent monocyte mobilization from the BM to the blood (Tsou et al., 2007). Thus, we wondered whether the monocytosis observed upon myeloid ChREBP deficiency could be dependent on systemic inflammation driven by macrophages. To directly test our hypothesis, we performed a competitive BM transplantation. *Ldlr*$^{-/-}$ mice were transplanted with a 1:1 mix of CD45.1 WT with either CD45.2 WT or CD45.2 *Chrebp*$^{-/-}$ BM. Mice were fed a high fat diet, and monocyte levels were assessed. In line with our previous observations, more CD45.2 Ly6C^{hi} monocytes were observed in mice containing *Chrebp*$^{-/-}$ cells (Figure 6F). Interestingly, the presence of CD45.2 *Chrebp*$^{-/-}$ BM, but not of CD45.2 WT BM, increased the number of CD45.1 WT peripheral monocytes, suggesting that monocyte mobilization in mice that had received *Chrebp*$^{-/-}$ BM was mediated by circulating factors (Figure 6F). Thus, the monocytosis in mice that had received *Chrebp*$^{-/-}$ BM was most likely secondary to the

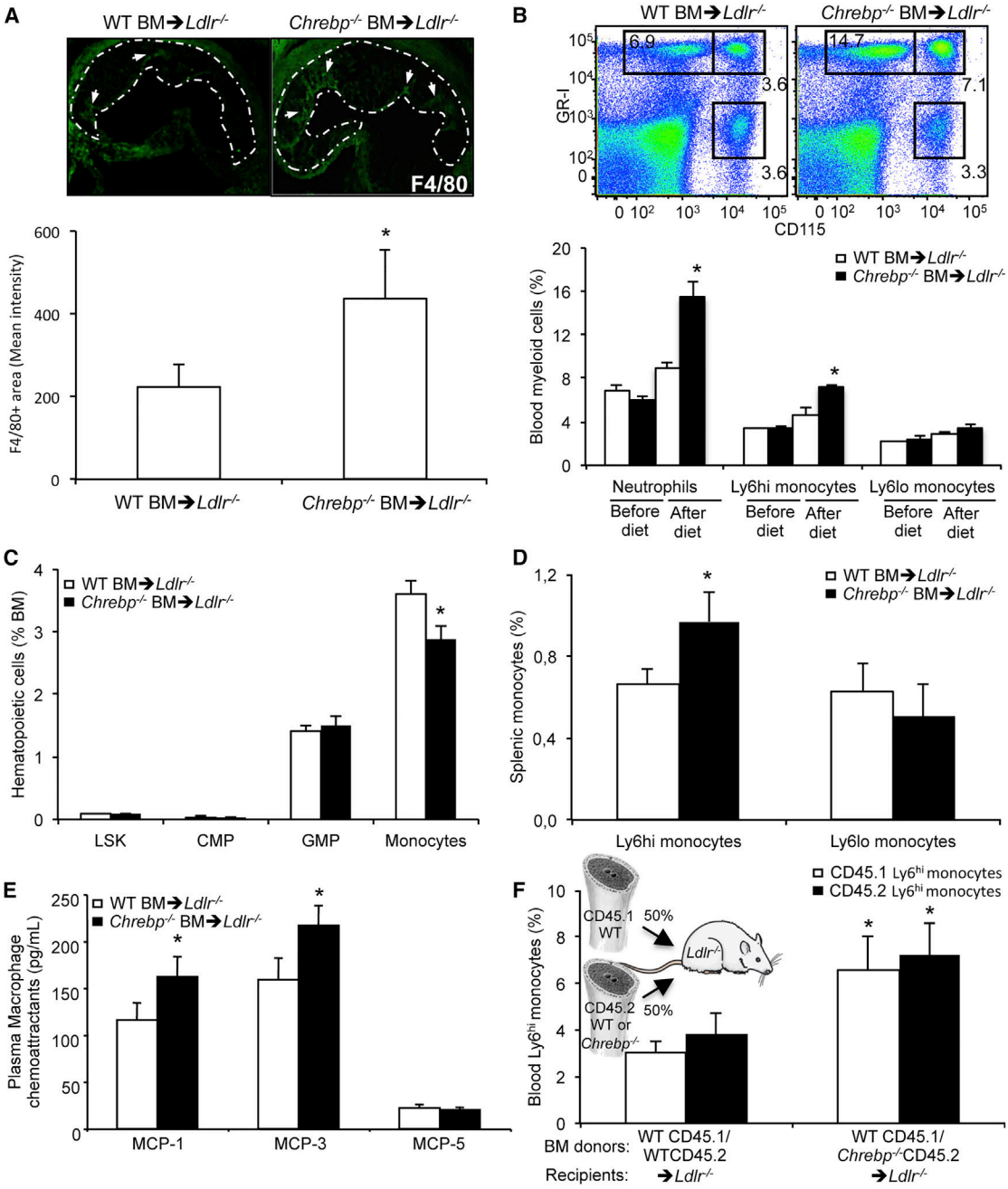


Figure 6. Increased Lesional Macrophages and Inflammatory Monocytes in Mice Transplanted with *Chrebp*$^{-/-}$ BM

(A) Representative pictures and quantification of F4/80+ macrophages in the proximal aorta (magnification ×100) of *Ldlr*$^{-/-}$ mice transplanted with WT or *Chrebp*$^{-/-}$ BM (n = 10).

(B) Representative FACS plots and quantification of peripheral blood myeloid cells.

(C–E) Quantification of BM HSPCs and monocytes (C), splenic monocytes (D), and plasma MCP-1, 3, and 5 levels (E) in these mice.

(F) Competitive BM transplantation of WT CD45.1^{+} BM equally mixed with either CD45.2^{+} WT BM or CD45.2^{+} *Chrebp*$^{-/-}$ BM and transplanted into *Ldlr*$^{-/-}$ recipient mice fed for 11 weeks on an HFD (n = 8). Circulating Ly6^{hi} monocytes were analyzed.

Values are mean ± SEM. *$p < 0.05$ compared to control.

increased plaque burden and associated systemic inflammation. Future studies using specific knockout of ChREBP in macrophages may help to decipher whether these cells are responsible for the MCP-1 and MCP-3-dependent monocytosis.

Increased Plaque Complexity in *Ldlr*$^{-/-}$ Mice Transplanted with *Chrebp*$^{-/-}$ BM

Histological characterization of atherosclerotic lesions revealed increased plaque complexity in mice that had received *Chrebp*$^{-/-}$

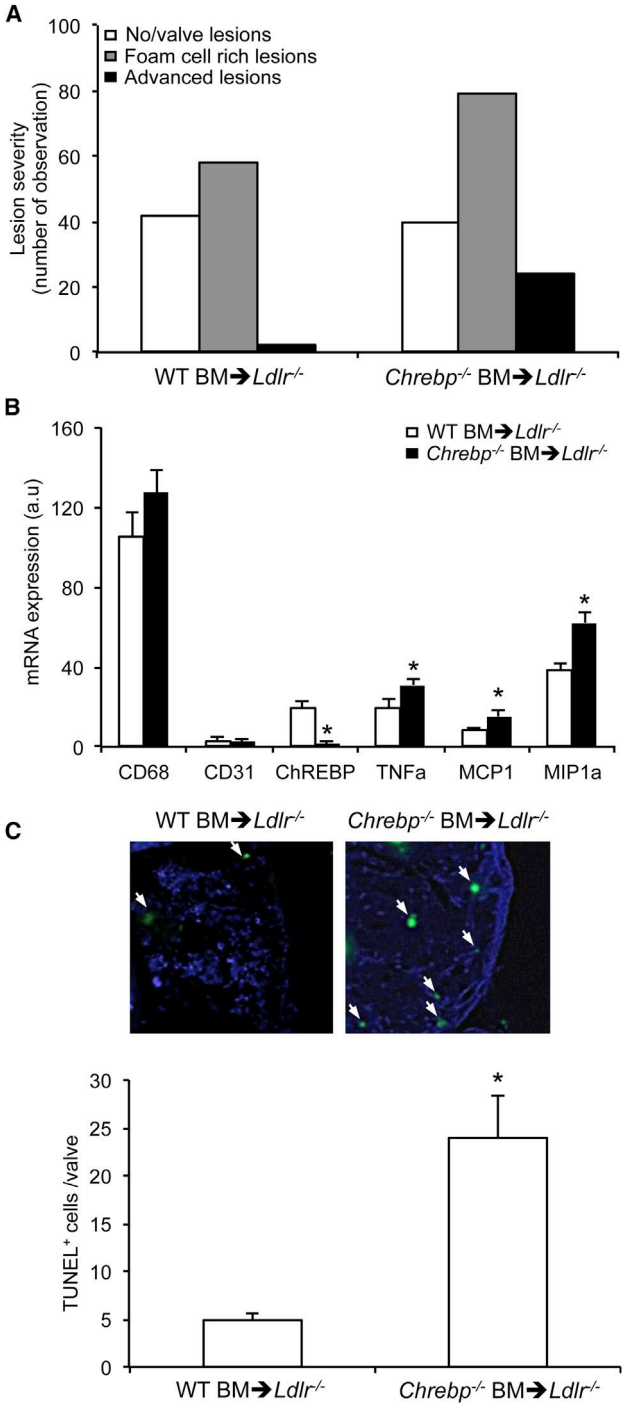


Figure 7. Increased Atherosclerotic Plaque Complexity in Mice Transplanted with *Chrebp*$^{-/-}$ BM

(A) Atherosclerotic lesion severity in the aortic root of HFD-fed *Ldlr*$^{-/-}$ recipient mice transplanted with WT or *Chrebp*$^{-/-}$ BM (n = 10).

(B) mRNA expression in lesional macrophages isolated by laser microcapture in these mice.

(C) Representative micrographs and quantification of TUNEL-positive signal (green; arrows) in nuclei (blue) of aortic root lesions from these mice (magnification ×500).

Results are mean ± SEM. *$p < 0.05$ compared to control.

BM, typified by a slight decrease in sections containing no lesions or valve lesions and a greater proportion of sections containing foam cell rich lesions and sections containing advanced, complex lesions characterized by compromised integrity of the media, necrotic core formation, and cholesterol clefts (expressed as the number of observations) (Figure 7A). Furthermore, *Chrebp*$^{-/-}$ lesional macrophages isolated by laser capture microscopy (LCM), which expressed CD68, but not the endothelial marker CD31, showed increased mRNA expression of inflammatory cytokines such as TNF-α, MCP-1, and MIP1α (Figure 7B). A trend toward reduced Arg1 and Mrc1 mRNA expression was also observed (data not shown). More strikingly, TUNEL staining revealed five times more apoptotic cells in mice receiving *Chrebp*$^{-/-}$ BM (Figure 7C), reflecting the pro-survival role of ChREBP in maintaining macrophage redox status. This correlated with an increased necrotic area in these mice (1,819 ± 284 versus 3,665 ± 466 μm^2/section in *Ldlr*$^{-/-}$ mice receiving WT or *Chrebp*$^{-/-}$ BM, respectively). Together, these data suggest that ChREBP-dependent metabolic reprogramming of lesional macrophages controls atherosclerosis plaque complexity.

DISCUSSION

Atherosclerotic plaques that cause clinical events, so-called vulnerable plaques, have a high macrophage content (Libby et al., 1996; Moore and Tabas, 2011) that correlates with enhanced ^{18}FDG incorporation visualized by PET-CT imaging (Rogers and Tawakol, 2011; Garcia-Garcia et al., 2014). However, the molecular mechanisms that link glucose utilization to inflammation in macrophages are poorly understood in the context of atherosclerosis. The present study reveals that ChREBP, a glucose sensor transcription factor, is expressed by macrophages and protects against macrophage inflammatory responses and apoptosis induced by pro-atherogenic stressors. Notably, our mechanistic studies have demonstrated that macrophages lacking ChREBP show a dramatic decrease in cellular glutathione content due to the loss of reducing energy supplied through the production of NADPH. This leads to increased ROS production and sustained NF-κB activation in response to LPS in macrophages after ChREBP knockdown, driving local and systemic inflammatory responses. Moreover, in response to oxidative stress-induced apoptosis, macrophages in which ChREBP was silenced were more prone to caspase dependent death, likely explaining the enhanced necrotic core formation in plaques of mice transplanted with *Chrebp*$^{-/-}$ BM. Together, our data establish a critical role for ChREBP in preventing macrophage inflammation and apoptosis in atherosclerosis and demonstrate the importance of immune metabolic flux in chronic inflammatory diseases.

When we initiated the present study, we hypothesized that ChREBP could be a sensor of the high glycolytic rate of inflammatory macrophages (Fukuzumi et al., 1996; Gamelli et al., 1996; Gautier et al., 2013; Nishizawa et al., 2014). This hypothesis was driven by observations showing that ChREBP can be regulated by glucose-derived metabolites in hepatocytes and the fact that liver pyruvate kinase (LPK) is a ChREBP target gene (Filhoulaud et al., 2013). Nevertheless, we first observed that ChREBP was downregulated upon LPS treatment. Basal

and LPS-stimulated ChREBP knockdown macrophages also exhibited higher glycolytic metabolites and enhanced expression of glycolytic enzymes such as Hk2 and PKM2. This suggested that macrophage PKM2, in contrast to hepatic LPK, was not a transcriptional target of ChREBP, most likely because neoglucogenesis is not present in macrophages and these cells do not require fine-tuning of phosphoenolpyruvate (PEP) conversion into pyruvate to avoid its recycling back to PEP for neoglucogenesis (Filhoulaud et al., 2013). The absence of such retro-control in macrophages could also explain the lower expression of ChREBP in these cells compared to hepatocytes. Interestingly, ChREBP is a regulator of malic enzyme (ME)-dependent pyruvate cycling in hepatocytes (Ma et al., 2006; Burgess et al., 2008) that reroutes TCA intermediates derived from pyruvate back to pyruvate and transfers reducing equivalents from NADH to NADP+ to generate NADPH (Lu et al., 2002). The regulation of this pathway appears to be fully conserved in macrophages, as reduced ME expression and activity paralleled a dramatic accumulation of malate in macrophages after ChREBP silencing and was associated with a reduced NADPH/NADP ratio. Alteration of this pathway could also contribute to the broken Krebs cycle recently observed in LPS-stimulated macrophages that could support the arginosuccinate shunt (Jha et al., 2015). There are two alternative metabolic pathways that could have contributed to the reduced NADPH/NADP ratio in these cells. While the reduction of glucose by AR is observed in humans (Vikramadithyan et al., 2005; Srivastava et al., 2009; Vedantham et al., 2011), we observed a decrease in the PGD-dependent nonoxidative phase of the PPP shunt that generates NADPH in macrophages lacking ChREBP, revealing a mechanism of regulation of NADPH production by ChREBP and illustrating the key role of this transcriptional factor in maintaining the redox status of macrophages.

By being a rheostat for cellular metabolism controlling cellular redox status, ChREBP orchestrates a complex response to external pro-atherogenic stressors that require a high energy demand, efficient anti-oxidant homeostasis, and lipid synthesis. Interestingly, the mechanism underlying the increased LPS-dependent inflammatory responses and LPS- and oxidized-LDL-dependent death in macrophages lacking ChREBP was found to be an amplified burst of oxidative stress secondary to a broken TCA cycle and glutathione depletion, which is known to be regenerated in an NADPH-dependent fashion. At the molecular level, the enhanced NF-κB activity in macrophages with ChREBP silencing could be linked to ROS sensitivity (Morgan and Liu, 2011), and ROS generation could also act as a first "hit" signal, pre-polarizing macrophages prior activation (Jais et al., 2014) or sustaining JNK activation (Kamata et al., 2005; Dhanasekaran and Reddy, 2008), altering the balance of life and death in response to Toll-like receptor signaling in macrophages (Yvan-Charvet et al., 2010a; Moore and Tabas, 2011). Glutathione depletion in macrophages has been previously associated with atherosclerotic lesion formation in the setting of AR overexpression (Vikramadithyan et al., 2005; Srivastava et al., 2009; Vedantham et al., 2011). We now show that a similar mechanism can be controlled by ChREBP-dependent NADPH-glutathione regulation. Another interesting observation was that ChREBP controls autophagy-dependent macrophage M2 polarization, which could be the consequence of an altered oxidative metabolism-dependent pre-programming of these cells toward an M2-like phenotype (Jais et al., 2014) or an impaired fatty acid synthesis limiting substrate availability for lysosomal lipolysis (Huang et al., 2014). Future studies should help to clarify this point and determine whether this mechanism contributes to the accelerated atherosclerosis in mice transplanted with *Chrebp*$^{-/-}$ BM (Liao et al., 2012). Together, our studies extend the importance of immune metabolic flux beyond macrophage inflammation in atherosclerosis by proposing that (1) ChREBP could represent a functional metabolic shift between M1 and M2 macrophage polarization in atherosclerosis and (2) ChREBP could play a pivotal pro-survival role in macrophages, with major implications for plaque necrosis and stability (Libby et al., 1996; Moore and Tabas, 2011).

The role of macrophages in controlling hematopoietic and myeloid cell mobilization from the BM to the spleen for extramedullary hematopoiesis has recently emerged. This function represents an important pro-atherogenic mechanism that contributes to the pool of circulating Ly6C^{hi} monocytes that infiltrate atherosclerotic plaques (Tall and Yvan-Charvet, 2015). Interestingly, the increased plaque burden driven by an alteration in macrophage behavior in mice transplanted with *Chrebp*$^{-/-}$ BM was associated with systemic inflammation dominated by an increase in circulating inflammatory Ly6^{hi} monocytes. A competitive BM transplantation experiment suggested that this phenotype was driven by extrinsic factors such as MCP-1 and MCP-3 that were increased in the plasma and atherosclerotic plaques of mice transplanted with *Chrebp*$^{-/-}$ BM. These factors could mediate the emigration of monocytes out of the BM and their recruitment to inflammatory atherosclerotic plaques (Tsou et al., 2007; Tacke et al., 2007; Swirski et al., 2007; Combadière et al., 2008; Westerterp et al., 2013). Thus, this study provides evidence of an additional antiatherogenic effect of ChREBP in macrophages, acting as a positive feedback loop to control monocytosis.

Together, these data demonstrate an unexpected role of ChREBP in preventing macrophage inflammation and apoptosis and indicate that activation of the ChREBP pathway may be a potential therapeutic target to prevent the formation of complex dangerous atheromata. In particular, it would be interesting to determine whether such a therapeutic approach could have additive value in the context of NASH, in which hepatic activation of ChREBP may also protect against insulin resistance (Filhoulaud et al., 2013).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials and additional methods are available in Supplemental Experimental Procedures.

Mice

Chrebp$^{-/-}$ mice (B6.129S6-Mlxipltm1Kuy/J) that have been crossed to C57BL/6J for 25 generations were obtained from The Jackson Laboratory. Animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Columbia University or were undertaken according to the Guidelines for Care and Use of Experimental Animals in France. Animals had free access to food and water and were housed in a controlled environment with a 12-hr light-dark cycle and constant temperature (22°C).

BM Transplantation

BM transplantation was performed as previously described (Yvan-Charvet et al., 2010b) using BM from WT and *Chrebp*$^{-/-}$ littermates. Briefly, the atherosclerosis studies were conducted in 10-week-old female *Ldlr*$^{-/-}$ mice fed a Western-type diet (TD88137) from Harlan Teklad for 11 weeks. Mice were allowed to recover for 4 weeks after irradiation and BM transplantation before diet studies were initiated. Body weight was recorded at indicated time points. Mice were euthanized in accordance with the American Veterinary Association Panel of Euthanasia. Spleen and epididymal adipose tissue weights were determined at the time of sacrifice.

Histological Analysis of Proximal Aortas

Mice were sacrificed and heart was harvested. Heart was washed with PBS then fixed with 4% paraformaldehyde. Heart was embedded in paraffin, and 5-μm sections of proximal aortas were performed using a Microm HM340E microtome (Microm Microtech) and stained with H&E. Aortic lesion size of each animal was calculated as the mean of lesion areas in six sections from the same mouse using ImageJ software calibrated with parameters of the Leica DM5500 B (Leica Microsystemes SAS) microscope. Atherosclerotic lesions were expressed in μm^2 per section.

Macrophages Harvesting and Culture

WT mice were injected intraperitoneally with 3% thioglycolate to recruit macrophages as previously described (Gautier et al., 2013). Briefly, after 3 days, mice were sacrificed and peritoneal macrophages were harvested by a PBS (Life Technologies) wash of the intraperitoneal cavity. Cells were filtered on a 42-μM cell strainer (VWR). Macrophages were cultured in DMEM 10% fetal bovine serum 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies).

Statistical Analysis

Data are shown as mean ± SEM. Statistical significance was performed using Prism t test or ANOVA were performed according to the dataset. Results were considered as statistically significant when $p < 0.05$.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information includes Supplemental Experimental Procedures, seven figures, and two tables and can be found with this article online at http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.068.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Fréderic Labret for assistance with flow cytometry. This work was supported by grants to L.Y.-C. from INSERM ATIP-AVENIR, the Fondation de France (201300038585), and Agence Nationale de la Recherche (ANR). The authors had full access to and take responsibility for the integrity of the data. All authors have read and agree to the manuscript as written.

Received: November 21, 2014
Revised: July 20, 2015
Accepted: August 23, 2015
Published: September 24, 2015

REFERENCES

Burgess, S.C., Iizuka, K., Jeoung, N.H., Harris, R.A., Kashiwaya, Y., Veech, R.L., Kitazume, T., and Uyeda, K. (2008). Carbohydrate-response element-binding protein deletion alters substrate utilization producing an energy-deficient liver. J. Biol. Chem. *283*, 1670–1678.

Cha, J.Y., and Repa, J.J. (2007). The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. J. Biol. Chem. *282*, 743–751.

Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2011). Macrophage polarization in metabolic disorders: functions and regulation. Curr. Opin. Lipidol. *22*, 365–372.

Coller, B.S. (2005). Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *25*, 658–670.

Combadière, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2008). Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. Circulation *117*, 1649–1657.

Denechaud, P.D., Bossard, P., Lobaccaro, J.M., Millatt, L., Staels, B., Girard, J., and Postic, C. (2008). ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. J. Clin. Invest. *118*, 956–964.

Dentin, R., Tomas-Cobos, L., Foufelle, F., Leopold, J., Girard, J., Postic, C., and Ferré, P. (2012). Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. J. Hepatol. *56*, 199–209.

Dhanasekaran, D.N., and Reddy, E.P. (2008). JNK signaling in apoptosis. Oncogene *27*, 6245–6251.

Filhoulaud, G., Guilmeau, S., Dentin, R., Girard, J., and Postic, C. (2013). Novel insights into ChREBP regulation and function. Trends Endocrinol. Metab. *24*, 257–268.

Fukuzumi, M., Shinomiya, H., Shimizu, Y., Ohishi, K., and Utsumi, S. (1996). Endotoxin-induced enhancement of glucose influx into murine peritoneal macrophages via GLUT1. Infect. Immun. *64*, 108–112.

Gamelli, R.L., Liu, H., He, L.K., and Hofmann, C.A. (1996). Augmentations of glucose uptake and glucose transporter-1 in macrophages following thermal injury and sepsis in mice. J. Leukoc. Biol. *59*, 639–647.

Garcia-Garcia, H.M., Jang, I.-K., Serruys, P.W., Kovacic, J.C., Narula, J., and Fayad, Z.A. (2014). Imaging plaques to predict and better manage patients with acute coronary events. Circ. Res. *114*, 1904–1917.

Gautier, E.L., Westerterp, M., Bhagwat, N., Cremers, S., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Lütjohann, D., Randolph, G.J., Levine, R.L., Tall, A.R., and Yvan-Charvet, L. (2013). HDL and Glut1 inhibition reverse a hypermetabolic state in mouse models of myeloproliferative disorders. J. Exp. Med. *210*, 339–353.

Hansson, G.K., Robertson, A.K.L., and Söderberg-Nauclér, C. (2006). Inflammation and atherosclerosis. Annu. Rev. Pathol. *1*, 297–329.

Haschemi, A., Kosma, P., Gille, L., Evans, C.R., Burant, C.F., Starkl, P., Knapp, B., Haas, R., Schmid, J.A., Jandl, C., et al. (2012). The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. Cell Metab. *15*, 813–826.

Hasty, A.H., and Yvan-Charvet, L. (2013). Liver X receptor α-dependent iron handling in M2 macrophages: The missing link between cholesterol and intraplaque hemorrhage? Circ. Res. *113*, 1182–1185.

Huang, S.C.C., Everts, B., Ivanova, Y., O'Sullivan, D., Nascimento, M., Smith, A.M., Beatty, W., Love-Gregory, L., Lam, W.Y., O'Neill, C.M., et al. (2014). Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. Nat. Immunol. *15*, 846–855.

Jais, A., Einwallner, E., Sharif, O., Gossens, K., Lu, T.T., Soyal, S.M., Medgyesi, D., Neureiter, D., Paier-Pourani, J., Dalgaard, K., et al. (2014). Heme oxygenase-1 drives metaflammation and insulin resistance in mouse and man. Cell *158*, 25–40.

Jha, A.K., Huang, S.C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., Chmielewski, K., Stewart, K.M., Ashall, J., Everts, B., et al. (2015). Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. Immunity *42*, 419–430.

Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., and Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. Cell *120*, 649–661.

Kolodgie, F.D., Virmani, R., Burke, A.P., Farb, A., Weber, D.K., Kutys, R., Finn, A.V., and Gold, H.K. (2004). Pathologic assessment of the vulnerable human coronary plaque. Heart *90*, 1385–1391.

Liao, X., Sluimer, J.C., Wang, Y., Subramanian, M., Brown, K., Pattison, J.S., Robbins, J., Martinez, J., and Tabas, I. (2012). Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis. Cell Metab. *15*, 545–553.

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.

Lu, D., Mulder, H., Zhao, P., Burgess, S.C., Jensen, M.V., Kamzolova, S., Newgard, C.B., and Sherry, A.D. (2002). 13C NMR isotopomer analysis reveals a connection between pyruvate cycling and glucose-stimulated insulin secretion (GSIS). Proc. Natl. Acad. Sci. USA *99*, 2708–2713.

Ma, L., Robinson, L.N., and Towle, H.C. (2006). ChREBP*Mlx is the principal mediator of glucose-induced gene expression in the liver. J. Biol. Chem. *281*, 28721–28730.

Macintyre, A.N., Gerriets, V.A., Nichols, A.G., Michalek, R.D., Rudolph, M.C., Deoliveira, D., Anderson, S.M., Abel, E.D., Chen, B.J., Hale, L.P., and Rathmell, J.C. (2014). The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effectyor function. Cell Metab. *20*, 61–72.

Moore, K.J., and Tabas, I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. Cell *145*, 341–355.

Morgan, M.J., and Liu, Z.G. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. Cell Res. *21*, 103–115.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat. Rev. Immunol. *8*, 958–969.

Nishizawa, T., Kanter, J.E., Kramer, F., Barnhart, S., Shen, X., Vivekanandan-Giri, A., Wall, V.Z., Kowitz, J., Devaraj, S., O'Brien, K.D., et al. (2014). Testing the role of myeloid cell glucose flux in inflammation and atherosclerosis. Cell Rep. *7*, 356–365.

O'Neill, L.A.J., and Hardie, D.G. (2013). Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. Nature *493*, 346–355.

Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I., and Marcel, Y.L. (2011). Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. Cell Metab. *13*, 655–667.

Pradelli, L.A., Villa, E., Zunino, B., Marchetti, S., and Ricci, J.E. (2014). Glucose metabolism is inhibited by caspases upon the induction of apoptosis. Cell Death Dis. *5*, e1406.

Randolph, G.J. (2014). Mechanisms that regulate macrophage burden in atherosclerosis. Circ. Res. *114*, 1757–1771.

Rogers, I.S., and Tawakol, A. (2011). Imaging of coronary inflammation with FDG-PET: feasibility and clinical hurdles. Curr. Cardiol. Rep. *13*, 138–144.

Ross, R. (1999). Atherosclerosis–an inflammatory disease. N. Engl. J. Med. *340*, 115–126.

Srivastava, S., Vladykovskaya, E., Barski, O.A., Spite, M., Kaiserova, K., Petrash, J.M., Chung, S.S., Hunt, G., Dawn, B., and Bhatnagar, A. (2009). Aldose reductase protects against early atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-null mice. Circ. Res. *105*, 793–802.

Swirski, F.K., and Nahrendorf, M. (2013). Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. Science *339*, 161–166.

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 monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. J. Clin. Invest. *117*, 195–205.

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.

Tacke, F., Alvarez, D., Kaplan, T.J., Jakubzick, C., Spanbroek, R., Llodra, J., Garin, A., Liu, J., Mack, M., van Rooijen, N., et al. (2007). Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. J. Clin. Invest. *117*, 185–194.

Tall, A.R., and Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. Nat Immunol Rev *15*, 104–116.

Tannahill, G.M., Curtis, A.M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E.M., McGettrick, A.F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N.J., Kelly, B., Foley, N.H., et al. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1β through HIF-1α. Nature *496*, 238–242.

Tsou, C.L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A.M., Weisberg, S.P., Mack, M., and Charo, I.F. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. J. Clin. Invest. *117*, 902–909.

Van Vré, E.A., Ait-Oufella, H., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2012). Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *32*, 887–893.

Vats, D., Mukundan, L., Odegaard, J.I., Zhang, L., Smith, K.L., Morel, C.R., Wagner, R.A., Greaves, D.R., Murray, P.J., and Chawla, A. (2006). Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. Cell Metab. *4*, 13–24.

Vedantham, S., Noh, H., Ananthakrishnan, R., Son, N., Hallam, K., Hu, Y., Yu, S., Shen, X., Rosario, R., Lu, Y., et al. (2011). Human aldose reductase expression accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-/- mice. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *31*, 1805–1813.

Vikramadithyan, R.K., Hu, Y., Noh, H.L., Liang, C.P., Hallam, K., Tall, A.R., Ramasamy, R., and Goldberg, I.J. (2005). Human aldose reductase expression accelerates diabetic atherosclerosis in transgenic mice. J. Clin. Invest. *115*, 2434–2443.

Westerterp, M., Murphy, A.J., Wang, M., Pagler, T.A., Vengrenyuk, Y., Kappus, M.S., Gorman, D.J., Nagareddy, P.R., Zhu, X., Abramowicz, S., et al. (2013). Deficiency of ATP-binding cassette transporters A1 and G1 in macrophages increases inflammation and accelerates atherosclerosis in mice. Circ. Res. *112*, 1456–1465.

Yvan-Charvet, L., Pagler, T.A., Seimon, T.A., Thorp, E., Welch, C.L., Witztum, J.L., Tabas, I., and Tall, A.R. (2010a). ABCA1 and ABCG1 protect against oxidative stress-induced macrophage apoptosis during efferocytosis. Circ. Res. *106*, 1861–1869.

Yvan-Charvet, L., Pagler, T., Gautier, E.L., Avagyan, S., Siry, R.L., Han, S., Welch, C.L., Wang, N., Randolph, G.J., Snoeck, H.W., and Tall, A.R. (2010b). ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. Science *328*, 1689–1693.

Zernecke, A., and Weber, C. (2014). Chemokines in atherosclerosis: proceedings resumed. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *34*, 742–750.

Discussion

Comme nous avons pu le démontrer tout au long de cette thèse, l'inflammation chronique ou également appelé 'stérile' est à l'origine de nombreuses pathologies, notamment l'athérosclérose. Nous avons focalisé nos études sur l'identification des voies métaboliques contrôlant la production et clairance des cellules myéloïdes dans un contexte inflammatoire liée à une hypercholestérolémie (modèles d'athérosclérose) ou à un syndrome myéloprolifératif (modèle de leucémie). Nous avons résumé l'ensemble de ces résultats sous forme d'une figure récapitulative (Figure 19).

I. Résumé et perspectives sur les voies métaboliques contrôlant la myélopoïèse dans un contexte d'hypercholestérolémie.

Comme discuté lors de cette thèse, les patients atteints de maladies cardiovasculaires présentent une augmentation de l'activité métabolique de leur système hématopoïétique, caractérisé par une augmentation d'incorporation de 18F-fluorodeoxyglucose, un analogue du glucose, au niveau de la moelle osseuse et de la rate (Emami et al., 2015). Sachant que les monocytes sont maintenant reconnus comme un facteur de risque des maladies cardiovasculaires à part entière et d'une manière indépendante des autres facteurs de risques traditionnels (i.e, hypercholestérolemie, hypertension, tabagisme, etc…), il semblait donc important de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents.

Notre première étude s'est donc intéressée au rôle du transporteur Glut-1, qui est le transporteur de glucose majoritaire au niveau du système hématopoïétique (Oburoglu et al., 2014) (Manel et al., 2003) dans des modèles précliniques d'athérosclérose induite par une hypercholestérolémie. Nous nous sommes ainsi focalisé sur le rôle de l'hypercholestérolémie dans la production de monocytes. Ces travaux sont une suite logique des travaux précédents de l'équipe et d'autres groupes qui ont mis en évidence qu'une accumulation de cholestérol dans les cellules myéloïdes conduit non seulement à leur prolifération accrue mais également à un engagement vers la lignée myéloïde (Yvan-Charvet et al., 2010) (Murphy et al., 2011). D'une manière intéressante, lors de ce travail, le groupe de Naomi Taylor a pu mettre en évidence que des effets similaires d'engagement vers la lignée myéloïde pouvaient être induits par une augmentation de la voie de la glycolyse au niveau des CSH (Oburoglu et al., 2014). Cela suggère qu'une adaptation métabolique plus générale est nécessaire au devenir des CSH. Sachant que notre groupe avait pu montrer une augmentation de Glut-1 au niveau des CSH dans des modèles d'hypercholestérolémie (Gautier et al., 2013), il semblait donc important de tester la coopération des voies du métabolisme du cholestérol et du glucose dans la production des monocytes. Nous avons

ainsi démontré que la déficience partielle en Glut-1 dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) contrecarrait l'effet d'une hypercholestérolémie sur l'induction de leur prolifération et leur engagement vers la myélopoïese. Cela a pour conséquence une réduction de la monocytose et du développement des plaques d'athérosclérose qui lui est associé (Sarrazy et al., 2016). Ces résultats permettent de généraliser l'importance d'une modification du métabolisme du glucose dans la régulation de la prolifération et du devenir des CSH, en particulier dans conditions inflammatoires induite par une hypercholestérolémie. Au niveau mécanistique, nous avons aussi démontré que la décarboxylation oxydative du pyruvate et l'activation de la navette malate-aspartate étaient essentielles à l'expansion des cellules souches et à leur différenciation vers le compartiment myéloïde (Sarrazy et al., 2016). De manière inattendue, le rôle de HIF-1α dans des conditions pro-athérogéniques n'impactait ni l'expression de Glut-1 dans les CSH ni leur devenir. En effet, la déficience en HIF-1α dans les CSH avait précédemment été montrée pour participer à leur capacité de différenciation vers le compartiment myéloïde (Parathath et al., 2013). Il se peut donc, qu'en condition d'hypercholestérolémie, les voies d'hypoxie ne soient pas prépondérantes au niveau de la moelle osseuse pour contrôler le métabolisme glucidique des CSH et leur devenir. Dans ce sens, nous avons confirmé des travaux antérieurs montrant que la voie de signalisation de l'hormone de croissance interleukin-3 (IL-3) pouvait contrôler directement l'expression de Glut-1 (Flier et al., 1987). En effet, les travaux précédents de l'équipe avaient pu mettre en évidence qu'une accumulation de cholestérol au niveau des CSH conduisait à une stabilisation de la sous unité β des récepteurs à l'IL-3 (Yvan-Charvet et al., 2010) (Hansson and Björkholm, 2010). Une explication alternative pourrait être que les CSH ne doivent pas être considérées comme une population homogène de cellules. En effet, parmi les CSH, on retrouve des LT-HSC et les ST-HSC, que nous avons précédemment défini dans l'introduction, et qui ont des propriétés très distinctes, en particulier en terme de besoin énergétique, pour maintenir leur fonction de quiescence, prolifération ou différentiation (Ema et al., 2014). Avec l'émergence des techniques d'isolation unique de cellules ('single-cell'), le profilage très fin des populations cellulaires hétérogènes pourrait être effectué. En effet, ce domaine est en pleine expansion et pourrait permettre de raffiner différentes hypothèse de travail actuelles.

En particulier, le travail réalisé par l'équipe d'Emmanuelle Passégué a récemment démontre que les MPPs (Multipotent Progenitors) adoptent plusieurs profils (Pietras et al., 2015). En effet, les MPPs se divisent en différentes sous-classes, des MPP2 au MPP4 qui ne possèdent pas les mêmes capacités de différenciation. Ils démontrent ainsi que les MPP3 sont ceux qui sont les plus aptes à s'engager dans la différenciation myéloïde. De manière intéressante, les MPP2 expriment fortement Glut-1, ce qui n'est pas le cas des MMP3. Il

apparaît alors que cibler Glut-1 touche plus favorablement les MMP3 et permettre un traitement ciblé de leur prolifération et leur devenir.

En terme de perspectives cliniques, il a récemment été montré qu'une diminution des taux de glucose plasmatique chez des patients diabétiques grâce à des inhibiteurs du transporteur SGLT2, permettant la réabsorption du glucose rénal, améliorait leur pronostique cardiovasculaire (Zinman et al., 2015) (Neal et al., 2017). Cependant les mécanismes cardioprotecteurs sous-jacents n'ont pas encore été identifiés. Lors du dernier congrès de la société francophone du diabète (SFD), des résultats non publiés suggèrent qu'une partie des effets bénéfiques pourrait être liée à un changement du nombre et de la fonction de l'hématocrite, impliquant qu'une normalisation de l'hyperglycémie pourrait permettre d'améliorer le système hématopoïétique chez ces patients. Il sera important de suivre l'évolution de ces données pour les remettre en contexte de nos résultats. En particulier, quel serait l'impact d'inhibiteur de Glut1 chez ces patients ?

II. Résumé et perspectives sur les voies d'efflux du cholestérol contrôlant la myélopoïèse dans un contexte de syndrome myéloprolifératif.

Dans une continuité des travaux de l'équipe, nous avons également identifié en collaboration avec le Pr. Ross Levine (Sloan Kettering, NY), 5 nouvelles mutations du transporteur ABCA1 dans des patients atteints de CMML (voir introduction projet 3). Bien que ce travail soit toujours en cours de finalisation, nous avons déjà pu montrer que ces mutations sont des mutations « perte de fonction » du transporteur ABCA1 et sont capables d'induire une prolifération accrue de lignées monocytaires. Cela suggère que ces mutations participent à la mise en place d'un phénotype myeloprolifératif. Chez la souris, nous avons mis en place un modèle de sur-expression des mutations d'ABCA1 dans la moelle osseuse à partir d'un protocole d'infection par lentivirus et transplantation de ces moelles dans des souris receveuses. Bien que le phénotype de ces souris sous un fond WT soit modeste, nous avons pu mettre en évidence une coopération de ces mutations avec la déficience en Tet2, conduisant à un phénotype myéloprolifératif accru, caractérisé par une splénomégalie corrélée à une augmentation du pourcentage de cellules myéloïdes spléniques. Ces résultats valident l'importance des voies d'efflux du cholestérol et en particulier des mutations d'ABCA1 dans la mise en place d'un phénotype myeloprolifératif.

L'analyse de nouvelles expériences est en court et devrait nous permettre de comprendre les mécanismes sous-jacents (i.e, voie de signalisation, voies métaboliques, réponse mitochondriale, etc…). En attendant, il est important de noter qu'au vue des

résultats préliminaires que j'ai présenté chez la souris, ces mutations du gènes ABCA1 semblent synergiques avec d'autres mutations plutôt qu'initiateur de la pathologie. Comme récemment décrit, la CMML est un cancer où la coopération entre les mutations semble jouer un rôle essentiel (Itzykson et al., 2017). Au vu de ces résultats, il semblerait également important de valider la découverte de ces mutations dans d'autres cohortes. Nous en avons déjà discuté avec le Pr. Eric Solary, qui possède une large cohorte à l'institut Gustave Roussy à Paris.

III. Résumé et perspectives sur la gestion du cholestérol des macrophages pendant l'efferocytose contrôlant la réponse inflammatoire.

Dans un troisième temps, nous nous sommes intéressé à la clairance des cellules apoptotiques par les macrophages (i.e. efferocytose) et au rôle de l'enzyme LIPA dans ce processus. En effet des travaux antérieurs de différentes équipes, dont la notre, ont mis en évidence que lors de la clairance des cellules apoptotiques, les macrophages sont confrontés à une large quantité de cholestérol (Gerbod-Giannone et al., 2006) qui peut être toxique pour la cellule si elle n'est pas gérée. Ainsi, elle participe à la mise en place d'une réponse inflammatoire (Li et al., 2006) et d'une induction secondaire de la myélopoïèse (Westerterp et al., 2012). Au niveau mécanistique, l'efferocyte ingérant une grande quantité de cholestérol va mettre en place une activation des récepteurs nucléaires LXR, sensibles à la quantité de cholestérol permettant ainsi l'induction des voies d'efflux (Yvan-Charvet et al., 2008). En parallèle, cela permet la mise en place d'un programme transcriptionnel permettant l'induction des récepteurs impliqués dans la clairance des cellules apoptotiques tels que MertK (A-Gonzalez et al., 2009). Nous nous sommes intéressé à LIPA pour 3 raisons : 1) des études d'association pangénomique (GWAS) ont identifiées des variations génétiques du gène LIPA associées aux maladies cardiovasculaires (Wild et al., 2011) (Morris et al., 2017), 2) LIPA est principalement exprimé dans les macrophages au sein du système hématopoïétique, selon le consortium Immgen et 3) des travaux suggéraient que LIPA contrôlait l'efflux de cholestérol (Ouimet et al., 2011).

Nous avons démontré que l'enzyme LIPA se place au cœur de la réponse efferocytique des macrophages afin de maintenir de l'intégrité des tissus et de réguler l'inflammation. Plus précisément, nous avons démontré que LIPA en hydrolysant les esters de cholestérol en cholestérol libre permettait la mobilisation intracellulaire du cholestérol. Ce dernier va pouvoir être oxydé en 25-hydroxycholestérol et 27-hydroxycholestérol (25- et 27-OHC). Ces dérivés du cholestérol sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires. En particulier, ce sont les agonistes du LXR ce qui permet d'activer les voies d'efflux du

cholestérol en stimulant l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1, et l'expression du récepteur MerTK, récepteur clé dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques. Lorsque LIPA est inhibée, la production des 25- et 27-OHC est diminuée ayant pour conséquence un défaut d'activation des LXR et donc des capacités d'efflux du cholestérol et de la reconnaissance des cellules apoptotiques. *In vitro*, nous avons aussi démontré un défaut de la réorganisation du cytosquelette et en particulier de la localisation de la protéine Rac-1 au niveau de la coupe phagocytaire, ce qui participe au défaut d'efferocytose. *In vivo*, chez la souris, l'inhibition de LIPA réduit les capacités efferocytiques des macrophages résidents de la rate et du foie. Cela provoque une splénomégalie et une accumulation de fer dans la rate. Ces résultats démontrent l'importance de l'hydrolyse lysosomale du cholestérol dans les macrophages pour le maintien de l'intégrité tissulaire et la résolution de l'inflammation, aussi bien en conditions pathologiques que physiologiques. Il serait intéressant dans une continuité logique de faire le lien entre ce défaut d'efferocytose et le développement de la plaque d'athérome précédent observé chez les souris déficientes en LIPA (Du and Grabowski, 2004). En effet, le groupe de Philippe Lesnik a fait parti des premier a montré l'importance de la mort cellulaire dans la mise en place des lésions athéromateuses (Gautier et al., 2009). Cela a contribué, par la suite, à changer certaines visions de la mise en place de la pathologie (Van Vré et al., 2012) (Hansson et al., 2015). Nous avons récemment généré des souris transgéniques sur-exprimant LIPA au niveau des macrophages. Bien que je n'aie pas eu le temps d'utiliser ce modèle, des travaux futurs dans l'équipe devraient permettre d'adresser ces questions d'un point vue thérapeutique grâce à ce modèle.

En parallèle du rôle des 25- et 27-OHC dans l'activation des LXR, nous avons démontré que le 25-OHC est impliqué dans le contact entre les membranes mitochondriales avec les membranes du réticulum endoplasmique, processus qui s'appelle membranes associées à la mitochondrie ou MAM, ce qui modifie le flux calcique et altère le métabolisme mitochondrial, notamment cela induit une augmentation de la production des ROS. Cela induit aussi une activation de l'inflammasome NLRP3 et donc à la mise en place d'un statut inflammatoire aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. D'une manière intéressante, des résultats similaires viennent d'être publiés en l'absence de voie active d'efflux de cholestérol (Westerterp et al., 2018). Ces résultats sont à remettre dans le contexte des récents résultats positifs des essais cliniques de l'étude CANTOS (Canakinumab Antiinflammatory Thrombosis Out- comes Study) qui montrent que l'utilisation d'un anticorps anti-IL-1β réduit le risque de complications cardiovasculaires chez des patients à haut risque d'inflammation (Ridker et al., 2017). Cela met en lumière le besoin d'avoir des essais cliniques comparant les effets anti-cholestérolémiants des effets anti-inflammatoires chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires.

L'identification des modes de régulation de LIPA semble donc être importante pour développer d'éventuels nouveaux outils thérapeutiques. La régulation transcriptionnelle de LIPA reste mal comprise mais pourrait dépendre des facteurs de transcription impliqués dans l'autophagie. En effet, LIPA peut être positivement régulé par FOXO1 (Forkhead Homeobox type protein O1), lui-même activé en cas de restriction calorique (Sandri, 2012). L'un des régulateurs les plus importants de l'autophagie et la biogénèse lysosomale, TFEB (Transcription Factor EB) est aussi connu pour augmenter l'expression de LIPA (Sardiello et al., 2009). En condition de déprivation énergétique ou de stress lysosomal, TFEB est déphosphorylé et transloqué au niveau du noyau pour induire la transcription des gènes dans l'autophagie et la biogénèse lysosomale (Settembre et al., 2013). En effet, il est démontré que la sur-expression de TFEB dans les macrophages péritonéaux de souris induit une augmentation de 2,5 fois de l'expression de l'ARNm de LIPA (Emanuel et al., 2014). De nombreux outils sont en voie de développement pour contrôler cette voie mais bien entendu sans spécificité envers LIPA. On peut également noté des études contradictoires sur l'expression de LIPA par les LXRs et les PPARs qui nécessite de plus amples investigations (Heltianu et al., 2011) (Bowden et al., 2011). Nous n'avons pas observé dans nos modèles de régulations de LIPA par LXR (résultats non montrés). Cependant, nous avons pu confirmer les travaux du Dagmar Kratky montrant que LIPA peut également générer des médiateurs lipidiques tels que les acides gras polyinsaturés (acide linoléique et acide eicosatétraénoique) (Schlager et al., 2017). Bien que l'importance de ces effets reste mal comprise, ils pourraient participer à la réponse inflammatoir5 des macrophages (Ménégaut et al., 2017).

De manière intéressante, la polarisation des macrophages de manière classique ou alternative impacte leur métabolisme et leur fonction, comme j'ai pu le préciser dans l'introduction de la thèse et élégamment discuté dans la revue par le Pr. Giulia Chinetti (Colin et al., 2014). Nous démontrons que l'activité de l'enzyme LIPA varie au cours de la polarisation des macrophages d'une manière non transcriptionelle. En effet, l'activation alternative des macrophages est corrélée à une augmentation de l'activité de l'enzyme LIPA. Les mécanismes pourraient impliqués une acidification des lysosomes qui permettrait une bonne conformation de l'enzyme pour permettre l'accès des substrats au site catalytique. La structure 3D de LIPA n'a pas été déterminée mais par analogie à l'enzyme lipase gastrique, il est suggéré que le site catalytique (triade S153/D324/H353) est protégé par un feuillet couvercle qui pourrait s'ouvrir ou se fermer suite à une acidification du lysosome entrainant un changement de conformation. Deux hypothèses ont été formulées : 1) le pont salin ('salt bridge') dans la région 310-330 pourrait être sensible à l'acidification et contribuer au changement de conformation et 2) un partenaire protéique (nommé collipase) pourrait être nécessaire à ce changement de conformation en se fixant au niveau de la région N-terminal

sous condition acide. Des travaux futurs pourraient être envisagés pour identifier les mécanismes moléculaires et permettre l'identification de nouveaux outils de régulation.

En terme de perspectives cliniques, la plupart des patients sont porteurs d'une mutation dans l'exon 8 du gène qui permet la production de 3 à 5% d'enzyme LIPA ayant une activité normale (Scott et al., 2013) (Stitziel et al., 2013). D'un point de vue phénotypique, les patients présentent une accumulation de graisses dans le foie, une splénomégalie, un niveau élévé de LDL et un faible niveau de HDL. Cela les prédispose à développer des plaques d'athérosclérose. Ceci démontre que l'enzyme LIPA est cruciale dans le métabolisme du cholestérol, aussi bien intracellulaire que systémique, comme ont pu le résumer Bernstein DL. (Bernstein et al., 2013) et Bowden KL. (Bowden et al., 2018). De manière intéressante, chez l'Homme, suite à une blessure, la rate peut produire des cellules sanguines via le processus d'hématopoïèse extra-médullaire, qui est système d'urgence. Chez les patients, nous pouvons donc faire l'hypothèse que la splénomégalie observée est due à un statut inflammatoire accru. Ainsi il serait très intéressant de caractériser le profil inflammatoire des patients déficients pour l'enzyme LIPA afin de confirmer que cette pathologie est due non seulement à une altération du métabolisme du cholestérol mais aussi à un statut pro-inflammatoire constant et délétère. A l'heure actuelle, les patients déficients pour LIPA sont actuellement traités par l'administration d'enzyme recombinante, qui palie au défaut d'activité endogène. Cependant, il est peut probable qu'une telle thérapie puisse un jour etre envisagé chez des patients atteints de maladies cardiovasculaires.

Pour conclure, mon travail de thèse démontre l'importance de la compréhension du métabolisme du glucose et du cholestérol et leur interaction dans la production des cellules myéloïdes. Bien que nous ayons montré que le métabolisme du cholestérol modifiait la glycolyse des cellules hématopoïétiques pour contrôler leur devenir en cellules myéloïdes, il serait intéressant de définir si la réciprocité existe : est-ce que la glycolyse des cellules hématopoïétiques peut impacter le métabolisme du cholestérol ? En tout cas, dans des conditions d'hypercholestérolémie, le contrôle de la myélopoïèse participe à la pathologie athéromateuse alors que des mutations du transporteur ABCA1 semblent participer à la mise en place d'un syndrome myeloprolifféatif chez l'homme. Est-ce que cibler ces deux voies métaboliques est une approche cohérente dans le traitement de la LMMC ?

En parallèle, mon travail de thèse a mis en lumière le rôle essentiel de la dégradation acide du cholestérol par l'enzyme LIPA au sein des lysosomes. Nous avons montré son rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie tissulaire, en maintenant un niveau suffisant d'efferocytose par les macrophages. D'après nos résultats et ceux de la littérature, sa

déficience ou son inhibition sont à l'origine d'un phénotype inflammatoire. Peut-on alors considérer la supplémentation en enzyme LIPA ou le développement d'activateur comme une approche thérapeutique non seulement dans les maladies cardiovasculaires mais aussi dans le traitement de l'ensemble des maladies inflammatoires chroniques ? Pourrait-on imaginer que l'activité de cette enzyme dans les cellules myéloïdes puisse être utilisé comme marqueur diagnostique ?

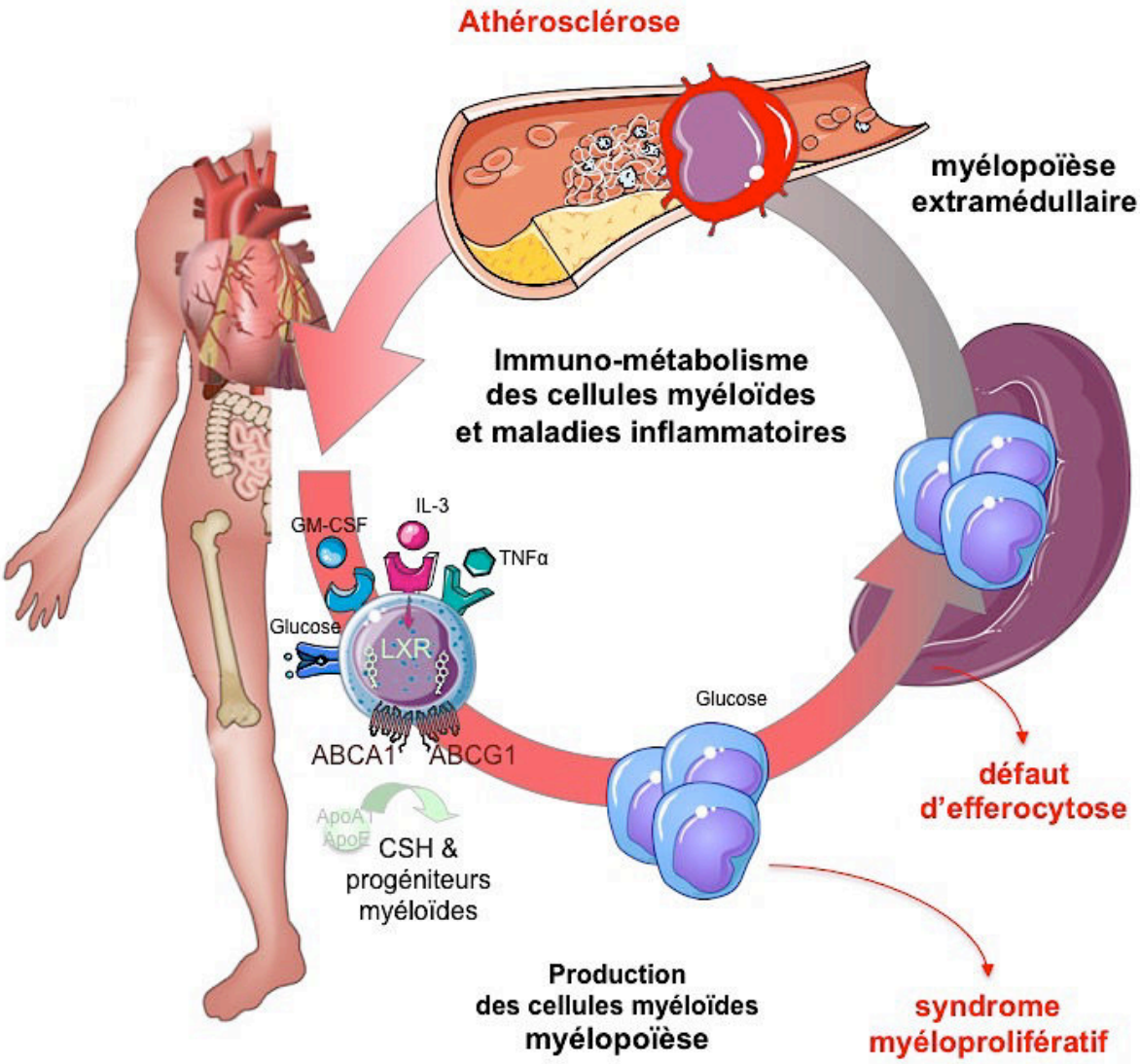


Figure 19: Schéma récapitulatif général

L'altération du métabolisme du cholestérol, au sein des CSH induit une augmentation de la prolifération des CSH et des progéniteurs myéloïdes, soit à une activation de la myélopoïèse. Cela aboutit à une monocytose accrue (syndrome myéloprolifératif). De plus, une activation du métabolisme du glucose dans les cellules myéloïdes promeut aussi une monocytose, favorisant le développement des plaques d'athérosclérose. Aussi, une altération du métabolisme intracellulaire du cholestérol provoque un défaut d'efferocytose dans les tissus, participant à un phénotype pro-inflammatoire.

ABCA1/G1: ATP-Binding Cassette A1/G1, LXR: Liver X Receptor, GM-CSF: Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, IL-3: Interleukine 3, TNFα: Tumor Necrosis Factor

Bibliographie

A

Aarup, A., Pedersen, T.X., Junker, N., Christoffersen, C., Bartels, E.D., Madsen, M., Nielsen, C.H., and Nielsen, L.B. (2016). Hypoxia-Inducible Factor-1α Expression in Macrophages Promotes Development of AtherosclerosisHighlights. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *36*, 1782–1790.

Abdel-Wahab, O., and Levine, R.L. (2010). Metabolism and the leukemic stem cell. J. Exp. Med. *207*, 677–680.

Adorni, M.P., Zimetti, F., Billheimer, J.T., Wang, N., Rader, D.J., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (2007). The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. Journal of Lipid Research *48*, 2453–2462.

A-Gonzalez, N., Bensinger, S.J., Hong, C., Beceiro, S., Bradley, M.N., Zelcer, N., Deniz, J., Ramirez, C., Díaz, M., Gallardo, G., et al. (2009). Apoptotic cells promote their own clearance and immune tolerance through activation of the nuclear receptor LXR. Immunity *31*, 245–258.

Ahmad, O.S., Morris, J.A., Mujammami, M., Forgetta, V., Leong, A., Li, R., Turgeon, M., Greenwood, C.M.T., Thanassoulis, G., Meigs, J.B., et al. (2015). A Mendelian randomization study of the effect of type-2 diabetes on coronary heart disease. Nature Communications *6*.

Alique, M., Luna, C., Carracedo, J., and Ramírez, R. (2015). LDL biochemical modifications: a link between atherosclerosis and aging. Food & Nutrition Research *59*, 29240.

Ameis, D., Merkel, M., Eckerskorn, C., and Greten, H. (1994). Purification, characterization and molecular cloning of human hepatic lysosomal acid lipase. Eur. J. Biochem. *219*, 905–914.

An, G., Wang, H., Tang, R., Yago, T., McDaniel, J.M., McGee, S., Huo, Y., and Xia, L. (2008). P-selectin glycoprotein ligand-1 is highly expressed on Ly-6Chi monocytes and a major determinant for Ly-6Chi monocyte recruitment to sites of atherosclerosis in mice. Circulation *117*, 3227–3237.

Anderson, R.A., Rao, N., Byrum, R.S., Rothschild, C.B., Bowden, D.W., Hayworth, R., and Pettenati, M. (1993). In situ localization of the genetic locus encoding the lysosomal acid lipase/cholesteryl esterase (LIPA) deficient in Wolman disease to chromosome 10q23.2-q23.3. Genomics *15*, 245–247.

Arai, S., Shelton, J.M., Chen, M., Bradley, M.N., Castrillo, A., Bookout, A.L., Mak, P.A., Edwards, P.A., Mangelsdorf, D.J., Tontonoz, P., et al. (2005). A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Api6 in atherosclerosis development. Cell Metab. *1*, 201–213.

Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. Science *317*, 666–670.

Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu. Rev. Immunol. *27*, 669–692.

Azuma, Y., Takada, M., Shin, H.-W., Kioka, N., Nakayama, K., and Ueda, K. (2009). Retroendocytosis pathway of ABCA1/apoA-I contributes to HDL formation. Genes Cells *14*, 191–204.

B

Baldán, A., Pei, L., Lee, R., Tarr, P., Tangirala, R.K., Weinstein, M.M., Frank, J., Li, A.C., Tontonoz, P., and Edwards, P.A. (2006). Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldlr-/- and

ApoE-/- mice transplanted with Abcg1-/- bone marrow. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *26*, 2301–2307.

Baranova, I., Vishnyakova, T., Bocharov, A., Chen, Z., Remaley, A.T., Stonik, J., Eggerman, T.L., and Patterson, A.P. (2002). Lipopolysaccharide down regulates both scavenger receptor B1 and ATP binding cassette transporter A1 in RAW cells. Infect. Immun. *70*, 2995–3003.

Barter, P.J. (2003). Cholesteryl Ester Transfer Protein: A Novel Target for Raising HDL and Inhibiting Atherosclerosis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *23*, 160–167.

Beckman, J.A., Paneni, F., Cosentino, F., and Creager, M.A. (2013). Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. European Heart Journal *34*, 2444–2452.

Beerman, I., Seita, J., Inlay, M.A., Weissman, I.L., and Rossi, D.J. (2014). Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle. Cell Stem Cell *15*, 37–50.

Beh, C.T., Alfaro, G., Duamel, G., Sullivan, D.P., Kersting, M.C., Dighe, S., Kozminski, K.G., and Menon, A.K. (2009). Yeast oxysterol-binding proteins: sterol transporters or regulators of cell polarization? Mol. Cell. Biochem. *326*, 9–13.

Bekkering, S., van den Munckhof, I., Nielen, T., Lamfers, E., Dinarello, C., Rutten, J., de Graaf, J., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., Gomes, M.E.R., et al. (2016). Innate immune cell activation and epigenetic remodeling in symptomatic and asymptomatic atherosclerosis in humans in vivo. Atherosclerosis *254*, 228–236.

Ben, J., Zhu, X., Zhang, H., and Chen, Q. (2015). Class A1 scavenger receptors in cardiovascular diseases. Br. J. Pharmacol. *172*, 5523–5530.

Berge, K.E., Tian, H., Graf, G.A., Yu, L., Grishin, N.V., Schultz, J., Kwiterovich, P., Shan, B., Barnes, R., and Hobbs, H.H. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. Science *290*, 1771–1775.

Bernstein, D.L., Hülkova, H., Bialer, M.G., and Desnick, R.J. (2013). Cholesteryl ester storage disease: review of the findings in 135 reported patients with an underdiagnosed disease. J. Hepatol. *58*, 1230–1243.

Bianconi, E., Piovesan, A., Facchin, F., Beraudi, A., Casadei, R., Frabetti, F., Vitale, L., Pelleri, M.C., Tassani, S., Piva, F., et al. (2013). An estimation of the number of cells in the human body. Ann. Hum. Biol. *40*, 463–471.

Bilen, O., and Ballantyne, C.M. (2016). Bempedoic Acid (ETC-1002): an Investigational Inhibitor of ATP Citrate Lyase. Current Atherosclerosis Reports *18*.

Bories, G., Colin, S., Vanhoutte, J., Derudas, B., Copin, C., Fanchon, M., Daoudi, M., Belloy, L., Haulon, S., Zawadzki, C., et al. (2013). Liver X Receptor Activation Stimulates Iron Export in Human Alternative Macrophages. Circulation Research *113*, 1196–1205.

Boström, P., Magnusson, B., Svensson, P.-A., Wiklund, O., Borén, J., Carlsson, L.M.S., Ståhlman, M., Olofsson, S.-O., and Hultén, L.M. (2006). Hypoxia converts human macrophages into triglyceride-loaded foam cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *26*, 1871–1876.

Bouhlel, M.A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dièvart, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., et al. (2007). PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. Cell Metab. *6*, 137–143.

Bowden, K.L., Bilbey, N.J., Bilawchuk, L.M., Boadu, E., Sidhu, R., Ory, D.S., Du, H., Chan, T., and Francis, G.A. (2011). Lysosomal acid lipase deficiency impairs regulation of ABCA1 gene and

formation of high density lipoproteins in cholesteryl ester storage disease. J. Biol. Chem. *286*, 30624–30635.

Bowden, K.L., Dubland, J.A., Chan, T., Xu, Y.-H., Grabowski, G.A., Du, H., and Francis, G.A. (2018). LAL (Lysosomal Acid Lipase) Promotes Reverse Cholesterol Transport In Vitro and In Vivo. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.

Boyanovsky, B.B., van der Westhuyzen, D.R., and Webb, N.R. (2005). Group V Secretory Phospholipase A_2 -modified Low Density Lipoprotein Promotes Foam Cell Formation by a SR-A- and CD36-independent Process That Involves Cellular Proteoglycans. Journal of Biological Chemistry *280*, 32746–32752.

Boyle, J.J., Johns, M., Lo, J., Chiodini, A., Ambrose, N., Evans, P.C., Mason, J.C., and Haskard, D.O. (2011). Heme Induces Heme Oxygenase 1 via Nrf2: Role in the Homeostatic Macrophage Response to Intraplaque Hemorrhage. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *31*, 2685–2691.

Boyle, J.J., Johns, M., Kampfer, T., Nguyen, A.T., Game, L., Schaer, D.J., Mason, J.C., and Haskard, D.O. (2012). Activating transcription factor 1 directs Mhem atheroprotective macrophages through coordinated iron handling and foam cell protection. Circ. Res. *110*, 20–33.

Burgess, B., Naus, K., Chan, J., Hirsch-Reinshagen, V., Tansley, G., Matzke, L., Chan, B., Wilkinson, A., Fan, J., Donkin, J., et al. (2008). Overexpression of human ABCG1 does not affect atherosclerosis in fat-fed ApoE-deficient mice. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *28*, 1731–1737.

Burton, B.K., Balwani, M., Feillet, F., Barić, I., Burrow, T.A., Camarena Grande, C., Coker, M., Consuelo-Sánchez, A., Deegan, P., Di Rocco, M., et al. (2015). A Phase 3 Trial of Sebelipase Alfa in Lysosomal Acid Lipase Deficiency. New England Journal of Medicine *373*, 1010–1020.

C

Cader, M.Z., Boroviak, K., Zhang, Q., Assadi, G., Kempster, S.L., Sewell, G.W., Saveljeva, S., Ashcroft, J.W., Clare, S., Mukhopadhyay, S., et al. (2016). C13orf31 (FAMIN) is a central regulator of immunometabolic function. Nature Immunology *17*, 1046–1056.

Cai, L., Wang, Z., Meyer, J.M., Ji, A., and van der Westhuyzen, D.R. (2012). Macrophage SR-BI regulates LPS-induced pro-inflammatory signaling in mice and isolated macrophages. Journal of Lipid Research *53*, 1472–1481.

Calkin, A.C., and Tontonoz, P. (2012). Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 213–224.

Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature *425*, 841–846.

Cannon, C.P., Blazing, M.A., Giugliano, R.P., McCagg, A., White, J.A., Theroux, P., Darius, H., Lewis, B.S., Ophuis, T.O., Jukema, J.W., et al. (2015). Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes. N. Engl. J. Med. *372*, 2387–2397.

Cao, G., Zhao, L., Stangl, H., Hasegawa, T., Richardson, J.A., Parker, K.L., and Hobbs, H.H. (1999). Developmental and Hormonal Regulation of Murine Scavenger Receptor, Class B, Type 1. Molecular Endocrinology *13*, 1460–1473.

Cekic, C., and Linden, J. (2016). Purinergic regulation of the immune system. Nat. Rev. Immunol. *16*, 177–192.

Chambenoit, O., Hamon, Y., Marguet, D., Rigneault, H., Rosseneu, M., and Chimini, G. (2001). Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. J. Biol. Chem. *276*, 9955–9960.

Charo, I.F. (2004). Chemokines in the Pathogenesis of Vascular Disease. Circulation Research *95*, 858–866.

Chawla, A., Boisvert, W.A., Lee, C.H., Laffitte, B.A., Barak, Y., Joseph, S.B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P.A., Curtiss, L.K., et al. (2001). A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. Mol. Cell *7*, 161–171.

Chen, M., Inoue, K., Narumiya, S., Masaki, T., and Sawamura, T. (2001a). Requirements of basic amino acid residues within the lectin-like domain of LOX-1 for the binding of oxidized low-density lipoprotein. FEBS Lett. *499*, 215–219.

Chen, W., Sun, Y., Welch, C., Gorelik, A., Leventhal, A.R., Tabas, I., and Tall, A.R. (2001b). Preferential ATP-binding Cassette Transporter A1-mediated Cholesterol Efflux from Late Endosomes/Lysosomes. Journal of Biological Chemistry *276*, 43564–43569.

Chen, W., Wang, N., and Tall, A.R. (2005). A PEST Deletion Mutant of ABCA1 Shows Impaired Internalization and Defective Cholesterol Efflux from Late Endosomes. Journal of Biological Chemistry *280*, 29277–29281.

Chinetti, G., Gbaguidi, F.G., Griglio, S., Mallat, Z., Antonucci, M., Poulain, P., Chapman, J., Fruchart, J.C., Tedgui, A., Najib-Fruchart, J., et al. (2000). CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. Circulation *101*, 2411–2417.

Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A.T., Neve, B., Torra, I.P., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., et al. (2001). PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. Nat. Med. *7*, 53–58.

Chinetti-Gbaguidi, G., Rigamonti, E., Helin, L., Mutka, A.L., Lepore, M., Fruchart, J.C., Clavey, V., Ikonen, E., Lestavel, S., and Staels, B. (2005). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha controls cellular cholesterol trafficking in macrophages. J. Lipid Res. *46*, 2717–2725.

Chong, S.Z., Evrard, M., Devi, S., Chen, J., Lim, J.Y., See, P., Zhang, Y., Adrover, J.M., Lee, B., Tan, L., et al. (2016). CXCR4 identifies transitional bone marrow premonocytes that replenish the mature monocyte pool for peripheral responses. J. Exp. Med. *213*, 2293–2314.

Choromańska, B., Myśliwiec, P., Choromańska, K., Dadan, J., and Chabowski, A. (2017). The role of CD36 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis. Adv Clin Exp Med *26*, 717–722.

Chroni, A., Duka, A., Kan, H.-Y., Liu, T., and Zannis, V.I. (2005). Point mutations in apolipoprotein A-I mimic the phenotype observed in patients with classical lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency. Biochemistry *44*, 14353–14366.

Clarke, M.C.H., Figg, N., Maguire, J.J., Davenport, A.P., Goddard, M., Littlewood, T.D., and Bennett, M.R. (2006). Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. Nat. Med. *12*, 1075–1080.

Cohen, D.E. (2016). Of TICE in Men. Cell Metab. *24*, 773–774.

Colin, S., Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2014). Macrophage phenotypes in atherosclerosis. Immunol. Rev. *262*, 153–166.

Combadière, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2008). Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates

Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. Circulation *117*, 1649–1657.

Costet, P., Luo, Y., Wang, N., and Tall, A.R. (2000). Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. J. Biol. Chem. *275*, 28240–28245.

Crean, D., Cummins, E.P., Bahar, B., Mohan, H., McMorrow, J.P., and Murphy, E.P. (2015). Adenosine Modulates NR4A Orphan Nuclear Receptors To Attenuate Hyperinflammatory Responses in Monocytic Cells. J. Immunol. *195*, 1436–1448.

Croop, J.M., Tiller, G.E., Fletcher, J.A., Lux, M.L., Raab, E., Goldenson, D., Son, D., Arciniegas, S., and Wu, R.L. (1997). Isolation and characterization of a mammalian homolog of the Drosophila white gene. Gene *185*, 77–85.

Cserepes, J., Szentpétery, Z., Seres, L., Ozvegy-Laczka, C., Langmann, T., Schmitz, G., Glavinas, H., Klein, I., Homolya, L., Váradi, A., et al. (2004). Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. Biochem. Biophys. Res. Commun. *320*, 860–867.

D

Dai, X.-M., Ryan, G.R., Hapel, A.J., Dominguez, M.G., Russell, R.G., Kapp, S., Sylvestre, V., and Stanley, E.R. (2002). Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. Blood *99*, 111–120.

Dai, X.-Y., Cai, Y., Mao, D.-D., Qi, Y.-F., Tang, C., Xu, Q., Zhu, Y., Xu, M.-J., and Wang, X. (2012). Increased stability of phosphatase and tensin homolog by intermedin leading to scavenger receptor A inhibition of macrophages reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. J. Mol. Cell. Cardiol. *53*, 509–520.

Dang, C.V., O'Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., and Li, F. (2006). The c-Myc target gene network. Semin. Cancer Biol. *16*, 253–264.

Dang, E.V., McDonald, J.G., Russell, D.W., and Cyster, J.G. (2017). Oxysterol Restraint of Cholesterol Synthesis Prevents AIM2 Inflammasome Activation. Cell *171*, 1057–1071.e11.

Daniels, T.F., Killinger, K.M., Michal, J.J., Wright, R.W., and Jiang, Z. (2009a). Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. Int. J. Biol. Sci. *5*, 474–488.

Daniels, T.F., Killinger, K.M., Michal, J.J., Wright, R.W., and Jiang, Z. (2009b). Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. Int. J. Biol. Sci. *5*, 474–488.

Davidson, W.S., Rodrigueza, W.V., Lund-Katz, S., Johnson, W.J., Rothblat, G.H., and Phillips, M.C. (1995). Effects of Acceptor Particle Size on the Efflux of Cellular Free Cholesterol. Journal of Biological Chemistry *270*, 17106–17113.

Davis, H.R., and Altmann, S.W. (2009). Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. Biochim. Biophys. Acta *1791*, 679–683.

Dawber, T.R., Moore, F.E., and Mann, G.V. (1957). Coronary heart disease in the Framingham study. Am J Public Health Nations Health *47*, 4–24.

Denis, M., Bissonnette, R., Haidar, B., Krimbou, L., Bouvier, M., and Genest, J. (2003). Expression, regulation, and activity of ABCA1 in human cell lines. Mol. Genet. Metab. *78*, 265–274.

Denis, M., Haidar, B., Marcil, M., Bouvier, M., Krimbou, L., and Genest, J. (2004). Characterization of Oligomeric Human ATP Binding Cassette Transporter A1: POTENTIAL IMPLICATIONS FOR DETERMINING THE STRUCTURE OF NASCENT HIGH DENSITY LIPOPROTEIN PARTICLES. Journal of Biological Chemistry *279*, 41529–41536.

Denis, M., Landry, Y.D., and Zha, X. (2008). ATP-binding Cassette A1-mediated Lipidation of Apolipoprotein A-I Occurs at the Plasma Membrane and Not in the Endocytic Compartments. Journal of Biological Chemistry *283*, 16178–16186.

Deter, R.L., and De Duve, C. (1967). Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. J. Cell Biol. *33*, 437–449.

Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. Nature *481*, 457–462.

Du, H., and Grabowski, G.A. (2004). Lysosomal acid lipase and atherosclerosis. Curr. Opin. Lipidol. *15*, 539–544.

Du, J., Li, Q., Tang, F., Puchowitz, M.A., Fujioka, H., Dunwoodie, S.L., Danielpour, D., and Yang, Y.-C. (2014). Cited2 is required for the maintenance of glycolytic metabolism in adult hematopoietic stem cells. Stem Cells Dev. *23*, 83–94.

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., et al. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. Nature *464*, 1357–1361.

E

Elliott, M.R., and Ravichandran, K.S. (2016). The Dynamics of Apoptotic Cell Clearance. Dev. Cell *38*, 147–160.

Elliott, M.R., Koster, K.M., and Murphy, P.S. (2017). Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses. The Journal of Immunology *198*, 1387–1394.

Ema, H., Morita, Y., and Suda, T. (2014). Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. Exp. Hematol. *42*, 74–82.e2.

Emami, H., Singh, P., MacNabb, M., Vucic, E., Lavender, Z., Rudd, J.H.F., Fayad, Z.A., Lehrer-Graiwer, J., Korsgren, M., Figueroa, A.L., et al. (2015). Splenic metabolic activity predicts risk of future cardiovascular events: demonstration of a cardiosplenic axis in humans. JACC Cardiovasc Imaging *8*, 121–130.

Emanuel, R., Sergin, I., Bhattacharya, S., Turner, J.N., Epelman, S., Settembre, C., Diwan, A., Ballabio, A., and Razani, B. (2014). Induction of Lysosomal Biogenesis in Atherosclerotic Macrophages Can Rescue Lipid-Induced Lysosomal Dysfunction and Downstream Sequelae. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *34*, 1942–1952.

Engel, D.R., Krause, T.A., Snelgrove, S.L., Thiebes, S., Hickey, M.J., Boor, P., Kitching, A.R., and Kurts, C. (2015). CX3CR1 reduces kidney fibrosis by inhibiting local proliferation of profibrotic macrophages. J. Immunol. *194*, 1628–1638.

Erbel, C., Tyka, M., Helmes, C.M., Akhavanpoor, M., Rupp, G., Domschke, G., Linden, F., Wolf, A., Doesch, A., Lasitschka, F., et al. (2015). CXCL4-induced plaque macrophages can be specifically identified by co-expression of MMP7+S100A8+ in vitro and in vivo. Innate Immun *21*, 255–265.

F

Fadok, V.A., Bratton, D.L., Konowal, A., Freed, P.W., Westcott, J.Y., and Henson, P.M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. Journal of Clinical Investigation *101*, 890–898.

Faulkner, L.E., Panagotopulos, S.E., Johnson, J.D., Woollett, L.A., Hui, D.Y., Witting, S.R., Maiorano, J.N., and Davidson, W.S. (2008). An analysis of the role of a retroendocytosis pathway in ABCA1-mediated cholesterol efflux from macrophages. J. Lipid Res. *49*, 1322–1332.

Feig, J.E., Quick, J.S., and Fisher, E.A. (2009). The role of a murine transplantation model of atherosclerosis regression in drug discovery. Curr Opin Investig Drugs *10*, 232–238.

Feig, J.E., Pineda-Torra, I., Sanson, M., Bradley, M.N., Vengrenyuk, Y., Bogunovic, D., Gautier, E.L., Rubinstein, D., Hong, C., Liu, J., et al. (2010). LXR promotes the maximal egress of monocyte-derived cells from mouse aortic plaques during atherosclerosis regression. Journal of Clinical Investigation *120*, 4415–4424.

Feig, J.E., Rong, J.X., Shamir, R., Sanson, M., Vengrenyuk, Y., Liu, J., Rayner, K., Moore, K., Garabedian, M., and Fisher, E.A. (2011). HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 7166–7171.

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.

Ference, B.A. (2015). Mendelian randomization studies: using naturally randomized genetic data to fill evidence gaps. Curr. Opin. Lipidol. *26*, 566–571.

Ference, B.A., Ginsberg, H.N., Graham, I., Ray, K.K., Packard, C.J., Bruckert, E., Hegele, R.A., Krauss, R.M., Raal, F.J., Schunkert, H., et al. (2017). Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Eur. Heart J. *38*, 2459–2472.

Fielding, C.J., Shore, V.G., and Fielding, P.E. (1972). Lecithin: cholesterol acyltransferase: effects of substrate composition upon enzyme activity. Biochim. Biophys. Acta *270*, 513–518.

Finn, A.V., Nakano, M., Polavarapu, R., Karmali, V., Saeed, O., Zhao, X., Yazdani, S., Otsuka, F., Davis, T., Habib, A., et al. (2012). Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques. J. Am. Coll. Cardiol. *59*, 166–177.

Fitzgerald, M.L. (2002). Naturally Occurring Mutations in the Largest Extracellular Loops of ABCA1 Can Disrupt Its Direct Interaction with Apolipoprotein A-I. Journal of Biological Chemistry *277*, 33178–33187.

Fitzgerald, M.L., Moore, K.J., and Freeman, M.W. (2002). Nuclear hormone receptors and cholesterol trafficking: the orphans find a new home. J. Mol. Med. *80*, 271–281.

Flier, J.S., Mueckler, M.M., Usher, P., and Lodish, H.F. (1987). Elevated levels of glucose transport and transporter messenger RNA are induced by ras or src oncogenes. Science *235*, 1492–1495.

Fogg, D.K., Sibon, C., Miled, C., Jung, S., Aucouturier, P., Littman, D.R., Cumano, A., and Geissmann, F. (2006). A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. Science *311*, 83–87.

Fond, A.M., Lee, C.S., Schulman, I.G., Kiss, R.S., and Ravichandran, K.S. (2015). Apoptotic cells trigger a membrane-initiated pathway to increase ABCA1. J. Clin. Invest. *125*, 2748–2758.

Foudi, A., Hochedlinger, K., Van Buren, D., Schindler, J.W., Jaenisch, R., Carey, V., and Hock, H. (2009). Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. Nat. Biotechnol. *27*, 84–90.

Fredrickson, D.S., and Lees, R.S. (1965). A SYSTEM FOR PHENOTYPING HYPERLIPOPROTEINEMIA. Circulation *31*, 321–327.

Frikke-Schmidt, R., Nordestgaard, B.G., Jensen, G.B., and Tybjaerg-Hansen, A. (2004). Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. J. Clin. Invest. *114*, 1343–1353.

Fu, Y., Hoang, A., Escher, G., Parton, R.G., Krozowski, Z., and Sviridov, D. (2004). Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells. J. Biol. Chem. *279*, 14140–14146.

Fu, Y., Mukhamedova, N., Ip, S., D'Souza, W., Henley, K.J., DiTommaso, T., Kesani, R., Ditiatkovski, M., Jones, L., Lane, R.M., et al. (2013). ABCA12 regulates ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages and the development of atherosclerosis. Cell Metab. *18*, 225–238.

Furuyama, S., Uehara, Y., Zhang, B., Baba, Y., Abe, S., Iwamoto, T., Miura, S.-I., and Saku, K. (2009). Genotypic Effect of ABCG1 gene promoter -257T>G polymorphism on coronary artery disease severity in Japanese men. J. Atheroscler. Thromb. *16*, 194–200.

G

Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Alnemri, E.S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., et al. (2015). Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. Cell Death Differ. *22*, 58–73.

Gan, B., Hu, J., Jiang, S., Liu, Y., Sahin, E., Zhuang, L., Fletcher-Sananikone, E., Colla, S., Wang, Y.A., Chin, L., et al. (2010). Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. Nature *468*, 701–704.

Gao, M., Zhao, D., Schouteden, S., Sorci-Thomas, M.G., Van Veldhoven, P.P., Eggermont, K., Liu, G., Verfaillie, C.M., and Feng, Y. (2014). Regulation of high-density lipoprotein on hematopoietic stem/progenitor cells in atherosclerosis requires scavenger receptor type BI expression. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *34*, 1900–1909.

Gaudet, D., Gipe, D.A., Pordy, R., Ahmad, Z., Cuchel, M., Shah, P.K., Chyu, K.-Y., Sasiela, W.J., Chan, K.-C., Brisson, D., et al. (2017). ANGPTL3 Inhibition in Homozygous Familial Hypercholesterolemia. New England Journal of Medicine *377*, 296–297.

Gautier, E.L., Huby, T., Witztum, J.L., Ouzilleau, B., Miller, E.R., Saint-Charles, F., Aucouturier, P., Chapman, M.J., and Lesnik, P. (2009). Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. Circulation *119*, 1795–1804.

Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., et al. (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. Nat. Immunol. *13*, 1118–1128.

Gautier, E.L., Westerterp, M., Bhagwat, N., Cremers, S., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Lütjohann, D., Randolph, G.J., Levine, R.L., Tall, A.R., et al. (2013). HDL and Glut1 inhibition reverse a hypermetabolic state in mouse models of myeloproliferative disorders. The Journal of Experimental Medicine *210*, 339–353.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity *19*, 71–82.

Gelissen, I.C., Harris, M., Rye, K.-A., Quinn, C., Brown, A.J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L., and Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *26*, 534–540.

Gerbod-Giannone, M.-C., Li, Y., Holleboom, A., Han, S., Hsu, L.-C., Tabas, I., and Tall, A.R. (2006). TNFalpha induces ABCA1 through NF-kappaB in macrophages and in phagocytes ingesting apoptotic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 3112–3117.

van Gils, J.M., Ramkhelawon, B., Fernandes, L., Stewart, M.C., Guo, L., Seibert, T., Menezes, G.B., Cara, D.C., Chow, C., Kinane, T.B., et al. (2013). Endothelial Expression of Guidance Cues in Vessel Wall Homeostasis Dysregulation Under Proatherosclerotic Conditions. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *33*, 911–919.

Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. Nat. Rev. Immunol. *14*, 392–404.

Gleissner, C.A., Sanders, J.M., Nadler, J., and Ley, K. (2008). Upregulation of Aldose Reductase During Foam Cell Formation as Possible Link Among Diabetes, Hyperlipidemia, and Atherosclerosis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *28*, 1137–1143.

Gleissner, C.A., Shaked, I., Little, K.M., and Ley, K. (2010a). CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages. J. Immunol. *184*, 4810–4818.

Gleissner, C.A., Shaked, I., Erbel, C., Böckler, D., Katus, H.A., and Ley, K. (2010b). CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophages. Circ. Res. *106*, 203–211.

Goldberg, I.J. (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. J. Lipid Res. *37*, 693–707.

Gomes, A.L., Carvalho, T., Serpa, J., Torre, C., and Dias, S. (2010). Hypercholesterolemia promotes bone marrow cell mobilization by perturbing the SDF-1:CXCR4 axis. Blood *115*, 3886–3894.

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. Nat. Rev. Immunol. *3*, 23–35.

Gosselin, D., Link, V.M., Romanoski, C.E., Fonseca, G.J., Eichenfield, D.Z., Spann, N.J., Stender, J.D., Chun, H.B., Garner, H., Geissmann, F., et al. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. Cell *159*, 1327–1340.

Gotto, A.M. (2009). Improving lipid goal attainment: is it enough? Circulation *120*, 3–5.

Graf, G.A., Connell, P.M., van der Westhuyzen, D.R., and Smart, E.J. (1999). The Class B, Type I Scavenger Receptor Promotes the Selective Uptake of High Density Lipoprotein Cholesterol Ethers into Caveolae. Journal of Biological Chemistry *274*, 12043–12048.

Green, D.R., Oguin, T.H., and Martinez, J. (2016). The clearance of dying cells: table for two. Cell Death Differ. *23*, 915–926.

Gude, D.R., Alvarez, S.E., Paugh, S.W., Mitra, P., Yu, J., Griffiths, R., Barbour, S.E., Milstien, S., and Spiegel, S. (2008). Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a “come-and-get-me” signal. FASEB J. *22*, 2629–2638.

Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. Nat. Rev. Immunol. *14*, 571–578.

Gurumurthy, S., Xie, S.Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R.Z., Saez, B., Tzatsos, A., Ozsolak, F., Milos, P., Ferrari, F., et al. (2010). The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. Nature *468*, 659–663.

H

Hahn, C., and Schwartz, M.A. (2009). Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 53–62.

Haidar, B., Denis, M., Krimbou, L., Marcil, M., and Genest, J. (2002). cAMP induces ABCA1 phosphorylation activity and promotes cholesterol efflux from fibroblasts. Journal of Lipid Research *43*, 2087–2094.

Hamon, Y., Broccardo, C., Chambenoit, O., Luciani, M.F., Toti, F., Chaslin, S., Freyssinet, J.M., Devaux, P.F., McNeish, J., Marguet, D., et al. (2000). ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. Nat. Cell Biol. *2*, 399–406.

Han, S., and Sidell, N. (2002). Peroxisome-proliferator-activated-receptor gamma (PPARgamma) independent induction of CD36 in THP-1 monocytes by retinoic acid. Immunology *106*, 53–59.

Han, J., Hajjar, D.P., Tauras, J.M., and Nicholson, A.C. (1999). Cellular cholesterol regulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. J. Lipid Res. *40*, 830–838.

Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2004). Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. Science *304*, 1147–1150.

Hansson, G.K., and Björkholm, M. (2010). Medicine. Tackling two diseases with HDL. Science *328*, 1641–1642.

Hansson, G.K., Libby, P., and Tabas, I. (2015). Inflammation and plaque vulnerability. J. Intern. Med. *278*, 483–493.

Hardy, L., Frisdal, E., and Le Goff, W. (2017). Critical Role of the Human ATP-Binding Cassette G1 Transporter in Cardiometabolic Diseases. International Journal of Molecular Sciences *18*, 1892.

Hashizume, M., and Mihara, M. (2012). Blockade of IL-6 and TNF-α inhibited oxLDL-induced production of MCP-1 via scavenger receptor induction. Eur. J. Pharmacol. *689*, 249–254.

Hegyi, Z., and Homolya, L. (2016). Functional Cooperativity between ABCG4 and ABCG1 Isoforms. PLoS ONE *11*, e0156516.

Heltianu, C., Robciuc, A., Botez, G., Musina, C., Stancu, C., Sima, A.V., and Simionescu, M. (2011). Modified low density lipoproteins decrease the activity and expression of lysosomal acid lipase in human endothelial and smooth muscle cells. Cell Biochem. Biophys. *61*, 209–216.

Henson, P.M., Bratton, D.L., and Fadok, V.A. (2001). Apoptotic cell removal. Current Biology *11*, R795–R805.

Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.-C., Krijgsveld, J., and Feuerer, M. (2013). Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. Nat. Immunol. *14*, 821–830.

Hoeffel, G., Wang, Y., Greter, M., See, P., Teo, P., Malleret, B., Leboeuf, M., Low, D., Oller, G., Almeida, F., et al. (2012). Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. J. Exp. Med. *209*, 1167–1181.

Hooper, A.J., van Bockxmeer, F.M., and Burnett, J.R. (2005). Monogenic hypocholesterolaemic lipid disorders and apolipoprotein B metabolism. Crit Rev Clin Lab Sci *42*, 515–545.

Hooper, A.T., Butler, J.M., Nolan, D.J., Kranz, A., Iida, K., Kobayashi, M., Kopp, H.-G., Shido, K., Petit, I., Yanger, K., et al. (2009). Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells. Cell Stem Cell *4*, 263–274.

Hopkins, G.J., and Barter, P.J. (1980). Transfers of esterified cholesterol and triglyceride between high density and very low density lipoproteins: in vitro studies of rabbits and humans. Metab. Clin. Exp. *29*, 546–550.

Horton, J.D., Shah, N.A., Warrington, J.A., Anderson, N.N., Park, S.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2003). Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. Proceedings of the National Academy of Sciences *100*, 12027–12032.

Hsu, C.-L., Lin, W., Seshasayee, D., Chen, Y.-H., Ding, X., Lin, Z., Suto, E., Huang, Z., Lee, W.P., Park, H., et al. (2012). Equilibrative nucleoside transporter 3 deficiency perturbs lysosome function and macrophage homeostasis. Science *335*, 89–92.

Huang, S.C.-C., Everts, B., Ivanova, Y., O'Sullivan, D., Nascimento, M., Smith, A.M., Beatty, W., Love-Gregory, L., Lam, W.Y., O'Neill, C.M., et al. (2014). Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages. Nat. Immunol. *15*, 846–855.

Huuskonen, J., Abedin, M., Vishnu, M., Pullinger, C.R., Baranzini, S.E., Kane, J.P., Fielding, P.E., and Fielding, C.J. (2003). Dynamic regulation of alternative ATP-binding cassette transporter A1 transcripts. Biochem. Biophys. Res. Commun. *306*, 463–468.

I

Igarashi, M., Osuga, J., Uozaki, H., Sekiya, M., Nagashima, S., Takahashi, M., Takase, S., Takanashi, M., Li, Y., Ohta, K., et al. (2010). The critical role of neutral cholesterol ester hydrolase 1 in cholesterol removal from human macrophages. Circ. Res. *107*, 1387–1395.

Ikonen, E., and Parton, R.G. (2000). Caveolins and Cellular Cholesterol Balance: Caveolins and Cholesterol. Traffic *1*, 212–217.

Im, S.-S., Yousef, L., Blaschitz, C., Liu, J.Z., Edwards, R.A., Young, S.G., Raffatellu, M., and Osborne, T.F. (2011). Linking lipid metabolism to the innate immune response in macrophages through sterol regulatory element binding protein-1a. Cell Metab. *13*, 540–549.

Imanirad, P., Solaimani Kartalaei, P., Crisan, M., Vink, C., Yamada-Inagawa, T., de Pater, E., Kurek, D., Kaimakis, P., van der Linden, R., Speck, N., et al. (2014). HIF1α is a regulator of hematopoietic progenitor and stem cell development in hypoxic sites of the mouse embryo. Stem Cell Res *12*, 24–35.

Imhof, B.A., and Aurrand-Lions, M. (2004). Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. Nat. Rev. Immunol. *4*, 432–444.

Infante, R.E., Abi-Mosleh, L., Radhakrishnan, A., Dale, J.D., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (2008). Purified NPC1 Protein: *I. BINDING OF CHOLESTEROL AND OXYSTEROLS TO A 1278-AMINO ACID MEMBRANE PROTEIN*. Journal of Biological Chemistry *283*, 1052–1063.

Ingersoll, M.A., Spanbroek, R., Lottaz, C., Gautier, E.L., Frankenberger, M., Hoffmann, R., Lang, R., Haniffa, M., Collin, M., Tacke, F., et al. (2010). Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. Blood *115*, e10-19.

Inoue, K., Arai, Y., Kurihara, H., Kita, T., and Sawamura, T. (2005). Overexpression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 induces intramyocardial vasculopathy in apolipoprotein E-null mice. Circ. Res. *97*, 176–184.

Ip, W.K.E., Takahashi, K., Moore, K.J., Stuart, L.M., and Ezekowitz, R.A.B. (2008). Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome. J. Exp. Med. *205*, 169–181.

Ipseiz, N., Uderhardt, S., Scholtysek, C., Steffen, M., Schabbauer, G., Bozec, A., Schett, G., and Krönke, G. (2014). The nuclear receptor Nr4a1 mediates anti-inflammatory effects of apoptotic cells. J. Immunol. *192*, 4852–4858.

Ishino, S., Mukai, T., Kume, N., Asano, D., Ogawa, M., Kuge, Y., Minami, M., Kita, T., Shiomi, M., and Saji, H. (2007). Lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression is associated with atherosclerotic plaque instability--analysis in hypercholesterolemic rabbits. Atherosclerosis *195*, 48–56.

Ito, K., and Suda, T. (2014). Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 243–256.

Ito, K., Carracedo, A., Weiss, D., Arai, F., Ala, U., Avigan, D.E., Schafer, Z.T., Evans, R.M., Suda, T., Lee, C.-H., et al. (2012). A PML–PPAR-δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. Nat. Med. *18*, 1350–1358.

Itoh, S., Nagao, K., Kimura, Y., Matsuo, M., Kioka, N., and Ueda, K. (2015). Position 834 in TM6 plays an important role in cholesterol and phosphatidylcholine transport by ABCA1. Biosci. Biotechnol. Biochem. *79*, 775–781.

Itzykson, R., Duchmann, M., Lucas, N., and Solary, E. (2017). CMML: Clinical and molecular aspects. Int. J. Hematol. *105*, 711–719.

J

Jacque, N., Ronchetti, A.M., Larrue, C., Meunier, G., Birsen, R., Willems, L., Saland, E., Decroocq, J., Maciel, T.T., Lambert, M., et al. (2015). Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition. Blood *126*, 1346–1356.

Jakubzick, C., Gautier, E.L., Gibbings, S.L., Sojka, D.K., Schlitzer, A., Johnson, T.E., Ivanov, S., Duan, Q., Bala, S., Condon, T., et al. (2013). Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. Immunity *39*, 599–610.

Jakubzick, C.V., Randolph, G.J., and Henson, P.M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. Nat. Rev. Immunol. *17*, 349–362.

Jakulj, L., van Dijk, T.H., de Boer, J.F., Kootte, R.S., Schonewille, M., Paalvast, Y., Boer, T., Bloks, V.W., Boverhof, R., Nieuwdorp, M., et al. (2016). Transintestinal Cholesterol Transport Is Active in Mice and Humans and Controls Ezetimibe-Induced Fecal Neutral Sterol Excretion. Cell Metab. *24*, 783–794.

Jang, Y.-Y., and Sharkis, S.J. (2007). A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. Blood *110*, 3056–3063.

Jewell, J.L., Kim, Y.C., Russell, R.C., Yu, F.-X., Park, H.W., Plouffe, S.W., Tagliabracci, V.S., and Guan, K.-L. (2015). Metabolism. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. Science *347*, 194–198.

Jonas, A. (2000). Lecithin cholesterol acyltransferase. Biochim. Biophys. Acta *1529*, 245–256.

K

Kadl, A., Meher, A.K., Sharma, P.R., Lee, M.Y., Doran, A.C., Johnstone, S.R., Elliott, M.R., Gruber, F., Han, J., Chen, W., et al. (2010). Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. Circ. Res. *107*, 737–746.

Kadl, A., Sharma, P.R., Chen, W., Agrawal, R., Meher, A.K., Rudraiah, S., Grubbs, N., Sharma, R., and Leitinger, N. (2011). Oxidized phospholipid-induced inflammation is mediated by Toll-like receptor 2. Free Radic. Biol. Med. *51*, 1903–1909.

Kang, M.H., Singaraja, R., and Hayden, M.R. (2010). Adenosine-triphosphate-binding cassette transporter-1 trafficking and function. Trends Cardiovasc. Med. *20*, 41–49.

Kanter, J.E., Kramer, F., Barnhart, S., Averill, M.M., Vivekanandan-Giri, A., Vickery, T., Li, L.O., Becker, L., Yuan, W., Chait, A., et al. (2012). Diabetes promotes an inflammatory macrophage phenotype and atherosclerosis through acyl-CoA synthetase 1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *109*, E715-724.

Karlin, J.B., Johnson, W.J., Benedict, C.R., Chacko, G.K., Phillips, M.C., and Rothblat, G.H. (1987). Cholesterol flux between cells and high density lipoprotein. Lack of relationship to specific binding of the lipoprotein to the cell surface. J. Biol. Chem. *262*, 12557–12564.

Kataoka, H., Kume, N., Miyamoto, S., Minami, M., Moriwaki, H., Murase, T., Sawamura, T., Masaki, T., Hashimoto, N., and Kita, T. (1999). Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. Circulation *99*, 3110–3117.

Kellner-Weibel, G., de La Llera-Moya, M., Connelly, M.A., Stoudt, G., Christian, A.E., Haynes, M.P., Williams, D.L., and Rothblat, G.H. (2000). Expression of scavenger receptor BI in COS-7 cells alters cholesterol content and distribution. Biochemistry *39*, 221–229.

Kennedy, M.A., Venkateswaran, A., Tarr, P.T., Xenarios, I., Kudoh, J., Shimizu, N., and Edwards, P.A. (2001). Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. J. Biol. Chem. *276*, 39438–39447.

Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldán, A., Tarr, P., Fishbein, M.C., Frank, J., Francone, O.L., and Edwards, P.A. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. Cell Metab. *1*, 121–131.

Khan, R., Spagnoli, V., Tardif, J.-C., and L'Allier, P.L. (2015). Novel anti-inflammatory therapies for the treatment of atherosclerosis. Atherosclerosis *240*, 497–509.

Kharas, M.G., Okabe, R., Ganis, J.J., Gozo, M., Khandan, T., Paktinat, M., Gilliland, D.G., and Gritsman, K. (2010). Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. Blood *115*, 1406–1415.

Khera, A.V., and Kathiresan, S. (2017). Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation. Nat. Rev. Genet. *18*, 331–344.

Khera, A.V., Cuchel, M., de la Llera-Moya, M., Rodrigues, A., Burke, M.F., Jafri, K., French, B.C., Phillips, J.A., Mucksavage, M.L., Wilensky, R.L., et al. (2011). Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis. New England Journal of Medicine *364*, 127–135.

Khovidhunkit, W., Moser, A.H., Shigenaga, J.K., Grunfeld, C., and Feingold, K.R. (2003). Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages: differential role of LXR. J. Lipid Res. *44*, 1728–1736.

Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell *121*, 1109–1121.

Kielar, D., Dietmaier, W., Langmann, T., Aslanidis, C., Probst, M., Naruszewicz, M., and Schmitz, G. (2001). Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR. Clin. Chem. *47*, 2089–2097.

Kiss, R.S., Elliott, M.R., Ma, Z., Marcel, Y.L., and Ravichandran, K.S. (2006). Apoptotic cells induce a phosphatidylserine-dependent homeostatic response from phagocytes. Curr. Biol. *16*, 2252–2258.

Kleiner, S., Nguyen-Tran, V., Baré, O., Huang, X., Spiegelman, B., and Wu, Z. (2009). PPAR{delta} agonism activates fatty acid oxidation via PGC-1{alpha} but does not increase mitochondrial gene expression and function. J. Biol. Chem. *284*, 18624–18633.

Klucken, J., Büchler, C., Orsó, E., Kaminski, W.E., Porsch-Ozcürümez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., et al. (2000). ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *97*, 817–822.

Kockx, M. (2000). Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? Cardiovascular Research *45*, 736–746.

Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S., and Inoue, K. (2007). UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. Nature *446*, 1091–1095.

Kojima, Y., Downing, K., Kundu, R., Miller, C., Dewey, F., Lancero, H., Raaz, U., Perisic, L., Hedin, U., Schadt, E., et al. (2014). Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B regulates efferocytosis and atherosclerosis. Journal of Clinical Investigation *124*, 1083–1097.

Kojima, Y., Volkmer, J.-P., McKenna, K., Civelek, M., Lusis, A.J., Miller, C.L., Direnzo, D., Nanda, V., Ye, J., Connolly, A.J., et al. (2016). CD47-blocking antibodies restore phagocytosis and prevent atherosclerosis. Nature *536*, 86–90.

Kojima, Y., Weissman, I.L., and Leeper, N.J. (2017). The Role of Efferocytosis in Atherosclerosis. Circulation *135*, 476–489.

König, J., Wells, J., Cani, P.D., García-Ródenas, C.L., MacDonald, T., Mercenier, A., Whyte, J., Troost, F., and Brummer, R.-J. (2016). Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. Clin Transl Gastroenterol *7*, e196.

Kono, H., and Rock, K.L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. Nat. Rev. Immunol. *8*, 279–289.

Köröskényi, K., Duró, E., Pallai, A., Sarang, Z., Kloor, D., Ucker, D.S., Beceiro, S., Castrillo, A., Chawla, A., Ledent, C.A., et al. (2011). Involvement of adenosine A2A receptors in engulfment-dependent apoptotic cell suppression of inflammation. J. Immunol. *186*, 7144–7155.

Kowal, R.C., Herz, J., Goldstein, J.L., Esser, V., and Brown, M.S. (1989). Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *86*, 5810–5814.

Kozyraki, R., Fyfe, J., Kristiansen, M., Gerdes, C., Jacobsen, C., Cui, S., Christensen, E.I., Aminoff, M., de la Chapelle, A., Krahe, R., et al. (1999). The intrinsic factor-vitamin B12 receptor, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein. Nat. Med. *5*, 656–661.

Krajewska, W.M., and Masłowska, I. (2004). Caveolins: structure and function in signal transduction. Cell. Mol. Biol. Lett. *9*, 195–220.

Kratzer, A., Giral, H., and Landmesser, U. (2014). High-density lipoproteins as modulators of endothelial cell functions: alterations in patients with coronary artery disease. Cardiovasc. Res. *103*, 350–361.

Krieger, M. (1994). Structures and Functions of Multiligand Lipoprotein Receptors: Macrophage Scavenger Receptors and LDL Receptor-Related Protein (LRP). Annual Review of Biochemistry *63*, 601–637.

Krieger, M. (1999). Charting the fate of the “good cholesterol”: identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. Annu. Rev. Biochem. *68*, 523–558.

Kruth, H.S. (2011). Receptor-independent fluid-phase pinocytosis mechanisms for induction of foam cell formation with native low-density lipoprotein particles. Curr. Opin. Lipidol. *22*, 386–393.

Kuchibhotla, S., Vanegas, D., Kennedy, D.J., Guy, E., Nimako, G., Morton, R.E., and Febbraio, M. (2008). Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. Cardiovasc. Res. *78*, 185–196.

Kume, N., and Kita, T. (2001). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in atherogenesis. Trends Cardiovasc. Med. *11*, 22–25.

Kume, N., Moriwaki, H., Kataoka, H., Minami, M., Murase, T., Sawamura, T., Masaki, T., and Kita, T. (2000). Inducible expression of LOX-1, a novel receptor for oxidized LDL, in macrophages and vascular smooth muscle cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. *902*, 323–327.

Kunjathoor, V.V., Febbraio, M., Podrez, E.A., Moore, K.J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J.S., Silverstein, R., Hoff, H.F., and Freeman, M.W. (2002). Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. J. Biol. Chem. *277*, 49982–49988.

Kzhyshkowska, J., Neyen, C., and Gordon, S. (2012). Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. Immunobiology *217*, 492–502.

L

Landis, R.C., Philippidis, P., Domin, J., Boyle, J.J., and Haskard, D.O. (2013). Haptoglobin Genotype-Dependent Anti-Inflammatory Signaling in CD163 $^{+}$ Macrophages. International Journal of Inflammation *2013*, 1–7.

Landry, Y.D., Denis, M., Nandi, S., Bell, S., Vaughan, A.M., and Zha, X. (2006). ATP-binding Cassette Transporter A1 Expression Disrupts Raft Membrane Microdomains through Its ATPase-related Functions. Journal of Biological Chemistry *281*, 36091–36101.

Landsman, L., Bar-On, L., Zernecke, A., Kim, K.-W., Krauthgamer, R., Shagdarsuren, E., Lira, S.A., Weissman, I.L., Weber, C., and Jung, S. (2009). CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. Blood *113*, 963–972.

Langmann, T., Klucken, J., Reil, M., Liebisch, G., Luciani, M.F., Chimini, G., Kaminski, W.E., and Schmitz, G. (1999). Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. *257*, 29–33.

Langmann, T., Porsch-Ozcürümez, M., Unkelbach, U., Klucken, J., and Schmitz, G. (2000). Genomic organization and characterization of the promoter of the human ATP-binding cassette transporter-G1 (ABCG1) gene. Biochim. Biophys. Acta *1494*, 175–180.

Langmann, T., Porsch-Ozcürümez, M., Heimerl, S., Probst, M., Moehle, C., Taher, M., Borsukova, H., Kielar, D., Kaminski, W.E., Dittrich-Wengenroth, E., et al. (2002). Identification of sterol-independent regulatory elements in the human ATP-binding cassette transporter A1 promoter: role of Sp1/3, E-box binding factors, and an oncostatin M-responsive element. J. Biol. Chem. *277*, 14443–14450.

Lauber, K., Bohn, E., Kröber, S.M., Xiao, Y., Blumenthal, S.G., Lindemann, R.K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., et al. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. Cell *113*, 717–730.

Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., Jung, S., and Amit, I. (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. Cell *159*, 1312–1326.

Lawn, R.M., Wade, D.P., Garvin, M.R., Wang, X., Schwartz, K., Porter, J.G., Seilhamer, J.J., Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (1999). The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. Journal of Clinical Investigation *104*, R25–R31.

Le Goff, W. (2005). Identification of the cAMP-Responsive Enhancer of the Murine ABCA1 Gene: Requirement for CREB1 and STAT3/4 Elements. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *26*, 527–533.

Le May, C., Berger, J.M., Lespine, A., Pillot, B., Prieur, X., Letessier, E., Hussain, M.M., Collet, X., Cariou, B., and Costet, P. (2013). Transintestinal cholesterol excretion is an active metabolic process modulated by PCSK9 and statin involving ABCB1. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *33*, 1484–1493.

Lee, C.S., Penberthy, K.K., Wheeler, K.M., Juncadella, I.J., Vandenabeele, P., Lysiak, J.J., and Ravichandran, K.S. (2016). Boosting Apoptotic Cell Clearance by Colonic Epithelial Cells Attenuates Inflammation In Vivo. Immunity *44*, 807–820.

Lev, S. (2010). Non-vesicular lipid transport by lipid-transfer proteins and beyond. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 739–750.

Lewandowski, D., Barroca, V., Ducongé, F., Bayer, J., Van Nhieu, J.T., Pestourie, C., Fouchet, P., Tavitian, B., and Roméo, P.-H. (2010). In vivo cellular imaging pinpoints the role of reactive oxygen species in the early steps of adult hematopoietic reconstitution. Blood *115*, 443–452.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat. Rev. Immunol. *7*, 678–689.

Li, J., and Pfeffer, S.R. (2016). Lysosomal membrane glycoproteins bind cholesterol and contribute to lysosomal cholesterol export. eLife *5*.

Li, A.C., Binder, C.J., Gutierrez, A., Brown, K.K., Plotkin, C.R., Pattison, J.W., Valledor, A.F., Davis, R.A., Willson, T.M., Witztum, J.L., et al. (2004). Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. J. Clin. Invest. *114*, 1564–1576.

Li, Y., Gerbod-Giannone, M.-C., Seitz, H., Cui, D., Thorp, E., Tall, A.R., Matsushima, G.K., and Tabas, I. (2006). Cholesterol-induced apoptotic macrophages elicit an inflammatory response in phagocytes, which is partially attenuated by the Mer receptor. J. Biol. Chem. *281*, 6707–6717.

Liao, X., Sluimer, J.C., Wang, Y., Subramanian, M., Brown, K., Pattison, J.S., Robbins, J., Martinez, J., and Tabas, I. (2012). Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis. Cell Metab. *15*, 545–553.

Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. Nature *420*, 868–874.

Lichtenstein, L., Serhan, N., Espinosa-Delgado, S., Fabre, A., Annema, W., Tietge, U.J.F., Robaye, B., Boeynaems, J.-M., Laffargue, M., Perret, B., et al. (2015). Increased atherosclerosis in

P2Y13/apolipoprotein E double-knockout mice: contribution of P2Y13 to reverse cholesterol transport. Cardiovasc. Res. *106*, 314–323.

Linder, M.D., Mäyränpää, M.I., Peränen, J., Pietilä, T.E., Pietiäinen, V.M., Uronen, R.-L., Olkkonen, V.M., Kovanen, P.T., and Ikonen, E. (2009). Rab8 regulates ABCA1 cell surface expression and facilitates cholesterol efflux in primary human macrophages. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *29*, 883–888.

de la Llera-Moya, M., Rothblat, G.H., Connelly, M.A., Kellner-Weibel, G., Sakr, S.W., Phillips, M.C., and Williams, D.L. (1999). Scavenger receptor BI (SR-BI) mediates free cholesterol flux independently of HDL tethering to the cell surface. J. Lipid Res. *40*, 575–580.

Llodra, J., Angeli, V., Liu, J., Trogan, E., Fisher, E.A., and Randolph, G.J. (2004). Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. Proceedings of the National Academy of Sciences *101*, 11779–11784.

Lorkowski, S., Rust, S., Engel, T., Jung, E., Tegelkamp, K., Galinski, E.A., Assmann, G., and Cullen, P. (2001). Genomic sequence and structure of the human ABCG1 (ABC8) gene. Biochem. Biophys. Res. Commun. *280*, 121–131.

Lu, R., Arakawa, R., Ito-Osumi, C., Iwamoto, N., and Yokoyama, S. (2008). ApoA-I facilitates ABCA1 recycle/accumulation to cell surface by inhibiting its intracellular degradation and increases HDL generation. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *28*, 1820–1824.

Lucas, M., Stuart, L.M., Zhang, A., Hodivala-Dilke, K., Febbraio, M., Silverstein, R., Savill, J., and Lacy-Hulbert, A. (2006). Requirements for apoptotic cell contact in regulation of macrophage responses. J. Immunol. *177*, 4047–4054.

Luo, B., Gan, W., Liu, Z., Shen, Z., Wang, J., Shi, R., Liu, Y., Liu, Y., Jiang, M., Zhang, Z., et al. (2016). Erythropoeitin Signaling in Macrophages Promotes Dying Cell Clearance and Immune Tolerance. Immunity *44*, 287–302.

Lusa, S., Jauhiainen, M., Metso, J., Somerharju, P., and Ehnholm, C. (1996). The mechanism of human plasma phospholipid transfer protein-induced enlargement of high-density lipoprotein particles: evidence for particle fusion. Biochem. J. *313 (Pt 1)*, 275–282.

M

Mäkinen, P.I., Lappalainen, J.P., Heinonen, S.E., Leppänen, P., Lähteenvuo, M.T., Aarnio, J.V., Heikkilä, J., Turunen, M.P., and Ylä-Herttuala, S. (2010). Silencing of either SR-A or CD36 reduces atherosclerosis in hyperlipidaemic mice and reveals reciprocal upregulation of these receptors. Cardiovasc. Res. *88*, 530–538.

Malerød, L., Juvet, K., Gjøen, T., and Berg, T. (2002). The expression of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and caveolin-1 in parenchymal and nonparenchymal liver cells. Cell Tissue Res. *307*, 173–180.

Manel, N., Kim, F.J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M., and Battini, J.-L. (2003). The Ubiquitous Glucose Transporter GLUT-1 Is a Receptor for HTLV. Cell *115*, 449–459.

Manning-Tobin, J.J., Moore, K.J., Seimon, T.A., Bell, S.A., Sharuk, M., Alvarez-Leite, J.I., de Winther, M.P.J., Tabas, I., and Freeman, M.W. (2009). Loss of SR-A and CD36 Activity Reduces Atherosclerotic Lesion Complexity Without Abrogating Foam Cell Formation in Hyperlipidemic Mice. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *29*, 19–26.

Mantel, C., Messina-Graham, S., and Broxmeyer, H.E. (2010). Upregulation of nascent mitochondrial biogenesis in mouse hematopoietic stem cells parallels upregulation of CD34 and loss of pluripotency: A potential strategy for reducing oxidative risk in stem cells. Cell Cycle *9*, 2008–2017.

Martinet, W., Schrijvers, D.M., and De Meyer, G.R.Y. (2011). Necrotic cell death in atherosclerosis. Basic Res. Cardiol. *106*, 749–760.

Martinez, F.O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. Annu. Rev. Immunol. *27*, 451–483.

Martinez, J., Almendinger, J., Oberst, A., Ness, R., Dillon, C.P., Fitzgerald, P., Hengartner, M.O., and Green, D.R. (2011). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 17396–17401.

Martinez, J., Cunha, L.D., Park, S., Yang, M., Lu, Q., Orchard, R., Li, Q.-Z., Yan, M., Janke, L., Guy, C., et al. (2016). Noncanonical autophagy inhibits the autoinflammatory, lupus-like response to dying cells. Nature *533*, 115–119.

Martinez, L.O., Jacquet, S., Esteve, J.-P., Rolland, C., Cabezón, E., Champagne, E., Pineau, T., Georgeaud, V., Walker, J.E., Tercé, F., et al. (2003). Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. Nature *421*, 75–79.

Maugeais, C., Tietge, U.J.F., Broedl, U.C., Marchadier, D., Cain, W., McCoy, M.G., Lund-Katz, S., Glick, J.M., and Rader, D.J. (2003). Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase. Circulation *108*, 2121–2126.

Maxfield, F.R., and Menon, A.K. (2006). Intracellular sterol transport and distribution. Current Opinion in Cell Biology *18*, 379–385.

Maxfield, F.R., and Tabas, I. (2005). Role of cholesterol and lipid organization in disease. Nature *438*, 612–621.

Maxfield, F.R., and Wüstner, D. (2002). Intracellular cholesterol transport. Journal of Clinical Investigation *110*, 891–898.

Mei, C., Chen, Z., Liao, Y., Wang, Y., Peng, H., and Chen, Y. (2007). Interleukin-10 inhibits the down-regulation of ATP binding cassette transporter A1 by tumour necrosis factor-alpha in THP-1 macrophage-derived foam cells. Cell Biol. Int. *31*, 1456–1461.

Mei, S., Gu, H., Ward, A., Yang, X., Guo, H., He, K., Liu, Z., and Cao, W. (2012). p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) promotes cholesterol ester accumulation in macrophages through inhibition of macroautophagy. J. Biol. Chem. *287*, 11761–11768.

Mendez, A.J., Lin, G., Wade, D.P., Lawn, R.M., and Oram, J.F. (2001). Membrane lipid domains distinct from cholesterol/sphingomyelin-rich rafts are involved in the ABCA1-mediated lipid secretory pathway. J. Biol. Chem. *276*, 3158–3166.

Ménégaut, L., Thomas, C., Lagrost, L., and Masson, D. (2017). Fatty acid metabolism in macrophages: a target in cardio-metabolic diseases. Curr. Opin. Lipidol. *28*, 19–26.

Mesmin, B., Pipalia, N.H., Lund, F.W., Ramlall, T.F., Sokolov, A., Eliezer, D., and Maxfield, F.R. (2011). STARD4 abundance regulates sterol transport and sensing. Mol. Biol. Cell *22*, 4004–4015.

Meurs, I., Lammers, B., Zhao, Y., Out, R., Hildebrand, R.B., Hoekstra, M., Van Berkel, T.J.C., and Van Eck, M. (2012). The effect of ABCG1 deficiency on atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice depends on the stage of atherogenesis. Atherosclerosis *221*, 41–47.

Miharada, K., Karlsson, G., Rehn, M., Rörby, E., Siva, K., Cammenga, J., and Karlsson, S. (2011). Cripto regulates hematopoietic stem cells as a hypoxic-niche-related factor through cell surface receptor GRP78. Cell Stem Cell *9*, 330–344.

Miksa, M., Amin, D., Wu, R., Ravikumar, T.S., and Wang, P. (2007). Fractalkine-induced MFG-E8 leads to enhanced apoptotic cell clearance by macrophages. Mol. Med. *13*, 553–560.

Mills, E.L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A.S.H., Varma, M., Bryant, C.E., Tourlomousis, P., Däbritz, J.H.M., Gottlieb, E., Latorre, I., et al. (2016). Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. Cell *167*, 457–470.e13.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *27*, 107–132.

Moestrup, S.K., and Nielsen, L.B. (2005). The role of the kidney in lipid metabolism. Curr. Opin. Lipidol. *16*, 301–306.

Mogilenko, D.A., Orlov, S.V., Trulioff, A.S., Ivanov, A.V., Nagumanov, V.K., Kudriavtsev, I.V., Shavva, V.S., Tanyanskiy, D.A., and Perevozchikov, A.P. (2012). Endogenous apolipoprotein A-I stabilizes ATP-binding cassette transporter A1 and modulates Toll-like receptor 4 signaling in human macrophages. The FASEB Journal *26*, 2019–2030.

Moore, K.J., and Freeman, M.W. (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *26*, 1702–1711.

Moore, K.J., and Tabas, I. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. Cell *145*, 341–355.

Moore, K.J., Kunjathoor, V.V., Koehn, S.L., Manning, J.J., Tseng, A.A., Silver, J.M., McKee, M., and Freeman, M.W. (2005). Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice. Journal of Clinical Investigation *115*, 2192–2201.

Moore, K.J., Sheedy, F.J., and Fisher, E.A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. Nat. Rev. Immunol. *13*, 709–721.

Morris, G.E., Braund, P.S., Moore, J.S., Samani, N.J., Codd, V., and Webb, T.R. (2017). Coronary Artery Disease-AssociatedLIPACoding Variant rs1051338 Reduces Lysosomal Acid Lipase Levels and Activity in Lysosomes. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *37*, 1050–1057.

Morrison, S.J., and Scadden, D.T. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. Nature *505*, 327–334.

Morrison, S.J., and Spradling, A.C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell *132*, 598–611.

Mosser, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. J. Leukoc. Biol. *73*, 209–212.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat. Rev. Immunol. *8*, 958–969.

Mukhamedova, N., Fu, Y., Bukrinsky, M., Remaley, A.T., and Sviridov, D. (2007). The role of different regions of ATP-binding cassette transporter A1 in cholesterol efflux. Biochemistry *46*, 9388–9398.

Mukundan, L., Odegaard, J.I., Morel, C.R., Heredia, J.E., Mwangi, J.W., Ricardo-Gonzalez, R.R., Goh, Y.P.S., Eagle, A.R., Dunn, S.E., Awakuni, J.U.H., et al. (2009). PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. Nat. Med. *15*, 1266–1272.

Munehira, Y., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Furuya, A., Shitara, K., Imamura, M., Yokota, T., Takeda, S. ’ichi, Amachi, T., Matsuo, M., et al. (2004). α1-Syntrophin Modulates Turnover of ABCA1. Journal of Biological Chemistry *279*, 15091–15095.

Murata, M., Peränen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T.V., and Simons, K. (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *92*, 10339–10343.

Murphy, A.J., Akhtari, M., Tolani, S., Pagler, T., Bijl, N., Kuo, C.-L., Wang, M., Sanson, M., Abramowicz, S., Welch, C., et al. (2011). ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. Journal of Clinical Investigation *121*, 4138–4149.

N

Nagao, K., Zhao, Y., Takahashi, K., Kimura, Y., and Ueda, K. (2009). Sodium taurocholate-dependent lipid efflux by ABCA1: effects of W590S mutation on lipid translocation and apolipoprotein A-I dissociation. Journal of Lipid Research *50*, 1165–1172.

Nagata, K.O., Nakada, C., Kasai, R.S., Kusumi, A., and Ueda, K. (2013). ABCA1 dimer-monomer interconversion during HDL generation revealed by single-molecule imaging. Proceedings of the National Academy of Sciences *110*, 5034–5039.

Nahrendorf, M., and Swirski, F.K. (2016). Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function. Circulation Research *119*, 414–417.

Nakada, D., Saunders, T.L., and Morrison, S.J. (2010). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. Nature *468*, 653–658.

Nandi, S., Ma, L., Denis, M., Karwatsky, J., Li, Z., Jiang, X.-C., and Zha, X. (2009). ABCA1-mediated cholesterol efflux generates microparticles in addition to HDL through processes governed by membrane rigidity. Journal of Lipid Research *50*, 456–466.

Neal, B., Perkovic, V., Mahaffey, K.W., de Zeeuw, D., Fulcher, G., Erondu, N., Shaw, W., Law, G., Desai, M., and Matthews, D.R. (2017). Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. New England Journal of Medicine *377*, 644–657.

Neufeld, E.B., Remaley, A.T., Demosky, S.J., Stonik, J.A., Cooney, A.M., Comly, M., Dwyer, N.K., Zhang, M., Blanchette-Mackie, J., Santamarina-Fojo, S., et al. (2001). Cellular Localization and Trafficking of the Human ABCA1 Transporter. Journal of Biological Chemistry *276*, 27584–27590.

Neufeld, E.B., Demosky, S.J., Stonik, J.A., Combs, C., Remaley, A.T., Duverger, N., Santamarina-Fojo, S., and Brewer, H.B. (2002). The ABCA1 transporter functions on the basolateral surface of hepatocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. *297*, 974–979.

Nicholls, S.J., Brewer, H.B., Kastelein, J.J.P., Krueger, K.A., Wang, M.-D., Shao, M., Hu, B., McErlean, E., and Nissen, S.E. (2011). Effects of the CETP Inhibitor Evacetrapib Administered as Monotherapy or in Combination With Statins on HDL and LDL Cholesterol: A Randomized Controlled Trial. JAMA *306*.

Nielsen, M.J., Møller, H.J., and Moestrup, S.K. (2010). Hemoglobin and Heme Scavenger Receptors. Antioxidants & Redox Signaling *12*, 261–273.

Nomura, M., Liu, J., Rovira, I.I., Gonzalez-Hurtado, E., Lee, J., Wolfgang, M.J., and Finkel, T. (2016). Fatty acid oxidation in macrophage polarization. Nature Immunology *17*, 216–217.

Norddahl, G.L., Pronk, C.J., Wahlestedt, M., Sten, G., Nygren, J.M., Ugale, A., Sigvardsson, M., and Bryder, D. (2011). Accumulating mitochondrial DNA mutations drive premature hematopoietic aging phenotypes distinct from physiological stem cell aging. Cell Stem Cell *8*, 499–510.

Nurnberg, S.T., Zhang, H., Hand, N.J., Bauer, R.C., Saleheen, D., Reilly, M.P., and Rader, D.J. (2016). From Loci to Biology: Functional Genomics of Genome-Wide Association for Coronary Disease. Circ. Res. *118*, 586–606.

O

Oburoglu, L., Tardito, S., Fritz, V., de Barros, S.C., Merida, P., Craveiro, M., Mamede, J., Cretenet, G., Mongellaz, C., An, X., et al. (2014). Glucose and glutamine metabolism regulate human hematopoietic stem cell lineage specification. Cell Stem Cell *15*, 169–184.

Ocaña-Guzman, R., Torre-Bouscoulet, L., and Sada-Ovalle, I. (2016). TIM-3 Regulates Distinct Functions in Macrophages. Frontiers in Immunology *7*.

Ogura, S., Kakino, A., Sato, Y., Fujita, Y., Iwamoto, S., Otsui, K., Yoshimoto, R., and Sawamura, T. (2009). Lox-1: the multifunctional receptor underlying cardiovascular dysfunction. Circ. J. *73*, 1993–1999.

Ohashi, R., Mu, H., Wang, X., Yao, Q., and Chen, C. (2005). Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. QJM: An International Journal of Medicine *98*, 845–856.

Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., Kawai, T., Kase, T., Keshi, H., Sakai, Y., Fukuoh, A., Sakamoto, T., Itabe, H., et al. (2001). The Membrane-type Collectin CL-P1 Is a Scavenger Receptor on Vascular Endothelial Cells. Journal of Biological Chemistry *276*, 44222–44228.

Okuhira, K., Fitzgerald, M.L., Sarracino, D.A., Manning, J.J., Bell, S.A., Goss, J.L., and Freeman, M.W. (2005). Purification of ATP-binding Cassette Transporter A1 and Associated Binding Proteins Reveals the Importance of β1-Syntrophin in Cholesterol Efflux. Journal of Biological Chemistry *280*, 39653–39664.

Olkkonen, V.M., and Li, S. (2013). Oxysterol-binding proteins: sterol and phosphoinositide sensors coordinating transport, signaling and metabolism. Prog. Lipid Res. *52*, 529–538.

Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., and Nagasawa, T. (2010). The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. Immunity *33*, 387–399.

O'Neill, L.A.J., Kishton, R.J., and Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. Nat. Rev. Immunol. *16*, 553–565.

Öörni, K., and Kovanen, P.T. (2009). Lipoprotein modification by secretory phospholipase A2 enzymes contributes to the initiation and progression of atherosclerosis: Current Opinion in Lipidology *20*, 421–427.

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. Journal of Biological Chemistry *275*, 34508–34511.

Ory, D.S. (2004). Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home? Circ. Res. *95*, 660–670.

Ouimet, M., and Marcel, Y.L. (2012). Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from macrophage foam cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *32*, 575–581.

Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I., and Marcel, Y.L. (2011). Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. Cell Metab. *13*, 655–667.

Out, R., Hoekstra, M., Meurs, I., de Vos, P., Kuiper, J., Van Eck, M., and Van Berkel, T.J.C. (2007). Total body ABCG1 expression protects against early atherosclerotic lesion development in mice. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *27*, 594–599.

Out, R., Jessup, W., Le Goff, W., Hoekstra, M., Gelissen, I.C., Zhao, Y., Kritharides, L., Chimini, G., Kuiper, J., Chapman, M.J., et al. (2008a). Coexistence of foam cells and hypocholesterolemia in mice lacking the ABC transporters A1 and G1. Circ. Res. *102*, 113–120.

Out, R., Hoekstra, M., Habets, K., Meurs, I., de Waard, V., Hildebrand, R.B., Wang, Y., Chimini, G., Kuiper, J., Van Berkel, T.J.C., et al. (2008b). Combined deletion of macrophage ABCA1 and ABCG1 leads to massive lipid accumulation in tissue macrophages and distinct atherosclerosis at relatively low plasma cholesterol levels. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *28*, 258–264.

P

Paalvast, Y., de Boer, J.F., and Groen, A.K. (2017). Developments in intestinal cholesterol transport and triglyceride absorption. Curr. Opin. Lipidol. *28*, 248–254.

Pagler, T.A., Rhode, S., Neuhofer, A., Laggner, H., Strobl, W., Hinterndorfer, C., Volf, I., Pavelka, M., Eckhardt, E.R.M., van der Westhuyzen, D.R., et al. (2006). SR-BI-mediated High Density Lipoprotein (HDL) Endocytosis Leads to HDL Resecretion Facilitating Cholesterol Efflux. Journal of Biological Chemistry *281*, 11193–11204.

Panousis, C.G., and Zuckerman, S.H. (2000). Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *20*, 1565–1571.

Parathath, S., Yang, Y., Mick, S., and Fisher, E.A. (2013). Hypoxia in murine atherosclerotic plaques and its adverse effects on macrophages. Trends Cardiovasc. Med. *23*, 80–84.

Park, D., Tosello-Trampont, A.-C., Elliott, M.R., Lu, M., Haney, L.B., Ma, Z., Klibanov, A.L., Mandell, J.W., and Ravichandran, K.S. (2007). BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. Nature *450*, 430–434.

Park, D., Han, C.Z., Elliott, M.R., Kinchen, J.M., Trampont, P.C., Das, S., Collins, S., Lysiak, J.J., Hoehn, K.L., and Ravichandran, K.S. (2011). Continued clearance of apoptotic cells critically depends on the phagocyte Ucp2 protein. Nature *477*, 220–224.

Patel, S., Drew, B.G., Nakhla, S., Duffy, S.J., Murphy, A.J., Barter, P.J., Rye, K.-A., Chin-Dusting, J., Hoang, A., Sviridov, D., et al. (2009). Reconstituted high-density lipoprotein increases plasma high-density lipoprotein anti-inflammatory properties and cholesterol efflux capacity in patients with type 2 diabetes. J. Am. Coll. Cardiol. *53*, 962–971.

Penberthy, K.K., and Ravichandran, K.S. (2016). Apoptotic cell recognition receptors and scavenger receptors. Immunol. Rev. *269*, 44–59.

Philippidis, P., Mason, J.C., Evans, B.J., Nadra, I., Taylor, K.M., Haskard, D.O., and Landis, R.C. (2004). Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme

oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. Circ. Res. *94*, 119–126.

Phillips, M.C. (2014). Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. J. Biol. Chem. *289*, 24020–24029.

Phillips, M.C. (2018). Is ABCA1 a Lipid Transfer Protein? Journal of Lipid Research jlr.R082313.

Phillips, M.C., Johnson, W.J., and Rothblat, G.H. (1987). Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. Biochim. Biophys. Acta *906*, 223–276.

Pietras, E.M., Reynaud, D., Kang, Y.-A., Carlin, D., Calero-Nieto, F.J., Leavitt, A.D., Stuart, J.M., Göttgens, B., and Passegué, E. (2015). Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. Cell Stem Cell *17*, 35–46.

Porsch-Özcürümez, M., Langmann, T., Heimerl, S., Borsukova, H., Kaminski, W.E., Drobnik, W., Honer, C., Schumacher, C., and Schmitz, G. (2001). The Zinc Finger Protein 202 (ZNF202) Is a Transcriptional Repressor of ATP Binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 Gene Expression and a Modulator of Cellular Lipid Efflux. Journal of Biological Chemistry *276*, 12427–12433.

Porter, F.D., and Herman, G.E. (2011). Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. J. Lipid Res. *52*, 6–34.

Potteaux, S., Gautier, E.L., Hutchison, S.B., van Rooijen, N., Rader, D.J., Thomas, M.J., Sorci-Thomas, M.G., and Randolph, G.J. (2011). Suppressed monocyte recruitment drives macrophage removal from atherosclerotic plaques of Apoe–/– mice during disease regression. Journal of Clinical Investigation *121*, 2025–2036.

Q

Qian, H., Zhao, X., Cao, P., Lei, J., Yan, N., and Gong, X. (2017). Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1. Cell 169, 1228–1239.e10.

Qu, Y., Misaghi, S., Newton, K., Gilmour, L.L., Louie, S., Cupp, J.E., Dubyak, G.R., Hackos, D., and Dixit, V.M. (2011). Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. J. Immunol. *186*, 6553–6561.

R

Rader, D.J., Cohen, J., and Hobbs, H.H. (2003). Monogenic hypercholesterolemia: new insights in pathogenesis and treatment. J. Clin. Invest. *111*, 1795–1803.

Rader, D.J., Alexander, E.T., Weibel, G.L., Billheimer, J., and Rothblat, G.H. (2009). The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. J. Lipid Res. *50 Suppl*, S189-194.

Rahman, K., Vengrenyuk, Y., Ramsey, S.A., Vila, N.R., Girgis, N.M., Liu, J., Gusarova, V., Gromada, J., Weinstock, A., Moore, K.J., et al. (2017). Inflammatory Ly6Chi monocytes and their conversion to M2 macrophages drive atherosclerosis regression. Journal of Clinical Investigation *127*, 2904–2915.

Rajavashisth, T., Qiao, J.H., Tripathi, S., Tripathi, J., Mishra, N., Hua, M., Wang, X.P., Loussararian, A., Clinton, S., Libby, P., et al. (1998). Heterozygous osteopetrotic (op) mutation reduces atherosclerosis in LDL receptor- deficient mice. Journal of Clinical Investigation *101*, 2702–2710.

Randolph, G.J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R.M., and Muller, W.A. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. Science *282*, 480–483.

Ravichandran, K.S. (2011). Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. Immunity *35*, 445–455.

Rayner, K.J., Suárez, Y., Dávalos, A., Parathath, S., Fitzgerald, M.L., Tamehiro, N., Fisher, E.A., Moore, K.J., and Fernández-Hernando, C. (2010). MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. Science *328*, 1570–1573.

Razani, B., Feng, C., Coleman, T., Emanuel, R., Wen, H., Hwang, S., Ting, J.P., Virgin, H.W., Kastan, M.B., and Semenkovich, C.F. (2012). Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. Cell Metab. *15*, 534–544.

Reiner, Ž., Guardamagna, O., Nair, D., Soran, H., Hovingh, K., Bertolini, S., Jones, S., Ćorić, M., Calandra, S., Hamilton, J., et al. (2014). Lysosomal acid lipase deficiency--an under-recognized cause of dyslipidaemia and liver dysfunction. Atherosclerosis *235*, 21–30.

Remaley, A.T., Stonik, J.A., Demosky, S.J., Neufeld, E.B., Bocharov, A.V., Vishnyakova, T.G., Eggerman, T.L., Patterson, A.P., Duverger, N.J., Santamarina-Fojo, S., et al. (2001). Apolipoprotein Specificity for Lipid Efflux by the Human ABCAI Transporter. Biochemical and Biophysical Research Communications *280*, 818–823.

Repa, J.J., and Mangelsdorf, D.J. (1999). Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism. Curr. Opin. Biotechnol. *10*, 557–563.

Repa, J.J., Turley, S.D., Lobaccaro, J.A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R.A., Dietschy, J.M., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. Science *289*, 1524–1529.

Ridker, P.M., Everett, B.M., Thuren, T., MacFadyen, J.G., Chang, W.H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S.D., et al. (2017). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. New England Journal of Medicine *377*, 1119–1131.

Rigot, V., Hamon, Y., Chambenoit, O., Alibert, M., Duverger, N., and Chimini, G. (2002). Distinct sites on ABCA1 control distinct steps required for cellular release of phospholipids. Journal of Lipid Research *43*, 2077–2086.

Robbins, C.S., Chudnovskiy, A., Rauch, P.J., Figueiredo, J.-L., Iwamoto, Y., Gorbatov, R., Etzrodt, M., Weber, G.F., Ueno, T., van Rooijen, N., et al. (2012). Extramedullary hematopoiesis generates Ly-6C(high) monocytes that infiltrate atherosclerotic lesions. Circulation *125*, 364–374.

Robbins, C.S., Hilgendorf, I., Weber, G.F., Theurl, I., Iwamoto, Y., Figueiredo, J.-L., Gorbatov, R., Sukhova, G.K., Gerhardt, L.M.S., Smyth, D., et al. (2013). Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. Nat. Med. *19*, 1166–1172.

Rodriguez-Agudo, D., Ren, S., Wong, E., Marques, D., Redford, K., Gil, G., Hylemon, P., and Pandak, W.M. (2008). Intracellular cholesterol transporter StarD4 binds free cholesterol and increases cholesteryl ester formation. J. Lipid Res. *49*, 1409–1419.

Rodriguez-Agudo, D., Calderon-Dominguez, M., Ren, S., Marques, D., Redford, K., Medina-Torres, M.A., Hylemon, P., Gil, G., and Pandak, W.M. (2011). Subcellular localization and regulation of StarD4 protein in macrophages and fibroblasts. Biochim. Biophys. Acta *1811*, 597–606.

Röhrl, C., and Stangl, H. (2013). HDL endocytosis and resecretion. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids *1831*, 1626–1633.

Roma-Lavisse, C., Tagzirt, M., Zawadzki, C., Lorenzi, R., Vincentelli, A., Haulon, S., Juthier, F., Rauch, A., Corseaux, D., Staels, B., et al. (2015). M1 and M2 macrophage proteolytic and angiogenic profile analysis in atherosclerotic patients reveals a distinctive profile in type 2 diabetes. Diab Vasc Dis Res *12*, 279–289.

Rosenson, R.S., Brewer, H.B., Davidson, W.S., Fayad, Z.A., Fuster, V., Goldstein, J., Hellerstein, M., Jiang, X.-C., Phillips, M.C., Rader, D.J., et al. (2012). Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. Circulation *125*, 1905–1919.

Ross, S., Gerstein, H.C., Eikelboom, J., Anand, S.S., Yusuf, S., and Paré, G. (2015). Mendelian randomization analysis supports the causal role of dysglycaemia and diabetes in the risk of coronary artery disease. Eur. Heart J. *36*, 1454–1462.

Roszer, T., Menéndez-Gutiérrez, M.P., Lefterova, M.I., Alameda, D., Núñez, V., Lazar, M.A., Fischer, T., and Ricote, M. (2011). Autoimmune kidney disease and impaired engulfment of apoptotic cells in mice with macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma or retinoid X receptor alpha deficiency. J. Immunol. *186*, 621–631.

Rothlin, C.V., Ghosh, S., Zuniga, E.I., Oldstone, M.B.A., and Lemke, G. (2007). TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. Cell *131*, 1124–1136.

Roussel, R., d'Emden, M.C., Fisher, M., Ampudia-Blasco, F.J., Stella, P., Bizet, F., Cali, A.M.G., and Wysham, C.H. (2018). Glycaemic control and hypoglycaemia in people with type 2 diabetes switching from twice-daily basal insulin to once-daily insulin glargine 300 U/mL or insulin glargine 100 U/mL (EDITION 1 and EDITION 2 subgroup analysis). Diabetes Obes Metab *20*, 448–452.

S

Sabatine, M.S., Giugliano, R.P., Keech, A.C., Honarpour, N., Wiviott, S.D., Murphy, S.A., Kuder, J.F., Wang, H., Liu, T., Wasserman, S.M., et al. (2017). Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. New England Journal of Medicine *376*, 1713–1722.

Saederup, N., Chan, L., Lira, S.A., and Charo, I.F. (2008). Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2-/- mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. Circulation *117*, 1642–1648.

Sando, G.N., and Henke, V.L. (1982). Recognition and receptor-mediated endocytosis of the lysosomal acid lipase secreted by cultured human fibroblasts. J. Lipid Res. *23*, 114–123.

Sandri, M. (2012). FOXOphagy path to inducing stress resistance and cell survival. Nat. Cell Biol. *14*, 786–788.

Santamarina-Fojo, S., Peterson, K., Knapper, C., Qiu, Y., Freeman, L., Cheng, J.-F., Osorio, J., Remaley, A., Yang, X.-P., Haudenschild, C., et al. (2000). Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: Analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. Proceedings of the National Academy of Sciences *97*, 7987–7992.

Santamarina-Fojo, S., González-Navarro, H., Freeman, L., Wagner, E., and Nong, Z. (2004). Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *24*, 1750–1754.

Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., et al. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. Science *325*, 473–477.

Sarrazy, V., Viaud, M., Westerterp, M., Ivanov, S., Giorgetti-Peraldi, S., Guinamard, R., Gautier, E.L., Thorp, E.B., De Vivo, D.C., and Yvan-Charvet, L. (2016). Disruption of Glut1 in Hematopoietic Stem

Cells Prevents Myelopoiesis and Enhanced Glucose Flux in Atheromatous Plaques of ApoE(-/-) Mice. Circ. Res. *118*, 1062–1077.

Savill, J., and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature *407*, 784–788.

Schlager, S., Vujic, N., Korbelius, M., Duta-Mare, M., Dorow, J., Leopold, C., Rainer, S., Wegscheider, M., Reicher, H., Ceglarek, U., et al. (2017). Lysosomal lipid hydrolysis provides substrates for lipid mediator synthesis in murine macrophages. Oncotarget *8*, 40037–40051.

Schmitz, G., and Langmann, T. (2005). Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression. Biochim. Biophys. Acta *1735*, 1–19.

Schmitz, G., Langmann, T., and Heimerl, S. (2001). Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. J. Lipid Res. *42*, 1513–1520.

Schmitz, G., Heimerl, S., and Langmann, T. (2004). Zinc finger protein ZNF202 structure and function in transcriptional control of HDL metabolism. Curr. Opin. Lipidol. *15*, 199–208.

Schneider, J.G., Yang, Z., Chakravarthy, M.V., Lodhi, I.J., Wei, X., Turk, J., and Semenkovich, C.F. (2010). Macrophage Fatty-acid Synthase Deficiency Decreases Diet-induced Atherosclerosis. Journal of Biological Chemistry *285*, 23398–23409.

Schrijvers, D.M. (2005). Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages Is Impaired in Atherosclerosis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *25*, 1256–1261.

Schuchman, E.H., and Wasserstein, M.P. (2015). Types A and B Niemann-Pick disease. Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. *29*, 237–247.

Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E.W., Pollard, J.W., et al. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. Science *336*, 86–90.

Schutters, K., Kusters, D.H.M., Chatrou, M.L.L., Montero-Melendez, T., Donners, M., Deckers, N.M., Krysko, D.V., Vandenabeele, P., Perretti, M., Schurgers, L.J., et al. (2013). Cell surface-expressed phosphatidylserine as therapeutic target to enhance phagocytosis of apoptotic cells. Cell Death Differ. *20*, 49–56.

Scott, R.S., McMahon, E.J., Pop, S.M., Reap, E.A., Caricchio, R., Cohen, P.L., Earp, H.S., and Matsushima, G.K. (2001). Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. Nature *411*, 207–211.

Scott, S.A., Liu, B., Nazarenko, I., Martis, S., Kozlitina, J., Yang, Y., Ramirez, C., Kasai, Y., Hyatt, T., Peter, I., et al. (2013). Frequency of the cholesteryl ester storage disease common LIPA E8SJM mutation (c.894G>A) in various racial and ethnic groups. Hepatology *58*, 958–965.

Seitz, H.M., Camenisch, T.D., Lemke, G., Earp, H.S., and Matsushima, G.K. (2007). Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. J. Immunol. *178*, 5635–5642.

Semba, H., Takeda, N., Isagawa, T., Sugiura, Y., Honda, K., Wake, M., Miyazawa, H., Yamaguchi, Y., Miura, M., Jenkins, D.M.R., et al. (2016). HIF-1α-PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity. Nature Communications *7*, 11635.

Sen, P., Wallet, M.A., Yi, Z., Huang, Y., Henderson, M., Mathews, C.E., Earp, H.S., Matsushima, G., Baldwin, A.S., and Tisch, R.M. (2007). Apoptotic cells induce Mer tyrosine kinase-dependent blockade of NF-kappaB activation in dendritic cells. Blood *109*, 653–660.

Serbina, N.V., and Pamer, E.G. (2006). Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. Nat. Immunol. *7*, 311–317.

Settembre, C., De Cegli, R., Mansueto, G., Saha, P.K., Vetrini, F., Visvikis, O., Huynh, T., Carissimo, A., Palmer, D., Klisch, T.J., et al. (2013). TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. Nat. Cell Biol. *15*, 647–658.

Shah, P.K. (2007). Molecular mechanisms of plaque instability. Curr. Opin. Lipidol. *18*, 492–499.

Sharif, M.N., Sosic, D., Rothlin, C.V., Kelly, E., Lemke, G., Olson, E.N., and Ivashkiv, L.B. (2006). Twist mediates suppression of inflammation by type I IFNs and Axl. J. Exp. Med. *203*, 1891–1901.

Sheedy, F.J., Grebe, A., Rayner, K.J., Kalantari, P., Ramkhelawon, B., Carpenter, S.B., Becker, C.E., Ediriweera, H.N., Mullick, A.E., Golenbock, D.T., et al. (2013). CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. Nat. Immunol. *14*, 812–820.

Sheriff, S., Du, H., and Grabowski, G.A. (1995). Characterization of Lysosomal Acid Lipase by Site-directed Mutagenesis and Heterologous Expression. Journal of Biological Chemistry *270*, 27766–27772.

Shi, C., and Pamer, E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. Nat. Rev. Immunol. *11*, 762–774.

Shirai, T., Nazarewicz, R.R., Wallis, B.B., Yanes, R.E., Watanabe, R., Hilhorst, M., Tian, L., Harrison, D.G., Giacomini, J.C., Assimes, T.L., et al. (2016). The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease. J. Exp. Med. *213*, 337–354.

Silverstein, R.L., and Febbraio, M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. Sci Signal *2*, re3.

Simon, M.C., Liu, L., Barnhart, B.C., and Young, R.M. (2008). Hypoxia-induced signaling in the cardiovascular system. Annu. Rev. Physiol. *70*, 51–71.

Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R.J., Mahmoud, A.I., Olson, E.N., Schneider, J.W., Zhang, C.C., and Sadek, H.A. (2010). The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. Cell Stem Cell *7*, 380–390.

Singaraja, R.R., James, E.R., Crim, J., Visscher, H., Chatterjee, A., and Hayden, M.R. (2005). Alternate transcripts expressed in response to diet reflect tissue-specific regulation of ABCA1. J. Lipid Res. *46*, 2061–2071.

Singaraja, R.R., Visscher, H., James, E.R., Chroni, A., Coutinho, J.M., Brunham, L.R., Kang, M.H., Zannis, V.I., Chimini, G., and Hayden, M.R. (2006). Specific mutations in ABCA1 have discrete effects on ABCA1 function and lipid phenotypes both in vivo and in vitro. Circ. Res. *99*, 389–397.

Singaraja, R.R., Kang, M.H., Vaid, K., Sanders, S.S., Vilas, G.L., Arstikaitis, P., Coutinho, J., Drisdel, R.C., El-Husseini, A.E.D., Green, W.N., et al. (2009). Palmitoylation of ATP-binding cassette transporter A1 is essential for its trafficking and function. Circ. Res. *105*, 138–147.

Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., and Czaja, M.J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. Nature *458*, 1131–1135.

Smart, E.J., Ying, Y. s, Donzell, W.C., and Anderson, R.G. (1996). A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. J. Biol. Chem. *271*, 29427–29435.

Soccio, R.E., Adams, R.M., Maxwell, K.N., and Breslow, J.L. (2005). Differential Gene Regulation of StarD4 and StarD5 Cholesterol Transfer Proteins: ACTIVATION OF StarD4 BY STEROL REGULATORY ELEMENT-BINDING PROTEIN-2 AND StarD5 BY ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS. Journal of Biological Chemistry *280*, 19410–19418.

Song, C., Kokontis, J.M., Hiipakka, R.A., and Liao, S. (1994). Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *91*, 10809–10813.

Spann, N.J., Garmire, L.X., McDonald, J.G., Myers, D.S., Milne, S.B., Shibata, N., Reichart, D., Fox, J.N., Shaked, I., Heudobler, D., et al. (2012). Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. Cell *151*, 138–152.

Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. (1995a). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *15*, 1512–1531.

Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. (1995b). 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.

Stein, E.A., Bays, H., O'Brien, D., Pedicano, J., Piper, E., and Spezzi, A. (2011). Lapaquistat Acetate: Development of a Squalene Synthase Inhibitor for the Treatment of Hypercholesterolemia. Circulation *123*, 1974–1985.

Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. J. Exp. Med. *176*, 287–292.

Stewart, C.R., Stuart, L.M., Wilkinson, K., van Gils, J.M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K.J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W.A., et al. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. Nature Immunology *11*, 155–161.

Stienstra, R., Netea-Maier, R.T., Riksen, N.P., Joosten, L.A.B., and Netea, M.G. (2017). Specific and Complex Reprogramming of Cellular Metabolism in Myeloid Cells during Innate Immune Responses. Cell Metab. *26*, 142–156.

Stitziel, N.O., Fouchier, S.W., Sjouke, B., Peloso, G.M., Moscoso, A.M., Auer, P.L., Goel, A., Gigante, B., Barnes, T.A., Melander, O., et al. (2013). Exome Sequencing and Directed Clinical Phenotyping Diagnose Cholesterol Ester Storage Disease Presenting as Autosomal Recessive Hypercholesterolemia. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *33*, 2909–2914.

Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. Immunity *25*, 977–988.

Sui, Y., Xu, J., Rios-Pilier, J., and Zhou, C. (2011). Deficiency of PXR decreases atherosclerosis in apoE-deficient mice. J. Lipid Res. *52*, 1652–1659.

Sullivan, D.P., Ohvo-Rekilä, H., Baumann, N.A., Beh, C.T., and Menon, A.K. (2006). Sterol trafficking between the endoplasmic reticulum and plasma membrane in yeast. Biochem. Soc. Trans. *34*, 356–358.

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 monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. Journal of Clinical Investigation *117*, 195–205.

Tabas, I. (2002). Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. Journal of Clinical Investigation *110*, 905–911.

Tabas, I. (2005). Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *25*, 2255–2264.

Tabas, I. (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. Nat. Rev. Immunol. *10*, 36–46.

Tacke, F., Alvarez, D., Kaplan, T.J., Jakubzick, C., Spanbroek, R., Llodra, J., Garin, A., Liu, J., Mack, M., van Rooijen, N., et al. (2007). Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. Journal of Clinical Investigation *117*, 185–194.

Takahashi, Y., and Smith, J.D. (1999). Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences *96*, 11358–11363.

Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R.S., Hirao, A., Suematsu, M., et al. (2010). Regulation of the HIF-1alpha level is essential for hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell *7*, 391–402.

Takubo, K., Nagamatsu, G., Kobayashi, C.I., Nakamura-Ishizu, A., Kobayashi, H., Ikeda, E., Goda, N., Rahimi, Y., Johnson, R.S., Soga, T., et al. (2013). Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell *12*, 49–61.

Tall, A.R., and Wang, N. (2000). Tangier disease as a test of the reverse cholesterol transport hypothesis. J. Clin. Invest. *106*, 1205–1207.

Tall, A.R., and Yvan-Charvet, L. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. Nat. Rev. Immunol. *15*, 104–116.

Tall, A.R., Forester, L.R., and Bongiovanni, G.L. (1983). Facilitation of phosphatidylcholine transfer into high density lipoproteins by an apolipoprotein in the density 1.20-1.26 g/ml fraction of plasma. J. Lipid Res. *24*, 277–289.

Tall, A.R., Yvan-Charvet, L., Terasaka, N., Pagler, T., and Wang, N. (2008). HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. Cell Metab. *7*, 365–375.

Tall, A.R., Yvan-Charvet, L., Westerterp, M., and Murphy, A.J. (2012). Cholesterol Efflux: A Novel Regulator of Myelopoiesis and Atherogenesis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *32*, 2547–2552.

Tamehiro, N., Shigemoto-Mogami, Y., Kakeya, T., Okuhira, K., Suzuki, K., Sato, R., Nagao, T., and Nishimaki-Mogami, T. (2007). Sterol Regulatory Element-binding Protein-2- and Liver X Receptor-driven Dual Promoter Regulation of Hepatic ABC Transporter A1 Gene Expression: *MECHANISM UNDERLYING THE UNIQUE RESPONSE TO CELLULAR CHOLESTEROL STATUS*. Journal of Biological Chemistry *282*, 21090–21099.

Tanaka, A.R., Abe-Dohmae, S., Ohnishi, T., Aoki, R., Morinaga, G., Okuhira, K., Ikeda, Y., Kano, F., Matsuo, M., Kioka, N., et al. (2003). Effects of Mutations of ABCA1 in the First Extracellular Domain on Subcellular Trafficking and ATP Binding/Hydrolysis. Journal of Biological Chemistry *278*, 8815–8819.

Tang, C., Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2004). Janus kinase 2 modulates the apolipoprotein interactions with ABCA1 required for removing cellular cholesterol. J. Biol. Chem. *279*, 7622–7628.

Tang, C., Vaughan, A.M., Anantharamaiah, G.M., and Oram, J.F. (2006). Janus kinase 2 modulates the lipid-removing but not protein-stabilizing interactions of amphipathic helices with ABCA1. J. Lipid Res. *47*, 107–114.

Tape, C., and Kisilevsky, R. (1990). Apolipoprotein A-I and apolipoprotein SAA half-lives during acute inflammation and amyloidogenesis. Biochim. Biophys. Acta *1043*, 295–300.

Tarhda, Z., and Ibrahimi, A. (2015). Insight into the mechanism of lipids binding and uptake by CD36 receptor. Bioinformation *11*, 302–306.

Tarling, E.J., and Edwards, P.A. (2011). ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 19719–19724.

Tawakol, A., Singh, P., Mojena, M., Pimentel-Santillana, M., Emami, H., MacNabb, M., Rudd, J.H.F., Narula, J., Enriquez, J.A., Traves, P.G., et al. (2015). HIF-1 and PFKFB3 Mediate a Tight Relationship Between Proinflammatory Activation and Anerobic Metabolism in Atherosclerotic Macrophages. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *35*, 1463–1471.

Thorp, E., and Tabas, I. (2009). Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis. Journal of Leukocyte Biology *86*, 1089–1095.

Thorp, E., Li, Y., Bao, L., Yao, P.M., Kuriakose, G., Rong, J., Fisher, E.A., and Tabas, I. (2009). Brief Report: Increased Apoptosis in Advanced Atherosclerotic Lesions of Apoe-/- Mice Lacking Macrophage Bcl-2. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *29*, 169–172.

Thorp, E., Subramanian, M., and Tabas, I. (2011). The role of macrophages and dendritic cells in the clearance of apoptotic cells in advanced atherosclerosis. Eur. J. Immunol. *41*, 2515–2518.

Tietjen, I., Hovingh, G.K., Singaraja, R., Radomski, C., McEwen, J., Chan, E., Mattice, M., Legendre, A., Kastelein, J.J.P., and Hayden, M.R. (2012). Increased risk of coronary artery disease in Caucasians with extremely low HDL cholesterol due to mutations in ABCA1, APOA1, and LCAT. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids *1821*, 416–424.

Tolani, S., Pagler, T.A., Murphy, A.J., Bochem, A.E., Abramowicz, S., Welch, C., Nagareddy, P.R., Holleran, S., Hovingh, G.K., Kuivenhoven, J.A., et al. (2013). Hypercholesterolemia and reduced HDL-C promote hematopoietic stem cell proliferation and monocytosis: studies in mice and FH children. Atherosclerosis *229*, 79–85.

Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., Lee, B.H., Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I.R., Sears, C., et al. (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. Cell *128*, 325–339.

Trogan, E., Choudhury, R.P., Dansky, H.M., Rong, J.X., Breslow, J.L., and Fisher, E.A. (2002). Laser capture microdissection analysis of gene expression in macrophages from atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. Proceedings of the National Academy of Sciences *99*, 2234–2239.

Trompier, D., Alibert, M., Davanture, S., Hamon, Y., Pierres, M., and Chimini, G. (2006). Transition from Dimers to Higher Oligomeric Forms Occurs during the ATPase Cycle of the ABCA1 Transporter. Journal of Biological Chemistry *281*, 20283–20290.

Truman, L.A., Ford, C.A., Pasikowska, M., Pound, J.D., Wilkinson, S.J., Dumitriu, I.E., Melville, L., Melrose, L.A., Ogden, C.A., Nibbs, R., et al. (2008). CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. Blood *112*, 5026–5036.

Tsuchiya, K., Westerterp, M., Murphy, A.J., Subramanian, V., Ferrante, A.W., Tall, A.R., and Accili, D. (2013). Expanded granulocyte/monocyte compartment in myeloid-specific triple FoxO knockout increases oxidative stress and accelerates atherosclerosis in mice. Circ. Res. *112*, 992–1003.

V

Van den Bossche, J., O'Neill, L.A., and Menon, D. (2017). Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? Trends Immunol. *38*, 395–406.

Van Vré, E.A., Ait-Oufella, H., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2012). Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *32*, 887–893.

Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2003). ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. Journal of Lipid Research *44*, 1373–1380.

Vedhachalam, C., Duong, P.T., Nickel, M., Nguyen, D., Dhanasekaran, P., Saito, H., Rothblat, G.H., Lund-Katz, S., and Phillips, M.C. (2007). Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. J. Biol. Chem. *282*, 25123–25130.

van der Veen, J.N., van Dijk, T.H., Vrins, C.L.J., van Meer, H., Havinga, R., Bijsterveld, K., Tietge, U.J.F., Groen, A.K., and Kuipers, F. (2009). Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. J. Biol. Chem. *284*, 19211–19219.

van der Velde, A.E., Vrins, C.L.J., van den Oever, K., Kunne, C., Oude Elferink, R.P.J., Kuipers, F., and Groen, A.K. (2007). Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. Gastroenterology *133*, 967–975.

Venkateswaran, A., Repa, J.J., Lobaccaro, J.-M.A., Bronson, A., Mangelsdorf, D.J., and Edwards, P.A. (2000). Human White/Murine ABC8 mRNA Levels Are Highly Induced in Lipid-loaded Macrophages: A TRANSCRIPTIONAL ROLE FOR SPECIFIC OXYSTEROLS. Journal of Biological Chemistry *275*, 14700–14707.

Vergeer, M., Korporaal, S.J.A., Franssen, R., Meurs, I., Out, R., Hovingh, G.K., Hoekstra, M., Sierts, J.A., Dallinga-Thie, G.M., Motazacker, M.M., et al. (2011). Genetic Variant of the Scavenger Receptor BI in Humans. New England Journal of Medicine *364*, 136–145.

Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., and Ottenhoff, T.H.M. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences *101*, 4560–4565.

W

Wan, X., Huo, Y., Johns, M., Piper, E., Mason, J.C., Carling, D., Haskard, D.O., and Boyle, J.J. (2013). 5'-AMP-activated protein kinase-activating transcription factor 1 cascade modulates human monocyte-derived macrophages to atheroprotective functions in response to heme or metformin. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *33*, 2470–2480.

Wang, G.L., and Semenza, G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J. Biol. Chem. *270*, 1230–1237.

Wang, Y., and Oram, J.F. (2002). Unsaturated fatty acids inhibit cholesterol efflux from macrophages by increasing degradation of ATP-binding cassette transporter A1. J. Biol. Chem. *277*, 5692–5697.

Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *92*, 5510–5514.

Wang, N., Silver, D.L., Costet, P., and Tall, A.R. (2000). Specific Binding of ApoA-I, Enhanced Cholesterol Efflux, and Altered Plasma Membrane Morphology in Cells Expressing ABC1. Journal of Biological Chemistry *275*, 33053–33058.

Wang, N., Silver, D.L., Thiele, C., and Tall, A.R. (2001). ATP-binding Cassette Transporter A1 (ABCA1) Functions as a Cholesterol Efflux Regulatory Protein. Journal of Biological Chemistry *276*, 23742–23747.

Wang, N., Chen, W., Linsel-Nitschke, P., Martinez, L.O., Agerholm-Larsen, B., Silver, D.L., and Tall, A.R. (2003). A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. J. Clin. Invest. *111*, 99–107.

Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., and Tall, A.R. (2004). ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 9774–9779.

Wang, X., Yamamoto, Y., Wilson, L.H., Zhang, T., Howitt, B.E., Farrow, M.A., Kern, F., Ning, G., Hong, Y., Khor, C.C., et al. (2015). Cloning and variation of ground state intestinal stem cells. Nature *522*, 173–178.

Wanschel, A., Seibert, T., Hewing, B., Ramkhelawon, B., Ray, T.D., van Gils, J.M., Rayner, K.J., Feig, J.E., O'Brien, E.R., Fisher, E.A., et al. (2013). Neuroimmune guidance cue Semaphorin 3E is expressed in atherosclerotic plaques and regulates macrophage retention. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *33*, 886–893.

Weigert, A., Johann, A.M., von Knethen, A., Schmidt, H., Geisslinger, G., and Brüne, B. (2006). Apoptotic cells promote macrophage survival by releasing the antiapoptotic mediator sphingosine-1-phosphate. Blood *108*, 1635–1642.

Weigert, A., Tzieply, N., von Knethen, A., Johann, A.M., Schmidt, H., Geisslinger, G., and Brune, B. (2007). Tumor Cell Apoptosis Polarizes Macrophages Role of Sphingosine-1-Phosphate. Molecular Biology of the Cell *18*, 3810–3819.

Weigert, A., Weis, N., and Brüne, B. (2009). Regulation of macrophage function by sphingosine-1-phosphate. Immunobiology *214*, 748–760.

Weis, N., Weigert, A., von Knethen, A., and Brune, B. (2009). Heme Oxygenase-1 Contributes to an Alternative Macrophage Activation Profile Induced by Apoptotic Cell Supernatants. Molecular Biology of the Cell *20*, 1280–1288.

Weissglas-Volkov, D., and Pajukanta, P. (2010). Genetic causes of high and low serum HDL-cholesterol. J. Lipid Res. *51*, 2032–2057.

Wellington, C.L., Walker, E.K.Y., Suarez, A., Kwok, A., Bissada, N., Singaraja, R., Yang, Y.-Z., Zhang, L.-H., James, E., Wilson, J.E., et al. (2002). ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. Lab. Invest. *82*, 273–283.

Westerterp, M., Berbée, J.F.P., Pires, N.M.M., van Mierlo, G.J.D., Kleemann, R., Romijn, J.A., Havekes, L.M., and Rensen, P.C.N. (2007). Apolipoprotein C-I is crucially involved in lipopolysaccharide-induced atherosclerosis development in apolipoprotein E-knockout mice. Circulation *116*, 2173–2181.

Westerterp, M., Gourion-Arsiquaud, S., Murphy, A.J., Shih, A., Cremers, S., Levine, R.L., Tall, A.R., and Yvan-Charvet, L. (2012). Regulation of hematopoietic stem and progenitor cell mobilization by cholesterol efflux pathways. Cell Stem Cell *11*, 195–206.

Westerterp, M., Murphy, A.J., Wang, M., Pagler, T.A., Vengrenyuk, Y., Kappus, M.S., Gorman, D.J., Nagareddy, P.R., Zhu, X., Abramowicz, S., et al. (2013). Deficiency of ATP-binding cassette transporters A1 and G1 in macrophages increases inflammation and accelerates atherosclerosis in mice. Circ. Res. *112*, 1456–1465.

Westerterp, M., Fotakis, P., Ouimet, M., Bochem, A.E., Zhang, H., Molusky, M.M., Wang, W., Abramowicz, S., la Bastide-van Gemert, S., Wang, N., et al. (2018). Cholesterol Efflux Pathways Suppress Inflammasome Activation, NETosis and Atherogenesis. Circulation.

Wiersma, H., Nijstad, N., de Boer, J.F., Out, R., Hogewerf, W., Van Berkel, T.J., Kuipers, F., and Tietge, U.J.F. (2009). Lack of Abcg1 results in decreased plasma HDL cholesterol levels and increased biliary cholesterol secretion in mice fed a high cholesterol diet. Atherosclerosis *206*, 141–147.

Wild, P.S., Zeller, T., Schillert, A., Szymczak, S., Sinning, C.R., Deiseroth, A., Schnabel, R.B., Lubos, E., Keller, T., Eleftheriadis, M.S., et al. (2011). A genome-wide association study identifies LIPA as a susceptibility gene for coronary artery disease. Circ Cardiovasc Genet *4*, 403–412.

Willy, P.J., Umesono, K., Ong, E.S., Evans, R.M., Heyman, R.A., and Mangelsdorf, D.J. (1995). LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. Genes Dev. *9*, 1033–1045.

Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., et al. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. Cell *135*, 1118–1129.

Woollard, K., and Chin-Dusting, J. (2007). Therapeutic Targeting of P-Selectin in Atherosclerosis. Inflammation & Allergy-Drug Targets *6*, 69–74.

Woollard, K.J., and Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. Nat Rev Cardiol *7*, 77–86.

Wright, D.E., Wagers, A.J., Gulati, A.P., Johnson, F.L., and Weissman, I.L. (2001). Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. Science *294*, 1933–1936.

X

Xie, S., Lee, Y.-F., Kim, E., Chen, L.-M., Ni, J., Fang, L.-Y., Liu, S., Lin, S.-J., Abe, J. -i., Berk, B., et al. (2009). TR4 nuclear receptor functions as a fatty acid sensor to modulate CD36 expression and foam cell formation. Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 13353–13358.

Xu, Y., Wang, W., Zhang, L., Qi, L.-P., Li, L.-Y., Chen, L.-F., Fang, Q., Dang, A.-M., and Yan, X.-W. (2011). A polymorphism in the ABCG1 promoter is functionally associated with coronary artery disease in a Chinese Han population. Atherosclerosis *219*, 648–654.

Y

Yamamoto, S., Yancey, P.G., Zuo, Y., Ma, L.-J., Kaseda, R., Fogo, A.B., Ichikawa, I., Linton, M.F., Fazio, S., and Kon, V. (2011). Macrophage Polarization by Angiotensin II-Type 1 Receptor Aggravates Renal Injury-Acceleration of Atherosclerosis. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *31*, 2856–2864.

Yang, Y., Wang, Y.-F., Yang, X.-F., Wang, Z.-H., Lian, Y.-T., Yang, Y., Li, X.-W., Gao, X., Chen, J., Shu, Y.-W., et al. (2013). Specific Kv1.3 blockade modulates key cholesterol-metabolism-associated molecules in human macrophages exposed to ox-LDL. J. Lipid Res. *54*, 34–43.

Ylitalo, R., Oksala, O., Ylä-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.

Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., et al. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. Immunity *38*, 79–91.

Yu, W.-M., Liu, X., Shen, J., Jovanovic, O., Pohl, E.E., Gerson, S.L., Finkel, T., Broxmeyer, H.E., and Qu, C.-K. (2013). Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. Cell Stem Cell *12*, 62–74.

Yusuf, R.Z., and Scadden, D.T. (2012). Fate through fat: lipid metabolism determines stem cell division outcome. Cell Metab. *16*, 411–413.

Yvan-Charvet, L., Ranalletta, M., Wang, N., Han, S., Terasaka, N., Li, R., Welch, C., and Tall, A.R. (2007a). Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. Journal of Clinical Investigation.

Yvan-Charvet, L., Bobard, A., Bossard, P., Massiéra, F., Rousset, X., Ailhaud, G., Teboul, M., Ferré, P., Dagher, G., and Quignard-Boulangé, A. (2007b). In vivo evidence for a role of adipose tissue SR-BI in the nutritional and hormonal regulation of adiposity and cholesterol homeostasis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *27*, 1340–1345.

Yvan-Charvet, L., Welch, C., Pagler, T.A., Ranalletta, M., Lamkanfi, M., Han, S., Ishibashi, M., Li, R., Wang, N., and Tall, A.R. (2008). Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. Circulation *118*, 1837–1847.

Yvan-Charvet, L., Kling, J., Pagler, T., Li, H., Hubbard, B., Fisher, T., Sparrow, C.P., Taggart, A.K., and Tall, A.R. (2010a). Cholesterol Efflux Potential and Antiinflammatory Properties of High-Density Lipoprotein After Treatment With Niacin or Anacetrapib. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *30*, 1430–1438.

Yvan-Charvet, L., Pagler, T., Gautier, E.L., Avagyan, S., Siry, R.L., Han, S., Welch, C.L., Wang, N., Randolph, G.J., Snoeck, H.W., et al. (2010b). ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. Science *328*, 1689–1693.

Z

Zaccardi, F., Webb, D.R., Htike, Z.Z., Youssef, D., Khunti, K., and Davies, M.J. (2016). Efficacy and safety of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors in type 2 diabetes mellitus: systematic review and network meta-analysis. Diabetes Obes Metab *18*, 783–794.

Zannis, V.I., and Breslow, J.L. (1985). Genetic mutations affecting human lipoprotein metabolism. Adv. Hum. Genet. *14*, 125–215, 383–386.

Zannis, V.I., Chroni, A., Kypreos, K.E., Kan, H.-Y., Cesar, T.B., Zanni, E.E., and Kardassis, D. (2004). Probing the pathways of chylomicron and HDL metabolism using adenovirus-mediated gene transfer. Curr. Opin. Lipidol. *15*, 151–166.

Zanotti, I., Favari, E., and Bernini, F. (2012). Cellular cholesterol efflux pathways: impact on intracellular lipid trafficking and methodological considerations. Curr Pharm Biotechnol *13*, 292–302.

Zernecke, A., Shagdarsuren, E., and Weber, C. (2008). Chemokines in Atherosclerosis: An Update. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology *28*, 1897–1908.

Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., et al. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature *425*, 836–841.

Zhu, S.-N., Chen, M., Jongstra-Bilen, J., and Cybulsky, M.I. (2009). GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions. The Journal of Experimental Medicine *206*, 2141–2149.

Zhu, X., Owen, J.S., Wilson, M.D., Li, H., Griffiths, G.L., Thomas, M.J., Hiltbold, E.M., Fessler, M.B., and Parks, J.S. (2010). Macrophage ABCA1 reduces MyD88-dependent Toll-like receptor trafficking to lipid rafts by reduction of lipid raft cholesterol. J. Lipid Res. *51*, 3196–3206.

Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. J. Leukoc. Biol. *81*, 584–592.

Zigmond, E., Samia-Grinberg, S., Pasmanik-Chor, M., Brazowski, E., Shibolet, O., Halpern, Z., and Varol, C. (2014). Infiltrating Monocyte-Derived Macrophages and Resident Kupffer Cells Display Different Ontogeny and Functions in Acute Liver Injury. The Journal of Immunology *193*, 344–353.

Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J.M., Fitchett, D., Bluhmki, E., Hantel, S., Mattheus, M., Devins, T., Johansen, O.E., Woerle, H.J., et al. (2015a). Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. New England Journal of Medicine *373*, 2117–2128.

Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J.M., Fitchett, D., Bluhmki, E., Hantel, S., Mattheus, M., Devins, T., Johansen, O.E., Woerle, H.J., et al. (2015b). Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. N. Engl. J. Med. *373*, 2117–2128.

Zizzo, G., and Cohen, P.L. (2013). IL-17 Stimulates Differentiation of Human Anti-Inflammatory Macrophages and Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils in Response to IL-10 and Glucocorticoids. The Journal of Immunology *190*, 5237–5246.

Zizzo, G., Hilliard, B.A., Monestier, M., and Cohen, P.L. (2012). Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction. J. Immunol. *189*, 3508–3520.

Zoghbi, M.E., and Altenberg, G.A. (2014). ATP binding to two sites is necessary for dimerization of nucleotide-binding domains of ABC proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications *443*, 97–102.