

Université de Montréal

Caractérisation des mécanismes responsables des effets variables du récepteur des lipoprotéines de faible densité sur l'intégrité des cellules endothéliales lymphatiques

Par

Ali Smaani

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences (M.Sc.) Biomédicales, option sciences cardiovasculaires

janvier 2020

© Ali Smaani, 2020

Université de Montréal

Unité académique : Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

Caractérisation des mécanismes responsables des effets variables du récepteur des lipoprotéines de faible densité sur l'intégrité des cellules endothéliales lymphatiques

Présenté par

Ali Smaani

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Matthieu Ruiz

Président-rapporteur

Catherine Martel

Directeur de recherche

Sylvie Marleau

Membre du jury

Résumé

Le système lymphatique joue un rôle clé dans le transport du cholestérol hors de la paroi artérielle et une dysfonction lymphatique précède l'apparition de l'athérosclérose. Cette dysfonction est associée à une diminution de l'expression du récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDLR) et est à priori indépendante des taux de cholestérol circulant. Il a été démontré que les souris dépourvues de la proprotéine subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9), une proprotéine qui mène à la dégradation du LDLR, ont une fonction lymphatique améliorée, tandis que les souris dépourvues de LDLR développent une dysfonction lymphatique. Nous visons maintenant à mieux comprendre les mécanismes par lesquels la présence de PCSK9 dans la lymphe ou la modulation du LDLR sur les cellules endothéliales lymphatiques (CEL) affecte la fonction lymphatique. Les CEL sont incubées avec du PCSK9 ou traitées avec un ARN inhibant spécifiquement l'expression du LDLR afin d'évaluer comment la présence de PCSK9 ou la modulation du LDLR affecte l'intégrité des CEL. Nos résultats démontrent que le PCSK9 n'induit pas la sécrétion de cytokines inflammatoires et n'affecte pas l'expression des marqueurs lymphatiques. L'inhibition de l'expression du LDLR entraîne une diminution des marqueurs lymphatiques membranaires endothéliaux. La diminution du LDLR a aussi entraîné une diminution des taux de certains lipides intracellulaires et en particulier des phospholipides, des sphingolipides et des triglycérides. Ces résultats suggèrent qu'une perte du LDLR, mais pas la présence de PCSK9 en circulation, pourrait induire à une altération de l'endothélium lymphatique causée par une diminution de l'expression de protéines membranaires essentielles au bon transport de la lymphe.

Mots-clés : Récepteur au LDL, lymphatiques, cellules endothéliales, athérosclérose

Abstract

The lymphatic system plays a key role in the removal of cholesterol from the artery wall and lymphatic dysfunction is known to occur prior to the onset of atherosclerosis. This dysfunction is associated with reduced expression of the low-density-lipoprotein receptor (LDLR) and is first independent of circulating cholesterol levels. It has been shown that mice lacking proprotein subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), a proprotein that degrades LDLR, have improved lymphatic function while mice lacking LDLR had a lymphatic dysfunction. We now aim to better understand the mechanisms by which the presence of PCSK9 in lymph or the modulation of LDLR on lymphatic endothelial cells (LECs) affects lymphatic function. Incubation of LECs with PCSK9 and specific targeting of LDLR expression with silencing RNAs were used to further evaluate how PCSK9 or modulation of LDLR affect the metabolism and integrity of LECs. Our results demonstrate that PCSK9 does not induce the secretion of inflammatory cytokines and does not affect the expression of lymphatic markers. LDLR silencing RNA leads to a decrease of membrane-bound lymphatic endothelial cell markers. A decrease in LDLR expression also led to a decrease in the content of some intracellular lipids and particularly phospholipids, sphingolipids and triglycerides. These results suggest that loss of LDLR expression, but not circulating PCSK9, could lead to alterations in the lymphatic endothelium caused by loss of membrane integrity which could in turn affect lymph transport.

Keywords : LDL receptor, lymphatics, endothelial cells, atherosclerosis

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des figures	8
Liste des abréviations.....	9
Dédicace.....	11
Remerciements.....	12
Chapitre 1 : Introduction.....	13
1.1 Le récepteur au LDL.....	14
1.1.1 Régulation de l'expression du LDLR.....	15
1.2 LDL, LDLR, PCSK9 et maladies cardiovasculaires	17
1.2.1 Hypercholestérolémie familiale.....	17
1.2.2 Athérosclérose	18
1.2.2.1 Mécanismes moléculaires de l'athérosclérose.....	18
1.2.3 HDL et transport inverse du cholestérol.....	21
1.2.4 Thérapies pour contrer l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose.....	23
1.3 Le système lymphatique	24
1.3.1 Rôle du système lymphatique dans l'athérosclérose	24
1.3.2 Morphologie et fonctions du système lymphatique.....	25
1.3.3 Marqueurs lymphatiques.....	26
1.3.3.1 VEGFR3	26
1.3.3.2 Prox1	27
1.3.3.3 LYVE-1	27
1.3.3.4 Podoplanine	28
1.3.3.5 FOXC2.....	28
1.4 Mise en contexte du projet.....	29
1.5 Hypothèses et objectifs	30
1.5.1 Hypothèses.....	30
1.5.2 Objectifs.....	30
Chapitre 2 : Matériel et méthodes.....	32
2.1 Culture cellulaire.....	33
2.1.1 Traitement au PCSK9	33
2.1.2 Traitement aux siARNs.....	33

2.2 Immunofluorescence sur CEL	34
2.3 Immunobuvardage	34
2.3.1 Détection de protéines par immunobuvardage	34
2.3.2 Détection de PCSK9 dans les surnageants de CEL	35
2.4 Cytométrie en flux	35
2.4.1 Préparation des échantillons	35
2.4.2 Détection de protéines membranaires.....	35
2.4.3 Test d'internalisation de LDL fluorescent.....	36
2.4.4 Configuration des paramètres de cytométrie en flux	36
2.4.5 Analyse des expériences de cytométrie en flux.....	37
2.4.6 Mesure de cytokines inflammatoires.....	38
2.5 Détection et quantification d'ARNm par RT-qPCR.....	38
2.5.1 Amorces utilisées.....	39
2.6 Lipidomique non-ciblée par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse de type quadropôle-temps de vol (<i>liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i> ou LC-QTOF-MS)	40
2.6.1 Préparation des cellules.....	40
2.6.2 Extraction des lipides.....	40
2.6.3 Analyse LC-MS	41
2.7 Analyses statistiques	42
Chapitre 3 : Résultats	43
3.1 Les cellules endothéliales lymphatiques humaines expriment le LDLR	44
3.2 Les cellules endothéliales lymphatiques peuvent lier puis internaliser le LDL.....	46
Figure 3.2 Internalisation de LDL natif par les CEL humaines.....	46
3.3 Les cellules endothéliales lymphatiques surexpriment le LDLR en condition de privation de nutriments.....	47
3.4 Les CEL n'expriment pas et ne sécrètent pas de PCSK9	48
3.5 L'expression du LDLR peut être modulée par le PCSK9 exogène	49
3.6 Le PCSK9 n'induit pas la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les cellules endothéliales lymphatiques.....	50
3.7 Le PCSK9 n'affecte pas les taux d'ARNm des marqueurs lymphatiques.....	51
3.8 Le PCSK9 n'affecte pas l'expression des marqueurs lymphatiques membranaires.....	52
3.9 L'expression du LDLR peut être modulée par un siARN spécifique.....	52

3.10 La diminution de l'expression du LDLR affecte les taux d'ARNm de <i>VEGFR3</i> , <i>LYVE1</i> et <i>PDPN</i>	53
3.11 La diminution de l'expression du LDLR diminue l'expression membranaire de LYVE-1 et de la PDPN.....	54
3.12 Une diminution du LDLR membranaire réduit la quantité intracellulaire de différents sous-types de lipides.	55
Chapitre 4 : Discussion, conclusions et perspectives.....	58
4 Discussion	59
4.1 L'expression du LDLR dans les CEL.....	59
4.2 Potentielles interactions entre le LDLR des CEL et les lipoprotéines présentes dans la lymphe.....	60
4.2.1 Interactions entre le LDLR et le HDL	60
4.2.2 Interactions entre le LDLR et le LDL	61
4.3 Mécanisme de régulation de l'expression du LDLR dans les CEL	61
4.4 PCSK9 et fonction lymphatique	62
4.4.1 Origine du PCSK9 en circulation dans la lymphe.....	62
4.4.2 Interactions entre le PCSK9 et les CEL via le LDLR	63
4.4.3 Effets de la présence du PCSK9 sur les CEL	63
4.5 Effet de la diminution du LDLR sur l'expression de marqueurs lymphatiques	64
4.5.1 LYVE-1	64
4.5.2 PDPN	65
4.5.3 VEGFR3	66
4.5.4 FOXC2 et Prox1	67
4.6 Effet de la diminution du LDLR sur les taux de lipides intracellulaires	68
4.6.1 Les phosphatidylcholines.....	68
4.6.2 Les sphingomyélines et les céramides	69
Chapitre 5 : Conclusion et perspectives.....	70
5.1 Conclusion	71
5.2 Perspectives.....	71
5.2.1 Expériences <i>in vitro</i> à compléter	71
5.2.2 Expériences <i>in vivo</i> à venir.....	73
5.2.3 Projet clinique et perspectives thérapeutiques.....	73
Bibliographie.....	75

Liste des figures

Figure 1.1 Internalisation du LDLR ²	15
Figure 1.2 Mécanismes d'internalisation du LDL et du PCSK9 ²⁶	17
Figure 1.3 Apparition et progression d'une plaque athérosclérotique (adapté de ⁶⁸)	20
Figure 1.4 Transport du cholestérol (adapté de ⁷⁶).	22
Figure 1.5 Schématisation de la présence des vaisseaux lymphatiques dans la plaque athérosclérotique (adapté de ⁹⁰)	24
Figure 1.6 Particularités structurales des capillaires lymphatiques et des vaisseaux collecteurs (adapté de ⁹⁵	26
Figure 2.1 Stratégie d'analyse pour les expériences de cytométrie en flux	37
Figure 3.1 Expression du LDLR sur les CEL humaines.....	45
Figure 3.2 Internalisation de LDL natif par les CEL humaines.....	46
Figure 3.3 Effet de la privation de nutriments sur l'expression du LDLR	47
Figure 3.4 Expression et sécrétion de PCSK9 par les CEL humaines.....	48
Figure 3.5 Interaction entre du PCSK9 exogène et les CEL humaines	49
Figure 3.6 Effet du PCSK9 sur la sécrétion de cytokines inflammatoires par les CEL	50
Figure 3.7 Effet du PCSK9 sur les taux d'ARNm des marqueurs lymphatiques	51
Figure 3.8 Effet du PCSK9 sur l'expression de LYVE-1, PDPN et VEGFR3.....	52
Figure 3.9 Modulation du LDLR par des siARN spécifique	53
Figure 3.10 Effet de la diminution du LDLR sur les taux d'ARNm de marqueurs lymphatiques	54
Figure 3.11 Effet de la diminution du LDLR par siARN sur l'expression membranaire de <i>LYVE-1</i> , <i>PDPN</i> et <i>VEGFR3</i>	55
Figure 3.12 Effet de la diminution du LDLR par siARN sur les taux de lipides intracellulaires des CEL.....	57

Liste des abréviations

ABCA1 : *ATP-binding cassette A1*

ABCG1 : *ATP-binding cassette G1*

apoB100 : apolipoprotéine B100

apoA1 : apolipoprotéine A1

CD36 : *cluster of differentiation 36*

CEL : cellules endothéliales lymphatiques

CETP : *cholesteryl ester transfer protein*

CML : cellules musculaires lisses

CMLym : cellules musculaires lymphatiques

CLEC-2 : *c-type lectin-like receptor 2*

FOXC2 : *forkhead box protein C2*

HDL : *high-density lipoprotein* ou lipoprotéine de haute densité

HMVEC-dLyAd : *human Dermal Microvascular Endothelial Cells-Adult*

ICAM-1 : *intercellular adhesion molecule 1*

IDL : *intermediate-density lipoprotein* ou lipoprotéine de densité intermédiaire

IL-6 : Interleukine-6

IL-8 : Interleukine-8

LDL : *low-density lipoprotein* ou lipoprotéine de faible densité

LOX-1 : *lectin-type oxidized LDL receptor*

LYVE-1 : *lymphatic vessel hyaluronan receptor-1*

oxLDL : LDL oxydé

PBS : *phosphate-buffered saline* ou tampon phosphate salin

PCR : *polymerase chain reaction* ou réaction en chaîne par polymérase

PECAM-1 : *platelet endothelial cell adhesion molecule 1*

Prox1 : *prospero homeobox protein 1 receptor*

ROS : *reactive Oxygen species* ou espèces réactives d'oxygène

RT-qPCR : *reverse transcriptase quantitative PCR* ou PCR quantitative par transcriptase inverse

SR : *scavenger receptor*

SREBP : *sterol regulating elements binding protein*

TNF- α : *tumor necrosis factor-alpha* ou facteur de nécrose tumorale-alpha

TNS : *trypsin neutralizing solution* ou solution de neutralisation de trypsine

VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule 1*

VEGFR : *vascular endothelial growth factor receptor*

VLDL : *very-low density lipoprotein* ou lipoprotéine de très faible densité

À mes parents et mon frère pour leur soutien inconditionnel

Remerciements

J'aimerais remercier ma directrice de recherche, la Dre Catherine Martel de m'avoir donné l'opportunité d'évoluer dans son laboratoire dans le cadre de ma maîtrise. Je tiens principalement à la remercier pour son encadrement, sa disponibilité, sa patience et ses conseils qui ont fait de moi un meilleur étudiant et qui m'ont encouragé à poursuivre ma carrière en recherche.

Je tiens également à remercier les membres de mon laboratoire: Andreea Milasan, Gabriel Jean, Maya Farhat, Carl Fortin, François Dallaire et Victoria Le Corvec. Mon parcours n'aurait pas été aussi enrichissant sans votre support et les connaissances que vous m'avez transmises.

Mes plus grands remerciements reviennent à mes parents, Merzouk et Nacera, et mon grand frère, Amar, qui m'ont toujours soutenu de toutes les façons imaginables. Vous m'avez donné une éducation exemplaire et transmis des valeurs et des principes de vie qui ont fait de moi une meilleure personne. Vous m'avez appris à ne jamais baisser les bras et à toujours donner le meilleur de moi-même, peu importe la situation.

Finalement je tiens à remercier les membres de mon comité de révision, les Drs Matthieu Ruiz et Sylvie Marleau, qui ont accepté de donner de leur temps précieux pour lire et corriger ce mémoire.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Le récepteur au LDL

Le récepteur de lipoprotéines de faible densité (*low-density-lipoprotein receptor* ou LDLR) est une glycoprotéine membranaire qui possède plusieurs domaines structuraux lui permettant de lier spécifiquement différentes lipoprotéines via leurs apolipoprotéines^{1, 2}. Les apolipoprotéines sont les composantes structurales qui dictent les fonctions physiologiques des différentes lipoprotéines. Comme son nom l'indique, le rôle principal du LDLR est de lier les particules de LDL qui sont synthétisées par le foie et qui ont pour rôle d'acheminer le cholestérol sous forme estérifiée aux tissus périphériques³. La liaison se fait entre la molécule d'apolipoprotéine B-100 (apoB-100) présente dans une particule de LDL et le domaine N-terminal du LDLR, toujours dans un ratio 1:1⁴. Suite à la liaison, le récepteur est internalisé avec la particule de LDL via des domaines intracellulaires de la membrane plasmique qui sont des puits recouverts de clathrines (*clathrin-coated pits*) spécialisés dans l'internalisation et l'endocytose. Ces domaines permettent une invagination de la membrane plasmique afin de former des vésicules qui initient le transport vers les endosomes dans lesquels le pH acide va favoriser la dissociation entre le LDLR et son ligand le LDL⁵. Le LDLR est ensuite recyclé à la membrane tandis que le LDL est dirigé dans les lysosomes dans lesquels il sera dégradé, ce qui va mener à la relâche des esters de cholestérol contenu dans le LDL (Figure 1). Le cholestérol peut ensuite être stocké, utilisé pour la production de diverses molécules essentielles telles que les hormones stéroïdiennes, l'acide cholique et la vitamine D, ou utilisé dans le maintien de l'intégrité et de la fluidité de la bicouche lipidique qui forme la membrane des organites et des cellules^{6, 7}. Il existe plusieurs autres lipoprotéines composées de différentes protéines (apolipoprotéines) et de lipides leur conférant différents effets physiologiques. Le LDL est la lipoprotéine la plus riche en cholestérol et elle est dérivée des lipoprotéines de très faible densité (*very-low-density lipoproteins*, VLDL) et de densité intermédiaire (*intermediate-density lipoproteins*, IDL). Les VLDL sont produites par le foie et sont riches en triglycérides. Tout comme les particules de LDL, les VLDL possèdent une molécule d'apoB-100 qui compose leur cœur, mais ils contiennent également de l'apolipoprotéine-E (apoE). En se vidant de leurs triglycérides dans les tissus périphériques, les VLDL se transforment en IDL tout en conservant les mêmes apolipoprotéines. Finalement, on retrouve les lipoprotéines de haute densité (*high-density-lipoproteins*, HDL) qui sont riches

en cholestérol et qui ont comme composante principale l'apolipoprotéine A-1 (apoA-1)^{8,9}.

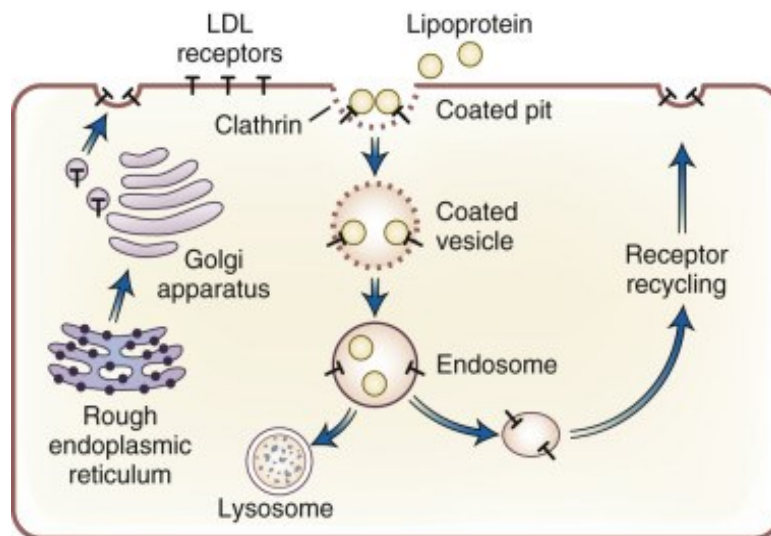


Figure 1.1 Internalisation du LDLR². Le LDL interagit avec le récepteur du LDL présent à la surface et le complexe est internalisé via une vésicule entourée de clathrines. La vésicule perd ses clathrines et devient un endosome. Le complexe se dissocie, le récepteur est recyclé et le LDL est dégradé. En parallèle, il y a synthèse continue du LDLR via le réticulum endoplasmique.¹

1.1.1 Régulation de l'expression du LDLR

Le LDLR est exprimé de façon ubiquitaire. Contrairement aux cellules hépatiques qui utilisent le cholestérol qu'elles synthétisent *de novo* pour répondre à leurs besoins en cholestérol, les autres types cellulaires utilisent plutôt le LDL en circulation¹⁰. Les premiers résultats concernant l'expression du LDLR et l'internalisation du LDL ont été obtenus sur des fibroblastes¹⁰. C'est d'ailleurs dans les fibroblastes qu'il a été démontré que la présence de LDL dans le milieu inhibe l'enzyme responsable de la production de cholestérol intracellulaire : la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (ou HMG-CoA) réductase¹¹⁻¹⁴. Un autre mécanisme de régulation que possèdent ces cellules consiste à diminuer la synthèse et l'expression du LDLR lorsque le LDL est présent en forte quantité et en l'augmentant lorsque le LDL est en faible concentration dans le milieu^{15,16}. Ce mécanisme de régulation passe par les *sterol element binding proteins* (SREBP). Les SREBP sont une

famille de facteurs de transcription qui régulent l'expression de diverses protéines impliquées dans l'homéostasie des lipides et il en existe trois isoformes : la SREBP-1c qui est impliquée dans la synthèse d'acides gras et le métabolisme du glucose, la SREBP-2 qui régule la synthèse de cholestérol et la SREBP-1a qui régule la synthèse d'acides gras et de lipides¹⁷. L'activation de la SREBP-2 commence par une diminution du cholestérol intracellulaire¹⁸, plus spécifiquement dans le réticulum endoplasmique, ce qui va initier le transport de la SREBP-2 vers le noyau¹⁹ afin d'activer la transcription du LDLR²⁰ et de l'HMG-CoA réductase²¹. Les cellules vont ainsi surexprimer le LDLR à la surface et capter des particules de LDL. Inversement, si les niveaux de cholestérol intracellulaires sont élevés, la SREBP-2 reste sous sa forme inactive²².

Toutefois, même si les cellules des tissus périphériques possèdent les mécanismes leur permettant de réguler leur synthèse de cholestérol et de LDLR, il revient aux cellules hépatiques de contrôler les taux de LDL circulant. Des concentrations trop basses ou trop élevées de LDL dans le sang peuvent, dans les deux cas, induire des effets néfastes sur l'organisme qui seront décrits plus tard. En plus de réguler les taux de LDL via l'expression du LDLR, le foie exprime et sécrète la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9), qui est capable de lier le LDLR et de mener à son internalisation et à sa dégradation^{23, 24}. L'expression du PCSK9, tout comme celle du LDLR, est contrôlée au niveau transcriptionnel par la SREBP-2²². Contrairement aux particules de LDL qui se détachent du LDLR dans les endosomes (Figure 1.2A), le pH acide permet un changement conformationnel du PCSK9 qui va augmenter son affinité pour le LDLR²⁵. Le LDLR est ainsi incapable d'être recyclé à la membrane et il se retrouve dégradé dans les lysosomes avec le PCSK9 (Figure 1.2B). En condition physiologique, ce mécanisme a pour but de garder une certaine homéostasie en augmentant la sécrétion de PCSK9 par le foie et en diminuant les niveaux de LDLR dans le cas où les taux de LDL seraient déjà faibles.

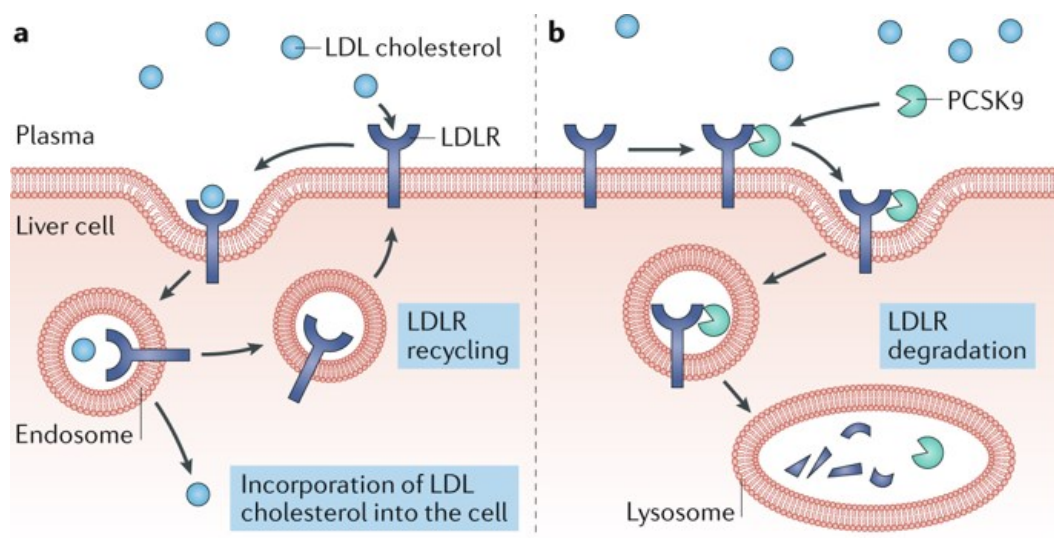


Figure 1.2 Mécanismes d'internalisation du LDL et du PCSK9²⁶. a) Le LDL est internalisé avec le LDLR et le pH acide des endosomes favorise leur dissociation et le recyclage du LDLR. b) Le PCSK9 est internalisé avec le LDLR et le pH acide des endosomes augmente l'affinité du PCSK9 pour le récepteur et le complexe est dirigé vers les lysosomes pour la dégradation.

1.2 LDL, LDLR, PCSK9 et maladies cardiovasculaires

1.2.1 Hypercholestérolémie familiale

L'hypercholestérolémie familiale (HF) est une maladie génétique caractérisée par des niveaux anormalement élevés de LDL dans le sang et est causée par des mutations dans un ou plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, tel que le LDLR, le PCSK9 ou le LDL¹⁰. Une forte hétérogénéité dans le gène du LDLR (environ 1500 variants répertoriés²⁷) a été observée et les mutations diffèrent d'une population à une autre. Les mutations au niveau du LDLR peuvent causer l'absence ou l'anormalité dans la production de la protéine²⁸, un assemblage anormal ou un transport bloqué entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi¹. Ces mutations sont aussi souvent associées à une altération dans le domaine de liaison du LDL qui empêche l'interaction entre le LDLR et son ligand²⁹, un défaut dans l'internalisation du LDLR par les puits recouverts de clathrines³⁰ ou une incapacité du LDLR à se détacher du LDL dans les endosomes et à être recyclé à la membrane³¹. Une autre mutation pouvant empêcher la liaison du LDL à son

récepteur a été identifiée dans l'apoB-100 qui est la lipoprotéine principale du LDL et le domaine qui permet sa liaison au LDLR^{32,33}. La mutation au niveau du PCSK9 entraîne un gain de fonction de la protéine qui va augmenter son affinité pour son récepteur et mener à un taux de dégradation anormal du LDLR^{34,35}. L'HF peut être homozygote (1 personne sur 1 million) ou hétérozygote (1 personne sur 500)³⁶. Les symptômes de maladies cardiovasculaires apparaissent dès l'enfance chez les patients HF homozygotes et les taux de mortalité sont élevés à l'adolescence³⁶. Dans le cas des patients HF hétérozygotes, l'apparition et la gravité des symptômes dépendent des mutations dans le gène du LDLR³⁶. Il est donc primordial de pouvoir déceler l'HF afin d'éviter les complications reliées à l'augmentation des taux de LDL circulant causée par les mutations dans le LDLR.

1.2.2 Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par la formation de plaques dans les artères. L'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires qui en découlent sont la cause de plus de 30% de décès dans les pays développés³⁷⁻³⁹. Ses causes et ses mécanismes d'apparition semblent être bien plus complexes qu'une simple augmentation des taux de LDL en circulation surtout si l'on prend compte le fait que le nombre de décès continue d'augmenter dans les pays développés malgré la réduction de l'hypercholestérolémie^{40, 41}. La pathophysiologie de l'athérosclérose peut impliquer de multiples facteurs génétiques et environnementaux ainsi que l'interaction d'une multitude de molécules provenant de plusieurs organes différents⁴². Il est toutefois bien décrit que l'augmentation de la concentration de LDL plasmatique devient problématique lorsque les particules de LDL commencent à s'accumuler dans les tissus périphériques extrahépatiques, plus particulièrement dans la paroi endothéliale des artères aux embranchements où le flux sanguin est perturbé⁴³. Cette accumulation de LDL dans les artères mènera, avec le temps, à une dysfonction endothéliale et promouvra l'apparition de la plaque athérosclérotique.

1.2.2.1 Mécanismes moléculaires de l'athérosclérose

Pour favoriser la mise en place de la plaque, il faut d'abord que l'endothélium soit endommagé. Il existe plusieurs facteurs de risques qui induisent une dysfonction endothéliale. Les zones d'embranchements sont plus à risques car elles subissent des forces

de cisaillement à cause de la pression artérielle et du flux sanguin⁴³. En plus de fragiliser la paroi endothéliale et d'en augmenter la perméabilité, les forces de cisaillement induisent un phénotype inflammatoire et augmentent la présence de radicaux libres comme les espèces réactives d'oxygènes (*reactive oxygen species* ou ROS)⁴⁴. D'autres facteurs de risques comme le tabagisme, le diabète et l'hypertension peuvent favoriser la dysfonction endothéliale⁴⁴. Cette fragilisation de l'endothélium aura comme effet d'augmenter les taux de LDL qui traversent la paroi endothéliale et de favoriser leur accumulation dans l'intima⁴⁵. Le LDL est par la suite modifié de façon enzymatique (oxygénation des acides gras par la lipoxigénase) ou non enzymatique (glycation de la molécule d'apoB-100) en une forme oxydée (oxLDL)^{38, 46, 47}. Il a été démontré que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses (CML) ainsi que les macrophages (soit les trois types cellulaires avec lesquels le LDL sera en contact dans l'endothélium) peuvent oxyder le LDL⁴⁸⁻⁵². L'accumulation et la modification du LDL dans la paroi artérielle provoquent l'apparition de stries lipidiques, la première observation de l'accumulation de la plaque athérosclérotique³⁸ (Figure 1.3). L'oxydation du LDL entraîne la fragmentation de sa molécule d'apoB-100, empêchant subséquemment la liaison du oxLDL au LDLR⁵³. Les macrophages internalisent le oxLDL grâce à divers récepteurs éboueurs (*scavenger receptors*, SRs) tels que CD36, SR-A1, SR-A2, SR-B1, MARCO ou LOX-1⁵⁴⁻⁶⁰. Il a été démontré que les macrophages internalisent le oxLDL 10 fois plus rapidement que le LDL non-modifié⁵⁴. L'internalisation du cholestérol est initialement importante dans la clairance des lipoprotéines modifiées, mais un déséquilibre entre l'afflux, l'efflux et l'estérification de ce cholestérol conduit à une accumulation massive de cholestérol estérifié dans les macrophages entraînant la formation de cellules spumeuses, ce qui exacerbera la réaction inflammatoire^{54, 55}. Le cholestérol estérifié est stocké dans le cytoplasme sous forme de gouttelettes lipidiques et est en équilibre dynamique avec le cholestérol libre².

L'accumulation des cellules spumeuses entraîne une augmentation du stress oxydatif et de la sécrétion de cytokines/chimiokines, provoquant davantage d'oxydation des LDL, une activation des cellules endothéliales qui se mettent à exprimer davantage de molécules d'adhésion (*Vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1), *Intercellular adhesion molecule* (ICAM-1), *Platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1)), le

recrutement subséquent d'encore plus de monocytes et la formation de cellules spumeuses⁶¹⁻⁶³. La réaction inflammatoire et la lésion athérosclérotique sont aussi aggravées par la présence de plaquettes qui adhèrent à l'endothélium inflammé et dysfonctionnel⁶⁴. Leur activation par la thrombine entraîne la relâche de cytokines inflammatoires et de facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelial growth factor* ou VEGF) qui favorisent encore plus le recrutement de monocytes⁶⁵. La réaction inflammatoire et les dépôts de LDL promeuvent la prolifération cellulaire et le remodelage vasculaire qui, avec le temps, engendrera le rétrécissement de la lumière vasculaire ou favoriser la rupture de la plaque^{64, 66, 67}.

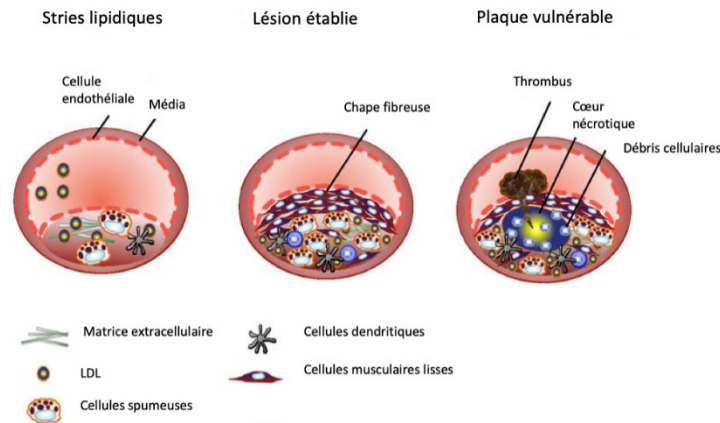


Figure 1.3 Apparition et progression d'une plaque athérosclérotique (adapté de⁶⁸). Les stries lipidiques font référence à l'accumulation de LDL dans l'endothélium vasculaire (plus spécifiquement dans l'intima), favorisant le recrutement de cellules dendritiques et de monocytes. La lésion s'établit lorsque les cellules musculaires lisses et les cellules immunitaires pénètrent dans l'intima et favorisent la rétention de LDL. La paroi peut éventuellement s'amincir et devenir instable, risquant ainsi de rompre.

1.2.3 HDL et transport inverse du cholestérol

Le HDL est considéré comme une lipoprotéine athéroprotectrice. Avoir de faibles taux de HDL est un facteur de risque important dans le développement de maladies cardiovasculaires⁶⁹. Il existe un mécanisme qui est dépendant du HDL et qui permet d'acheminer le cholestérol des macrophages hors de la plaque athérosclérotique. Contrairement au LDL qui achemine le cholestérol aux tissus périphériques, le HDL est responsable d'éliminer l'excès de cholestérol des macrophages qui favorisent la formation de la plaque⁷⁰ (Figure 1.4). Les macrophages possèdent le SR-B1, qui leur permet d'interagir avec le HDL, et l'*ATP binding cassette transporter 1* ou ABCA1 qui permet l'efflux de cholestérol présent dans les macrophages vers la molécule d'apoA1 présente dans le HDL^{71, 72}. Il a été démontré que l'efflux de cholestérol dans des macrophages n'exprimant pas l'ABCA1 était possible, menant ainsi à la découverte de l'*ATP binding cassette G1* ou ABCG1 qui est un autre transporteur qui permet l'efflux de cholestérol^{73, 74}. Le HDL peut ensuite rejoindre la circulation sanguine et interagir avec le foie via son récepteur SR-B1 afin d'y acheminer le cholestérol pour qu'il puisse être éliminé⁷⁵. Ce mécanisme qui consiste à transporter le cholestérol hors de la plaque athérosclérotique vers le foie est appelé transport inverse du cholestérol.

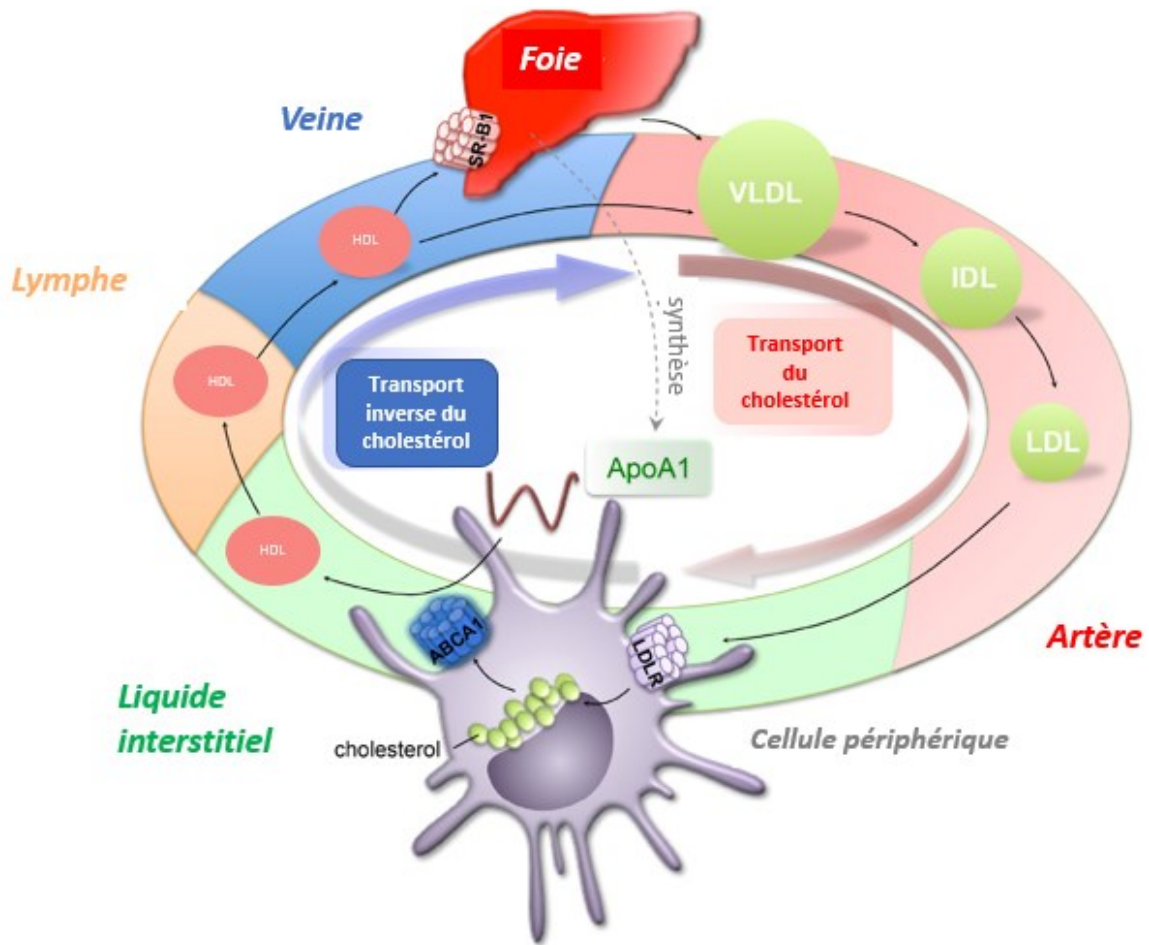


Figure 1.4 Transport du cholestérol (adapté de⁷⁶).

Le transport du cholestérol débute dans le foie qui génère du VLDL qui est relâché dans la circulation. Le VLDL est hydrolysé dans la circulation et devient du IDL puis du LDL, qui est le transporteur principal de cholestérol dans les tissus périphériques. Les cellules périphériques internalisent majoritairement le LDL via leur LDLR. L'excès de cholestérol internalisé sera pris en charge par les particules d'apoA-1 grâce à son l'interaction avec l'ABCA1. L'apoA-1 chargée en cholestérol devient une particule de HDL qui, via le système lymphatique, va transporter le cholestérol jusqu'au foie. Le HDL est internalisé par le foie via le récepteur SR-B1.

1.2.4 Thérapies pour contrer l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose

Les thérapies pour combattre l'apparition et la progression de l'athérosclérose ont principalement pour but de contrôler les niveaux de cholestérol. Les statines sont le traitement le plus commun pour traiter les maladies cardiovasculaires et leur mécanisme d'action principal consiste à bloquer l'HMG-CoA réductase afin de limiter la synthèse de cholestérol par les cellules⁷⁷. Ce faisant, les taux de cholestérol intracellulaires diminuent et l'activation de la SREBP-2 engendrera la surexpression du LDLR afin de diminuer les taux de LDL tel qu'expliqué précédemment. Dix pour cent des patients sont intolérants aux statines à cause des effets secondaires affectant principalement les muscles (par ex. myopathie, myalgie, rhabdomyolyse). Cette intolérance corrèle souvent avec l'augmentation des risques d'infarctus et de maladies coronariennes⁷⁸. Les patients avec hypercholestérolémie familiale sont souvent résistants aux statines et leurs niveaux de LDL restent élevés malgré le traitement⁷⁹. D'autre part, des études cliniques prometteuses avaient pour objectif d'augmenter les niveaux de HDL en inhibant la protéine de transfert des esters de cholestérol (*cholesteryl ester transfer protein* ou CETP). La CETP a pour fonction de transférer le cholestérol contenu dans le HDL vers les VLDL et les LDL et son inhibition permet d'augmenter les taux de HDL et de diminuer les taux de LDL. Les inhibiteurs de CETP permettraient en théorie de favoriser le transport inverse du cholestérol et limiter la formation de plaque athérosclérotique⁸⁰. Bien que les résultats des essais cliniques aient démontré une augmentation des taux de HDL circulants chez les patients, cette augmentation ne s'est pas traduite par une diminution d'évènements cardiaques dans l'ensemble des sujets traités^{81, 82}. Des essais cliniques ont été arrêtés car les inhibiteurs de CETP n'avait pas réduit le risque d'évènements cardiaques, ou parce qu'ils avaient augmenté le risque de mortalité et d'évènements cardiaques⁸³. Le traitement à la niacine est une autre thérapie qui est connu pour augmenter le HDL et diminuer le LDL⁸⁴. Ce traitement a montré des effets bénéfiques en réduisant le nombre d'évènements cardiaques mais il est accompagné de plusieurs effets secondaires (par ex. des palpitations, la goutte et l'hépatite) qui restreignent sa prescription⁸⁵.

1.3 Le système lymphatique

1.3.1 Rôle du système lymphatique dans l'athérosclérose

Les recherches dans le domaine de l'athérosclérose ont été redirigées sur le chemin que le HDL emprunte dans le transport inverse du cholestérol⁸⁶. La lymphe est riche en lipoprotéines, en particulier le HDL^{87, 88}. Dans la dernière décennie, il a été démontré que le transport inverse du cholestérol inclut un nouveau joueur clé dans son processus : le système lymphatique. Ainsi, pour quitter la paroi des vaisseaux sanguins, le cholestérol contenu dans les macrophages doit d'abord rejoindre les vaisseaux lymphatiques présents dans l'adventice au niveau de la plaque athérosclérotique avant de rejoindre la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière (Figure 1.5)⁸⁹. Il a été démontré que sans réseau lymphatique fonctionnel, le cholestérol peut difficilement quitter la paroi athérosclérotique.

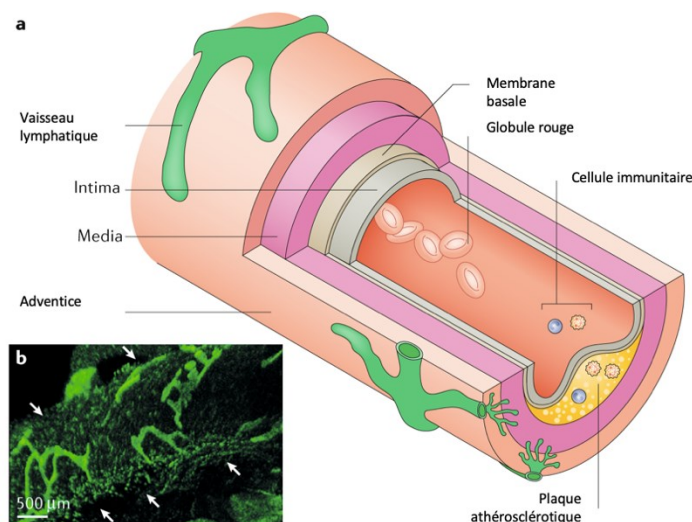


Figure 1.5 Schématisation de la présence des vaisseaux lymphatiques dans la plaque athérosclérotique (adapté de⁹⁰). A) Les vaisseaux lymphatiques sont présents au niveau de l'adventice des artères. B) Image d'immunofluorescence représentant des capillaires lymphatiques dans la périphérie de l'arc aortique.

1.3.2 Morphologie et fonctions du système lymphatique

Le système lymphatique est présent dans tous les tissus vascularisés et il est divisé en plusieurs composantes : les vaisseaux capillaires (aussi appelés initiaux), les vaisseaux collecteurs et les ganglions lymphatiques. Le système lymphatique permet le maintien de l'homéostasie osmotique en favorisant la prise en charge du liquide interstitiel principalement composé de déchets cellulaires, de sels, de sucres, de protéines et d'acides aminés afin de le filtrer et le retourner dans la circulation sanguine pour permettre l'excrétion des déchets⁹¹⁻⁹⁴. Plus précisément, c'est aux capillaires lymphatiques que revient le rôle de prendre en charge le liquide interstitiel. Les capillaires lymphatiques sont perméables aux macromolécules et sont caractérisés par une monocouche de cellules endothéliales composées de jonctions de types boutons (Figure 1.5). Ces jonctions sont directement attachées à la matrice extracellulaire de l'espace interstitiel via des filaments d'ancrages, et ces filaments agissent de sorte à tirer sur les cellules et élargir les jonctions lorsque la pression dans l'espace interstitiel augmente, permettant ainsi l'entrée du liquide interstitiel dans les capillaires⁹⁵. Une fois dans les capillaires, le liquide interstitiel est désormais appelé «lymphe». La lymphe est tout d'abord propulsée dans le système lymphatique par les vaisseaux pré-collecteurs qui sont partiellement recouverts par des cellules musculaires lymphatiques (CMLym)⁹⁶. Les vaisseaux pré-collecteurs fusionnent avec les vaisseaux collecteurs, qui eux sont composés de cellules endothéliales caractérisées par des jonctions de type fermeture éclair⁹⁵. Les vaisseaux collecteurs possèdent une couche de CMLym qui permettent la contraction des vaisseaux et la propulsion de la lymphe, et des valves qui empêchent le retour de la lymphe afin de faciliter le mouvement unidirectionnel (Figure 1.6). En plus des contractions intrinsèques des cellules musculaires lymphatiques, le mouvement de la lymphe est rendu possible grâce aux contractions des muscles squelettiques⁹⁷.

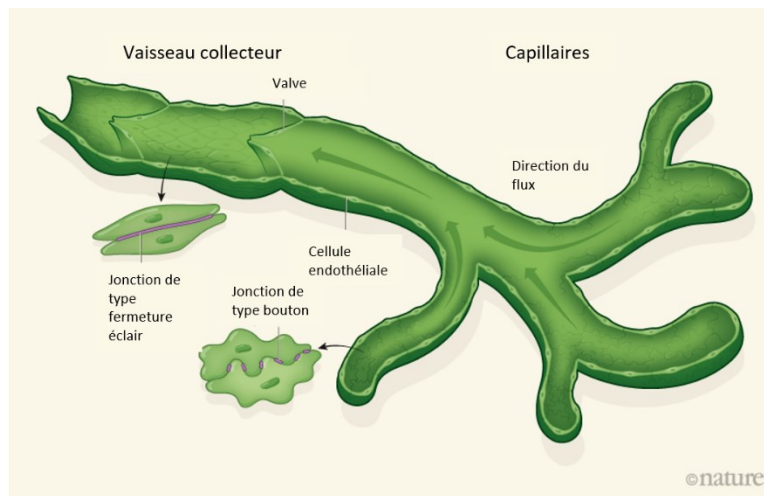


Figure 1.6 Particularités structurales des capillaires lymphatiques et des vaisseaux collecteurs (adapté de⁹⁵). La lymphe traverse les capillaires lymphatiques qui sont caractérisés par des jonctions de type boutons, puis les vaisseaux collecteurs qui sont caractérisés par des jonctions de type fermeture éclair. Les valves présentes dans les vaisseaux collecteurs favorisent le mouvement unidirectionnel de la lymphe.

1.3.3 Marqueurs lymphatiques

1.3.3.1 VEGFR3

Bien que le système lymphatique et le système sanguin soient étroitement liés et dépendants l'un de l'autre, des marqueurs spécifiques les différencient. Le premier marqueur à avoir été découvert est le *vascular endothelial growth factor receptor 3* ou VEGFR3 qui est fortement exprimé dans les cellules endothéliales lymphatiques (CEL)⁹⁸.⁹⁹. L'importance de ce récepteur dans le développement lymphatique a été démontrée dans des modèles de souris qui n'expriment pas le VEGF-C, qui est son ligand principal. Ces souris sont incapables de développer des vaisseaux lymphatiques normaux et décèdent au stade embryonnaire à cause de l'accumulation de liquide dans les tissus périphériques. Ces effets étaient évités lorsque les souris étaient traitées séparément au VEGF-C ou au VEGF-D, un autre ligand du VEGFR3, prouvant ainsi l'importance de l'interaction entre ces ligands et leur récepteur. L'importance de l'interaction entre le VEGF-D et le VEGFR3 a aussi été démontré dans un modèle de têtard ayant subi un knockdown dans le gène du VEGF-D¹⁰⁰. Ce modèle présente un défaut de bourgeonnement et de migration des CEL.

Des mutations dans le VEGFR3 sont aussi connues pour induire une hypoplasie des vaisseaux lymphatiques et du lymphœdème chez les humains et les souris¹⁰¹. Les CEL adultes dépendent uniquement du VEGF-C pour la croissance et la prolifération¹⁰². Outre ses rôles dans le développement et la prolifération, le VEGFR3 peut directement réguler la fonction lymphatique au niveau des vaisseaux collecteurs et un traitement avec son agoniste VEGF-C peut stimuler les contractions des vaisseaux. Cet effet du VEGFR3 a été démontré, entre autre, chez la souris par injection d'une forme mutante du VEGF-C spécifique au VEGFR3, le VEGFC-152s, qui a induit une augmentation de la fréquence des contractions des vaisseaux lymphatiques collecteurs¹⁰³.

1.3.3.2 Prox1

L'énoncé selon lequel le système lymphatique et le système sanguin sont étroitement liés fait non seulement référence à leurs fonctions physiologiques, mais aussi à leur développement. Il a été démontré que les vaisseaux lymphatiques sont originaires des vaisseaux sanguins et que la différenciation des cellules endothéliales sanguines en CEL dépend du facteur de transcription *prospero homeobox protein 1* ou Prox1. Une délétion de Prox1 bloque la différenciation des CEL au stade embryonnaire. À l'inverse, la surexpression de Prox1 dans les cellules endothéliales sanguines inhibe l'expression de gènes spécifiques aux cellules sanguines et favorise l'expression de marqueurs lymphatiques¹⁰⁴. Cette protéine est donc très importante durant le développement et son expression est spécifique aux cellules endothéliales, devenant historiquement le deuxième marqueur lymphatique le plus important à avoir été découvert. Ses fonctions ne sont pas encore tout à fait décrites après le développement, mais une dysfonction lymphatique causée par la rupture des vaisseaux et qui mène au développement de l'obésité a été observée chez des souris hétérozygote *Prox1*^{+/-105}.

1.3.3.3 LYVE-1

Un autre marqueur de CEL est le *lymphatic vessel hyaluronan receptor-1* ou LYVE-1. Il est fortement exprimé dans les cellules endothéliales des capillaires lymphatiques, mais très peu ou pas du tout dans les vaisseaux collecteurs lymphatiques, permettant ainsi de différencier les deux sous-types de vaisseaux¹⁰⁶. LYVE-1 n'est pas spécifique aux vaisseaux lymphatiques étant donné qu'il est aussi exprimé dans les vaisseaux sanguins

embryonnaires, les macrophages¹⁰⁷, et les capillaires sinusoides des cellules endothéliales du foie¹⁰⁸. Le marquage de LYVE-1 est donc principalement utilisé comme marqueur de capillaires lymphatiques ou pour différencier les vaisseaux lymphatiques et les vaisseaux sanguins en l'utilisant en combinaison avec d'autres marqueurs. Comme son nom le suggère, LYVE-1 peut lier et internaliser l'acide hyaluronique, qui est un composant de la matrice extracellulaire impliqué dans la réparation tissulaire et l'inflammation¹⁰⁹. LYVE-1 aurait aussi un rôle important dans l'immunité car il permet l'entrée des cellules dendritiques par les capillaires lymphatiques en se liant à la molécule d'acide hyaluronique présente à leur surface, et présente aussi un rôle dans la lymphangiogénèse. Il a été démontré *in vitro* que des fragments d'acide hyaluronique induisent la croissance et la prolifération de CEL et ces effets étaient contrecarrés par un knockdown spécifique du LYVE-1¹¹⁰. Étant donné sa forte expression à la membrane plasmique, il a été proposé que LYVE-1 puisse jouer un rôle structural assez important¹¹¹.

1.3.3.4 Podoplanine

La podoplanine (PDPN) est une protéine transmembranaire et un autre marqueur des CEL¹¹². Durant le développement, la PDPN joue un rôle important dans la séparation des vaisseaux sanguins et lymphatiques grâce à son interaction avec le *C-type lectin receptor* ou CLEC-2 qui est présent sur les plaquettes^{113, 114}. Les souris *Pdpr*^{-/-} (knockout total) meurent à la naissance à cause d'un défaut dans la formation du système lymphatique^{115, 116}. Les souris hétérozygotes *Pdpr*^{+/-} peuvent survivre mais sont incapables de développer un système lymphatique fonctionnel, ont un défaut dans le transport lymphatique, une absence de capillaires lymphatiques et souffrent d'œdème sévère.

1.3.3.5 FOXC2

La *forkhead transcription factor box protein C2* ou FOXC2 est aussi important dans le développement des vaisseaux lymphatiques, mais plus spécifiquement pour la formation des valves. Il joue un rôle structural en maintenant et en stabilisant les jonctions et le cytosquelette des cellules endothéliales lymphatiques¹¹⁷. Les souris *Foxc2*^{-/-} (knockout total) ont une perte de l'intégrité ou une absence complète des valves, une perturbation du mouvement unidirectionnel de la lymphe et l'apparition de lymphœdème.

1.4 Mise en contexte du projet

Le système lymphatique est maintenant reconnu comme étant une composante principale du transport inverse du cholestérol et un joueur clé dans l'évolution de l'athérosclérose^{86, 118, 119}. Notre laboratoire a récemment étudié l'évolution de la dysfonction lymphatique dans l'initiation et la progression de la plaque athérosclérotique, pour ultimement tenter de déterminer à quel moment la dysfonction survient, et quel(s) portion(s) du vaisseau elle affecte, à priori. Pour ce faire, le laboratoire a utilisé deux modèles murins : un modèle *Ldlr*^{-/-};*hApoB100*^{+/+} qui est prédisposé à développer l'athérosclérose sans l'utilisation d'un diète riche en cholestérol et un modèle *Pcsk9*^{-/-} qui est souvent caractérisé comme étant athéroprotégé¹²⁰. Ces modèles ont permis de déterminer que la dysfonction lymphatique survient avant que la plaque d'athérosclérose ne soit visible, et que le défaut est dans un premier temps présent au niveau des vaisseaux lymphatiques collecteurs, et non dans la capacité d'absorption des capillaires lymphatiques. La même publication nous a permis de constater que le LDLR est exprimé sur les CEL, mais pas sur les CMLym et que le défaut serait d'abord indépendant des niveaux de cholestérol circulants. Les souris *Pcsk9*^{-/-} quant à elles présentaient une fonction lymphatique améliorée par rapport aux souris contrôles. Le laboratoire a démontré que le PCSK9 circule dans la lymphe, avec des niveaux plus élevés dans les animaux *Ldlr*^{-/-};*hApoB100*^{+/+}. Comme prémisse aux travaux présentés dans ce mémoire, nous avons émis l'hypothèse que le LDLR sur les cellules endothéliales lymphatiques et/ou le PCSK9 circulant dans la lymphe joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité des vaisseaux lymphatiques. Ce projet est important dans le contexte actuel où il est nécessaire de diminuer la prévalence de l'athérosclérose et mettre au point des thérapies pour ralentir et limiter sa progression. Le laboratoire a démontré quelques mois avant la rédaction de ce mémoire que de cibler la fonction lymphatique avant la mise en place de la plaque d'athérosclérose permet de freiner la progression de la plaque dans un modèle murin *Ldlr*^{-/-}¹⁰³. En ayant une meilleure compréhension des mécanismes qui mènent à l'apparition de la dysfonction lymphatique dans le contexte de l'athérosclérose, nous pourrions développer des outils qui nous permettront de monitorer l'apparition de l'athérosclérose en fonction de l'apparition de la dysfonction lymphatique au niveau du cœur, et en limiter la progression.

1.5 Hypothèses et objectifs

1.5.1 Hypothèses

À la lueur de notre précédente publication¹²⁰, nous croyons que la dysfonction lymphatique chez les souris *Ldlr*^{-/-};*hApoB100*^{+/+} pourrait être, du moins en partie, attribuable à l'absence de LDLR sur les CEL et/ou à l'augmentation de la quantité de PCSK9 en circulation dans la lymphe. À l'inverse, dans le modèle *Pcsk9*^{-/-}, l'augmentation de l'expression du LDLR et/ou l'absence de PCSK9 en circulation dans la lymphe pourraient se traduire par une fonction lymphatique améliorée. Le PCSK9 est connu pour être impliqué dans les mécanismes d'inflammation dans les cellules endothéliales et nous pensons que sa présence dans la lymphe pourrait induire des phénotypes inflammatoires sur les CEL, affectant ainsi l'intégrité de l'endothélium lymphatique. Nous pensons aussi que l'absence du LDLR ou la présence du PCSK9 pourrait affecter l'expression de protéines importantes pour le bon fonctionnement des vaisseaux lymphatiques.

1.5.2 Objectifs

Notre objectif global consiste à comprendre si et comment l'expression du LDLR sur les CEL peut être modulée, et les conséquences sur l'expression des marqueurs lymphatiques et l'intégrité de l'endothélium lymphatique. Ces mécanismes seront étudiés dans un modèle *in vitro* de cellules endothéliales lymphatiques humaines. Le PCSK9 est exprimé et produit par les hépatocytes, et régule ainsi les niveaux du LDLR. Un de nos objectifs visera à déterminer si les CEL peuvent exprimer et sécréter le PCSK9. Nonobstant du résultat, nous déterminerons le rôle du PCSK9 dans la modulation de l'expression du LDLR et des marqueurs des CEL. Les cellules seront traitées soit avec du PCSK9 humain, soit avec un petit ARN interférent (*small interfering RNA* ou siARN) qui bloque spécifiquement l'expression du LDLR (siLDLR). Pour explorer les hypothèses énoncées, nous avons élaboré divers sous-objectifs spécifiques :

- Vérifier si les CEL humaines expriment le LDLR
- Vérifier si le LDLR présent sur les CEL peut exercer ses fonctions de liaison et d'internalisation du LDL
- Déterminer si les CEL expriment et sécrètent le PCSK9
- Déterminer si le PCSK9 induit la sécrétion de cytokines pro- ou anti-inflammatoires par les CEL
- Évaluer si la présence du PCSK9 et/ou le siLDLR modulent les taux d'ARNm des marqueurs lymphatiques VEGFR3, LYVE-1, Podoplanine, Prox1 et FOXC2
- Évaluer si la présence du PCSK9 et/ou le siLDLR modulent l'expression des protéines membranaires VEGFR3, LYVE-1, et Podoplanine
- Évaluer si le siLDLR modulent les taux de lipides intracellulaires

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

2.1 Culture cellulaire

Des CEL humaines prélevées du derme chez des adultes (*Human Dermal Lymphatic Microvascular Endothelial Cells – Adult*, HMVECs-DLyAD, LONZA) ont été cultivées en monocouche selon les recommandations de la compagnie dans du milieu de culture pour cellules endothéliales lymphatiques (*Endothelial Cell Growth Medium-2* ou EGM-2, Promocell) supplémenté à 10% en sérum fœtal bovin et en SingleQuots™ (Promocell). Les cellules ont été cultivées à 37 °C dans des plaques 6 puits (sauf si spécifié autrement) et traitées au 7^{ème} passage lorsqu'elles atteignaient une confluence adéquate (80%).

2.1.1 Traitement au PCSK9

Les cellules sont conditionnées dans du milieu sans suppléments pendant 2 heures avant le traitement avec une protéine recombinante de PCSK9 humain (ProSci). Les traitements au PCSK9 ont été faits dans du milieu sans suppléments à une concentration de 6,5 µg/ml pendant 16 heures. Cette concentration est la dose utilisée dans une publication ayant recours au PCSK9 de la même compagnie¹²¹. Le choix du temps d'incubation est basé sur une publication dans laquelle des hépatocytes sont incubés pendant 16 heures avec une protéine recombinante de PCSK9 dilué dans du milieu sans suppléments.

2.1.2 Traitement aux siARNs

Les siARNs sont dilués à une concentration finale de 25 nM dans une solution de milieu sans suppléments contenant l'agent de transfection *TransIT-X2® Dynamic Delivery System* (MirusBio) dans un ratio 1:30. Cette solution est incubée pendant 25 minutes à température pièce pour permettre la formation du complexe entre le siARN et l'agent de transfection. Les cellules cultivées dans du milieu supplémenté sont transfectées avec le siARN et sont incubées pendant 48 heures avec le traitement. Un siARN non spécifique (siCTL) est utilisé comme contrôle. Les concentrations et les temps d'incubation ont été établis selon le protocole de l'agent de transfection *TransIT-X2®* fourni par la compagnie pour une plaque 6 puits.

2.2 Immunofluorescence sur CEL

La détection du LDLR par immunofluorescence s'est faite par microscopie confocale sur une monocouche de cellules endothéliales lymphatiques cultivées dans des pétris en plastique. Les cellules ont été fixées pendant 10 minutes avec du paraformaldéhyde 4% puis lavées 3 fois avec un tampon phosphate salin (*phosphate-buffered saline* ou PBS). Les cellules des pétris ayant servi pour le marquage intracellulaire ont été perméabilisées avec 0,25% de Triton X-100 puis lavées 3 fois avec du PBS. Les cellules sont ensuite incubées pendant la nuit à 4 °C avec un anticorps primaire spécifique au LDLR (Abcam) dilué à 1:100. Les cellules sont lavées avec du PBS puis incubées pendant 90 minutes à température pièce avec un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa Fluor 647 (Abcam). Les cellules sont ensuite incubées pendant 30 minutes à température pièce avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) qui permet de marquer les noyaux en se liant à l'ADN. Les pétris ont ensuite été recouverts d'une lamelle qui a été scellée avec du vernis à ongle. Les images ont été prises avec le microscope confocal LSM 710 (Zeiss) et les images ont été analysées avec le programme ZEN (Zeiss).

2.3 Immunobuvardage

2.3.1 Détection de protéines par immunobuvardage

L'analyse de l'expression de protéines s'est faite sur des CEL humaines cultivées dans des plaques 6 puits. Les protéines ont été extraites dans un tampon de radioimmunoprécipitation (*RIPA buffer*), quantifiées avec le kit *Micro BCA™ Protein Assay Kit* (ThermoFisher), diluées dans un tampon de Laemmli 4X et dénaturées pendant 5 minutes à 95 °C. Les protéines ont été chargées à une quantité de 5µg par puits dans un gel de concentration (5% Acrylamide). Les protéines ont migré pendant 2 heures dans un gel de migration (10% Acrylamide). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de poly(fluorure de vinylidène) (PVDF) pendant 90 minutes à 4 °C. Les membranes ont été bloquées à température pièce dans une solution de lait en poudre diluée dans du TBST (*Tris-buffered saline* ou TBS, 0.1% Tween 20). Les membranes ont été incubées pendant la nuit à 4 °C avec un anticorps primaire contre le LDLR (Abcam) dilué à 1:1000 dans du TBST 1% lait, ou avec un anticorps primaire contre la α -actine dilué à

1:10 000 dans une solution de TBST 1% BSA. Les membranes sont lavées avec du TBST (trois lavages de 15 minutes) puis incubées avec des anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase* ou HRP) pendant 90 minutes à température pièce. Les membranes sont ensuite lavées avec du TBST (trois lavages de 15 minutes). La révélation s'est faite avec un kit *Clarity™ Western ECL Blotting Substrates* (BioRad) et des films d'autoradiographie (*Blu-Lite UHC™*, MTC Bio). Les membranes ont été quantifiées avec le programme ImageJ 1.46r (National Institutes of Health).

2.3.2 Détection de PCSK9 dans les surnageants de CEL

Le PCSK9 a été détecté dans les surnageants de CEL humaines qui ont préalablement été concentrés à l'aide du dispositif *Amicon® Ultra-2 Centrifugal Filter Devices* (Milipore). Les surnageant d'hépatocytes (HepG2 et HuH7) ont été utilisés comme contrôles positifs. La détection par immunobuvardage s'est faite telle que décrite au point 2.3.1 et la détection par ELISA s'est faite à l'aide d'un kit ELISA pour PCSK9 humain (Circulex).

2.4 Cytométrie en flux

2.4.1 Préparation des échantillons

Les cellules en culture dans les plaques ont été détachées avec une solution de Trypsine/EDTA 1X (0,25% trypsine, 0,02% EDTA) et transférées dans des tubes eppendorf avant d'être centrifugées à 430 g pendant 5 minutes à 4 °C. Le culot de cellules de chaque échantillon a été resuspendu dans 200 µl de tampon FACS (PBS 5% BSA, 0.1% Azoture de sodium) et transféré dans une plaque de 96 puits à fond conique. La plaque a été centrifugée à 430 g pendant 5 minutes à 4 °C afin d'avoir les cellules au fond des puits. Après la centrifugation, le surnageant a été enlevé par inversion des plaques.

2.4.2 Détection de protéines membranaires

Les culots de cellules présents dans les puits de la plaque à fond conique sont resuspendus dans 25µl de tampon FACS dans lequel des anticorps couplés à des fluorochromes (SinoBiological : LDLR-APC (1 : 50); BioLegend : VEGFR3-PE (1:100), LYVE1-APC (1:100), PDPN-PerCP/Cy5.5 (1:100)) ont été dilués. La plaque a été incubée

pendant 10 minutes sur glace en étant protégée de la lumière. Les puits ont ensuite été lavés avec 200 µl de tampon FACS et la plaque a été centrifugée à 430 g pendant 5 minutes à 4 °C. Les cellules ont été resuspendues dans 200 µl de tampon FACS et transférées dans des tubes de propylène (Falcon®) afin d'être passées au cytomètre BD FACSCelesta™ (BD Biosciences).

2.4.3 Test d'internalisation de LDL fluorescent

Les cellules sont incubées pendant 4 heures avec 10 µg/ml de LDL fluorescent (Alfa Aesar) dilué dans du milieu sans suppléments (conditions recommandées par la compagnie). Les cellules sont lavées 5 fois avec du milieu sans suppléments pour éliminer les restants de LDL qui n'ont pas été internalisés. Les cellules sont ensuite détachées et préparées pour la cytométrie en flux tel que décrit dans la section 2.4.1.

2.4.4 Configuration des paramètres de cytométrie en flux

Les acquisitions ont été réalisées à l'aide du logiciel BD FACSDiva™ (BD Biosciences). La population de cellules d'intérêt a d'abord été sélectionnée à l'aide des paramètres *forward scatter area* (FSC-A) et *side scatter area* (SSC-A) (Figure 2.1A). Cette sélection (P1) permet dans un premier d'éliminer les débris qui se retrouvent en bas à gauche du graphique. Les cellules sont ensuite sélectionnées en fonction de leur granularité à l'aide des paramètres SSC-W et SSC-H (*width* et *height* respectivement). Cette sélection (P2) permet d'éliminer les doublets de cellules et de garder le signal provenant uniquement de cellules uniques. Une dernière sélection (P3) à l'aide des paramètres FSC-W et FSC-H permet de nouveau d'éliminer les doublets de cellules qui seraient encore présents dans la population P2. La configuration des paramètres pour les anticorps se fait en ajustant le voltage dans le but d'avoir un signal de fluorescence inférieur à 10^3 dans un échantillon ne contenant pas d'anticorps (non-marqué), et un signal plus grand ou égal à 10^3 dans un échantillon contenant un seul anticorps pour une protéine d'intérêt (marquage unique). Voir l'exemple ci-dessous avec le VEGFR3-PE (Figure 2.1B).

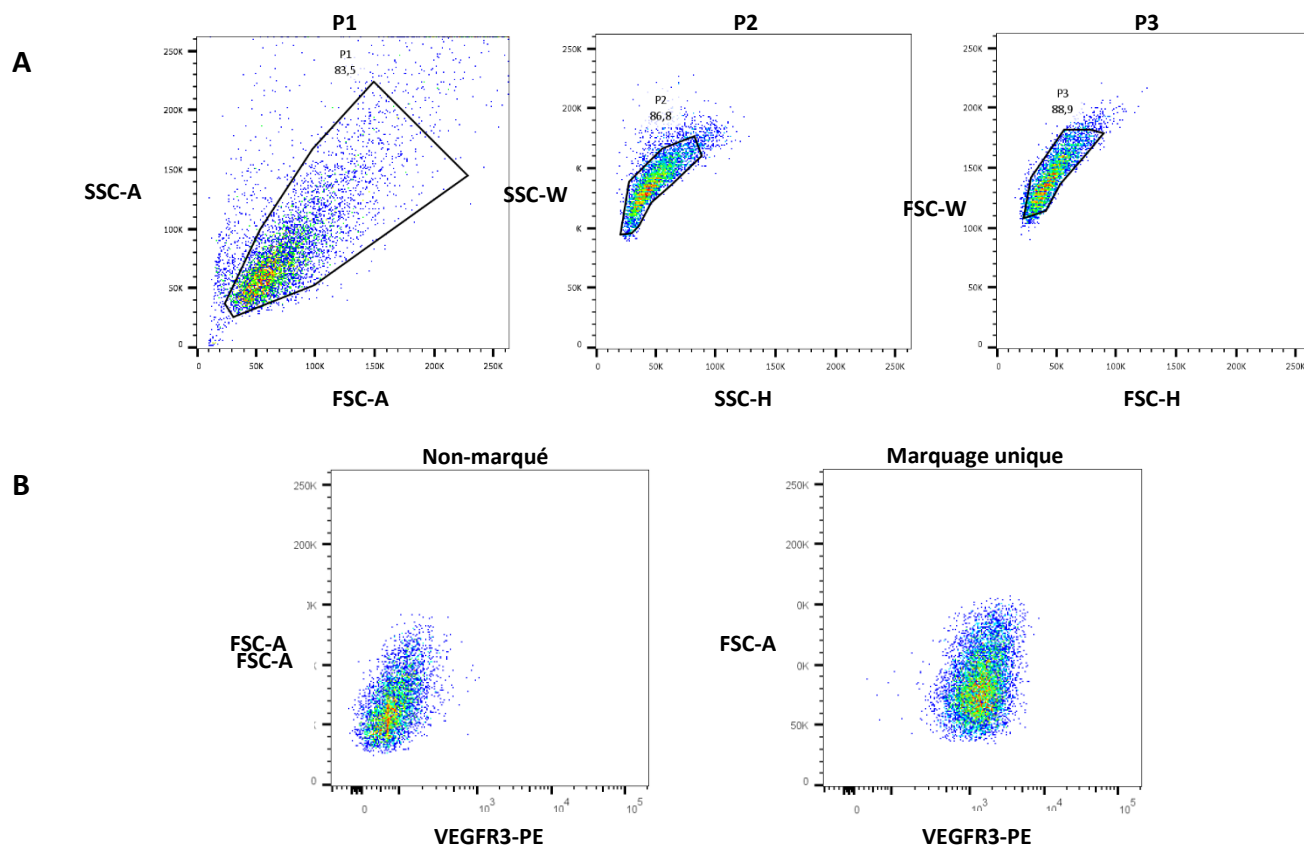


Figure 2.1 Stratégie d'analyse pour les expériences de cytométrie en flux. (A) Les sélections P1, P2, et P3 permettent d'éliminer les débris, les cellules mortes et les doublets de cellules. (B) Un contrôle non-marqué et un marquage unique sont utilisés pour distinguer les signaux de fluorescence négatifs et positifs afin de configurer les voltages.

2.4.5 Analyse des expériences de cytométrie en flux

Les fichiers sont analysés avec le logiciel FlowJo™ (BD Biosciences). Les résultats sont exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF) et chaque traitement est normalisé par rapport à son contrôle. Les résultats présentés sont les ratios traitement/contrôle.

2.4.6 Mesure de cytokines inflammatoires

Des CEL humaines ont été incubées avec 6,5 µg/ml de PCSK9 pendant 16 heures et le surnageant a été récupéré et congelé à -80 °C. Les cytokines ont été mesurées par cytométrie en flux à l'aide du *BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokine Kit* (BD Biosciences) qui permet la détection de l'interleukine-8 (IL-8), interleukine-1β (IL-1β), interleukine-6 (IL-6), interleukine-10 (IL-10), facteur de nécrose tumorale (*tumor necrosis factor* ou TNF), et interleukine-12p70 (IL-12p70). Le kit contient des billes dont la taille et la fluorescence sont connues, et qui sont conjuguées à un anticorps spécifique qui va se lier à une cytokine. Les échantillons sont incubés avec les billes, puis avec un réactif de détection contenant des anticorps couplés à la phycoérythrine (PE). La PE permet l'obtention d'un signal fluorescent proportionnel à la quantité de cytokines présentes dans les échantillons et qui se sont liées aux billes. Les complexes formés de billes + cytokines + PE peuvent ainsi être détectés par cytométrie en flux. Les voltages du cytomètre ont été ajustés selon le protocole du kit à l'aide des billes de configuration. Les données sont analysées sur le logiciel *FCAP Array™ Software Version 3.0* (BD Biosciences).

2.5 Détection et quantification d'ARNm par RT-qPCR

Les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de Trizol (RiboZol™ RNA Extraction Reagent, VWR Life Science) après les traitements et conservées à -80 °C dans des tubes eppendorf pour minimum 24 heures. Le jour de l'extraction, les échantillons sont décongelés à température pièce et on ajoute 200 µl de chloroforme à chaque tube. Les échantillons sont ensuite vortexés pendant 20 secondes et centrifugés pendant 15 minutes à 12 500 rpm à 4 °C. La centrifugation induit une séparation de phase et 300 µl de la phase aqueuse (transparente) sont transférés dans un nouveau tube eppendorf. Un volume équivalent (300 µl) d'isopropanol est ajouté à la phase aqueuse et les tubes sont mélangés par inversion et laissés à température pièce pendant 10 minutes. La précipitation de l'ARN s'est faite à l'aide du kit *FavorPrep* (FavorGen) selon le protocole de la compagnie. En résumé, le mélange de phase aqueuse est transféré dans des colonnes de précipitation. L'ARN présent dans les colonnes est lavé à trois reprises via l'ajout de tampon de lavage et par centrifugation pendant 1 minute à 10 000 rpm. La colonne est ensuite centrifugée à sec

afin de sécher l'ARN et il est finalement récupéré via l'ajout de 42µl d'eau distillée exempte en ARN et par centrifugation pendant 1 minute à 10 000 rpm. L'ARN extrait est quantifié sur *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer* (ThermoFisher) et les échantillons ont été dilués à la même concentration par rapport à l'échantillon ayant la plus petite concentration mesurée. Cette dilution permet de normaliser la concentration et d'avoir la même quantité d'ARN dans tous les échantillons pour la transcription inverse. La transcription inverse de l'ARN a été faite à l'aide du kit *iScript™ cDNA synthesis kit* (Bio-Rad) sur la machine *PCR Express* (Thermo Hybaid) afin d'obtenir l'ADN complémentaire (ADNc). Après la transcription, l'ADNc a seulement été dilué 1 : 10 car les CEL contiennent peu de matériel génétique comparativement à d'autres lignées cellulaires pour la même quantité de cellules. La qPCR s'est faite avec 2 µl de cDNA (2 µg), 300 nM d'amorces, 5 µl de iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad), 0.2 µl de ROX et 1.8 µl d'eau distillée exempte d'ARNase pour un total de 10 µl par puits. Les expériences ont été faites sur le programme *StepOne Software v2.3* (Applied Biosystems). Des courbes de fusions ont été générées à la fin de chaque expérience pour vérifier qu'un seul produit de PCR a été amplifié. L'expression relative a été calculée par la méthode comparative de $(2^{-\Delta\Delta CT})$ et normalisée par rapport aux gènes rapporteurs glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et β2-microglobuline (B2M). Les deux gènes rapporteurs ont généré des résultats similaires et seuls les résultats pour la *B2M* sont montrés afin d'alléger les figures.

2.5.1 Amorces utilisées

LDLR

F: TGAGGTCCACATTTGCCACA; R: TCCTCCAGACTGACCATCTGT

LYVE1

F: GCCGACAGTTTGCAGCCTATTG; R: CCGAGTAGGTACTGTCCTGAC

FOXC2

F: TCACCTTGAACGGCATCTACCAG; R: TGACGAAGCACTCGTTGAGCGA

PDPN

Séquence inconnue (SinoBiological, Cat : HP100937)

PROX1

F: CTGAAGACCTACTTCTCCGACG; R: GATGGCTTGACGTGCGTACTTC
VEGFR3

F: GAGCAGATAGAGAGCAGGCAT; R: ACATTCTGGCCAGGTCCTTTAC
B2M

F : CCACTGAAAAAGATGAGTATGCCT, R : CCAATCCAAATGCGGCATCTTCA
GAPDH

F: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG; R : ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

2.6 Lipidomique non-ciblée par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse de type quadrupôle-temps de vol (*liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry* ou LC-QTOF-MS)

2.6.1 Préparation des cellules

Les cellules ont été cultivées dans des pétris en verre de 50 mm afin d'éviter les contaminations de polymères retrouvées dans les plaques de culture en plastique. Les cellules sont lavées avec du PBS, détachées avec une solution de Trypsine/EDTA 1X (0,25% trypsine, 0,02% EDTA) et centrifugées à 430 g pendant 5 minutes à température pièce. Les cellules (environ 2 millions par échantillons) sont resuspendues dans 1 mL de milieu sans suppléments. Les étapes d'extraction et d'analyse par LC-QTOF-MS qui suivent ont déjà été décrites dans la littérature^{122, 123}. Brièvement, la suspension cellulaire est complétée avec des standards internes (monoacylglycérosphosphocholine (LPC) 13:0, diacylglycérosphosphocholine (PC) 14:0/14:0 et 19:0/19:0, phosphatidylsérine (PS) 12:0/12:0, diacylglycérosphosphoéthanolamine (PE) 17:0/17:0, et diacylglycérosphoglycérol (PG) 15:0/15:0).

2.6.2 Extraction des lipides

Les tubes contenant les échantillons et les standards internes sont vortexés pendant 10 secondes avant d'y ajouter, dans l'ordre, 2,5 ml de méthanol/acétonitrile/méthyl tert-butyl éther (MTBE) et 625 µl d'eau déionisée. Les tubes sont mélangés après chaque ajout avec un vortex multi-pulse (Glas-Col) pendant 3 minutes. Les échantillons sont ensuite

centrifugés pendant 5 minutes à 1000 g et la phase supérieure a été récupérée. La phase inférieure a été sujette à trois extractions additionnelles qui inclut des étapes de 3 minutes de vortex et 5 minutes de centrifugation avec (i) 2 mL de la phase supérieure d'une solution de MTBE/méthanol/eau (10:3:2.5, v/v/v), (ii) 2 mL d'acétate d'éthyle contenant du NaCl saturé et 10 µl de HCl 10 M, et (iii) 2 mL d'acétate d'éthyle. Les quatre phases supérieures organiques ont été combinées et évaporées durant la nuit dans un évaporateur centrifuge (Christ RVC 2-25). Les lipides ont été resolubilisés par ajouts séquentiels de 200 et 100 µl de méthanol/chloroforme (2:1, v/v). Après chaque ajout, les échantillons sont vortexés (8 secondes), soniqués (5 minutes), vortexés (15 secondes), et centrifugé (30 secondes). Les échantillons sont ensuite transférés dans des tubes en verre (Agilent Technologies Inc.). Le volume combiné de chaque échantillon a été centrifugé pendant 3 minutes puis aliquoté dans des tubes en verre qui sont ensuite conservés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.6.3 Analyse LC-MS

Les échantillons extraits sont injectés (de 5 à 6.7 µl selon le nombre de cellules au départ) dans un chromatographe en phase liquide à haute performance (1290 Infinity HPLC) couplé à un spectromètre de masse de type quadrupôle-temps de vol 6530 (Agilent Technologies Inc.) et équipé d'une source d'ionisation par électronébuliseur. L'élution des lipides s'est faite sur une colonne *Zorbax Eclipse plus* (C18, 2,1 mm × 100 mm, taille des particules : 1,8 µm, Agilent Technologies Inc.) pendant 83 minutes à une température constante de 40 °C dans un gradient de solvant A (acide formique 0,2% et ammonium formate 10 mM dans de l'eau) et B (acide formique 0,2% et ammonium formate 5 mM dans du MTBE, 55:35:10 [v/v/v]). L'analyse s'est faite en mode scan positif seulement. L'analyse des données de spectrométrie de masse a été faite via le logiciel *Mass Hunter Qualitative Analysis* version B.06 (Agilent Technologies Inc.), et avec un script bioinformatique maison permettant un alignement optimal des données de MS. Une liste de signaux MS (caractérisés par leur masse, le temps de rétention et l'intensité de signal corrigée) a été extraite après i) application d'un filtre pour s'affranchir des adduits, ii) application d'un filtre de fréquence (80% de présence dans au moins une condition) et normalisation de l'intensité des signaux (algorithme de type *cyclicloess*). En outre, l'imputation des données manquantes s'est faite avec l'approche *k-nearest neighbor*. Les

lipides et les chaînes d'acides gras ont ensuite été identifiés par MS/MS sur tous les signaux d'intérêt. Les analyses statistiques ont été faites par test-t de student non pairé suivi d'une correction de Benjamini-Hochberg avec le programme *Mass Professional Pro software* version 12.6.1 (Agilent Technologies Inc.).

2.7 Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne plus ou moins l'erreur standard à la moyenne (*standard error mean* ou SEM) et comparés par un test t de Student pour la comparaison de 2 groupes, ou par analyse de la variance à un facteur suivi d'un post-test de Tukey pour la comparaison de 3 groupes. Le post-test de Tukey permet d'avoir une comparaison de chaque paire de groupes. Un n représente un stock de cellules différent. Les données ont été analysées avec le logiciel GraphPad Prism v5 (GraphPad Software) et les valeurs de $p \leq 0.05$ sont considérées comme significatives.

Chapitre 3 : Résultats

3 Résultats

3.1 Les cellules endothéliales lymphatiques humaines expriment le LDLR

Nous avons préalablement démontré que le LDLR est exprimé par les CEL de souris¹²⁰. La première étape du projet consiste à vérifier que les CEL humaines expriment aussi le LDLR. Dans un premier temps, le LDLR a été détecté par immunobuvardage dans des CEL, des hépatocytes (HuH7) qui ont servi de contrôle positif et des cellules humaines de rein embryonnaire (HEK) traitées au siLDLR qui ont servi de contrôle négatif (Figure 3.1A). Puisque l'immunobuvardage permet la détection du LDLR présent dans toute la cellule, nous avons regardé spécifiquement le LDLR présent à la surface de la cellule par cytométrie en flux sur des cellules non-perméabilisées (Figure 3.1B). De même que pour l'expression cellulaire totale, le LDLR est exprimé par les CEL (histogramme en rouge), mais à de plus faibles niveaux que dans les hépatocytes (histogramme en bleu). Les résultats sont exprimés en fonction de l'intensité de fluorescence moyenne. Les comptes cellulaires ont été automatiquement normalisés par le programme afin d'avoir des pics de la même hauteur. Pour confirmer les résultats obtenus par immunobuvardage et par cytométrie en flux, nous avons déterminé spécifiquement la localisation intracellulaire du LDLR en utilisant deux méthodes de fixation permettant de moduler la perméabilité cellulaire (Figure 3.1C et D). Le marquage intracellulaire des cellules perméabilisées avec du Triton X-100 indique que le LDLR est présent à proximité du noyau. Étant donné que son expression passe par le réticulum endoplasmique, il est probable qu'il soit dans le réticulum endoplasmique et/ou le Golgi. Cette hypothèse sera éventuellement étudiée en ajoutant un marqueur du Golgi et en observant s'il y a une colocalisation avec le LDLR. Dans les cellules qui n'ont pas été perméabilisées, nous observons la présence du LDLR à la périphérie de la cellule, soit à la membrane plasmique, tel que visualisé avec le programme ZEN (Zeiss).

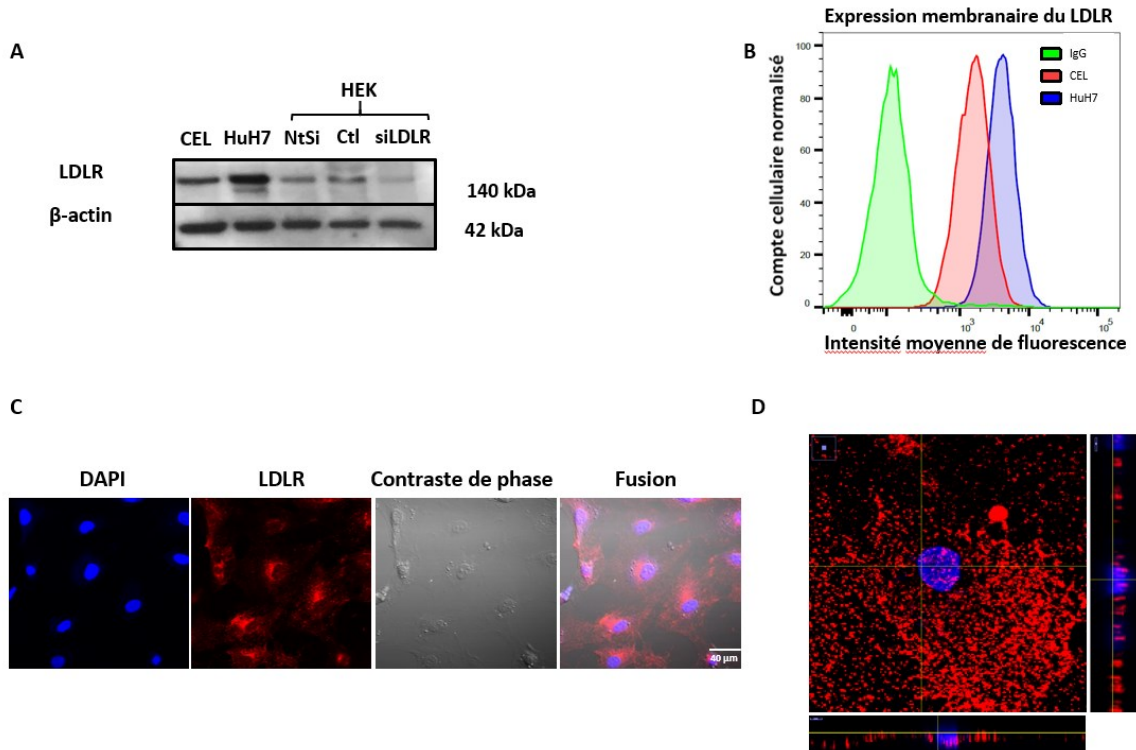


Figure 3.1 Expression du LDLR sur les CEL humaines. (A) L'expression du LDLR a été détectée dans des lysats protéiques de CEL par immunobuvardage, avec des hépatocytes (HuH7) comme contrôle positif et des HEK traitées avec un siLDLR comme contrôle négatif. (B) L'expression membranaire du LDLR a été mesurée par cytométrie en flux suite à un marquage extracellulaire de CEL et de HuH7. Un isotype contrôle (IgG) a été utilisé pour confirmer la spécificité de l'anticorps. Les résultats sont exprimés en fonction de l'intensité moyenne de fluorescence (IMF). L'expression du LDLR a été détectée par immunofluorescence dans des CEL (C) perméabilisées avec du Triton X-100 ou (D) non-perméabilisées marquées avec du DAPI (noyau, bleu) et un anti-LDLR (rouge).

3.2 Les cellules endothéliales lymphatiques peuvent lier puis internaliser le LDL.

Nous avons ensuite voulu déterminer si le LDLR exprimé à la surface des CEL pouvait exercer sa fonction principale qui est de lier et d'internaliser du LDL natif. Les CEL ont donc été incubées avec du LDL natif couplé à la phycoérythrine (LDL-PE) et lavées afin d'éliminer le LDL qui n'a pas été internalisé. Le LDL internalisé a ensuite été détecté par cytométrie en flux. Comme nous pouvons le constater en comparaison avec son contrôle, le LDL-PE est détecté à l'intérieur des cellules (Figure 3.2A). Pour déterminer si cette internalisation a été effectuée via la liaison au LDLR, les cellules ont été marquées avec un anti-LDLR. Nous observons une diminution significative du LDLR membranaire lorsque les cellules sont incubées avec du LDL (Figure 3.2B). Cette diminution du LDLR membranaire semble due à la liaison du LDL et à l'internalisation du complexe LDL-LDLR (voir Figure 1.2A). Nous pourrions confirmer ce résultat par immunofluorescence en incubant le LDL fluorescent avec les CEL et en marquant ces cellules avec un anti-LDLR afin d'observer s'ils sont internalisés en complexe.

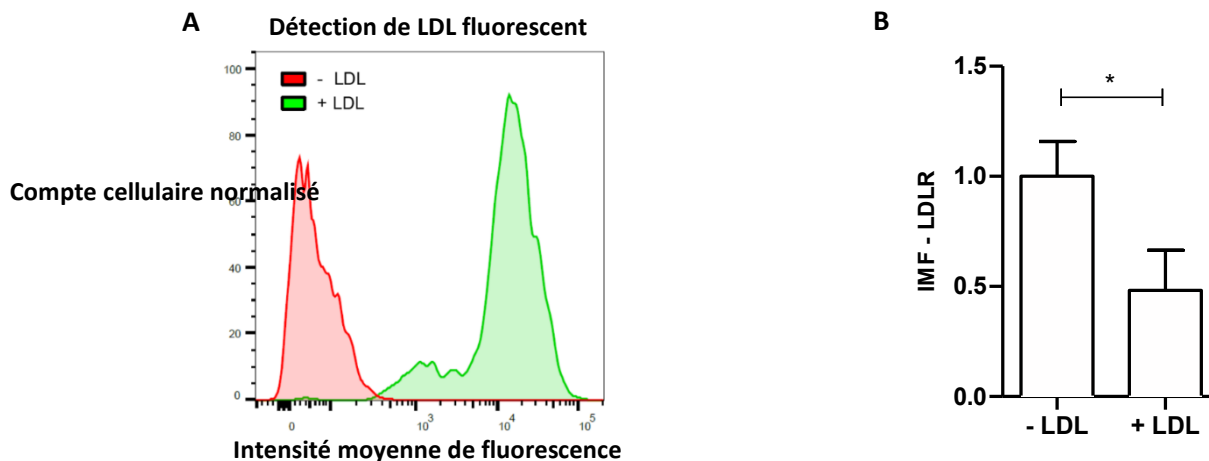


Figure 3.2 Internalisation de LDL natif par les CEL humaines.

(A) L'internalisation de LDL natif fluorescent a été mesurée par cytométrie en flux après 4 heures d'incubation avec les CEL. (B) L'expression membranaire du LDLR a été mesurée par cytométrie en flux après 4 heures d'incubation avec le LDL natif (n=3). Les résultats sont exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF). Les résultats ont été analysés par un test-t non pairé. * $p \leq 0.05$

3.3 Les cellules endothéliales lymphatiques surexpriment le LDLR en condition de privation de nutriments.

Les cellules hépatiques ou extra-hépatiques comme les fibroblastes sont connues pour surexprimer le LDLR lorsqu'elles sont incubées avec du milieu faible en nutriments^{15, 16}. Nous avons donc voulu déterminer comment les CEL réagissent à ces conditions de privation de nutriments et nous les avons incubées avec du milieu sans suppléments et sans sérum fœtal bovin (*fetal bovine serum* ou FBS) pendant 24 heures. Ces conditions de privation ont déjà été testée sur la même lignée cellulaire et des taux d'apoptose d'environ 30% ont été observés après 24 heures de privation de nutriments¹²⁴. Nous n'avons pas mesuré le taux d'apoptose dans le cadre de cette expérience mais l'état et la viabilité des cellules ont été régulièrement monitorés au microscope. L'expression membranaire du LDLR a été mesurée par cytométrie en flux (Figure 3.3). Nous observons que les CEL surexpriment le LDLR et réagissent donc de la même manière que les hépatocytes et les fibroblastes.

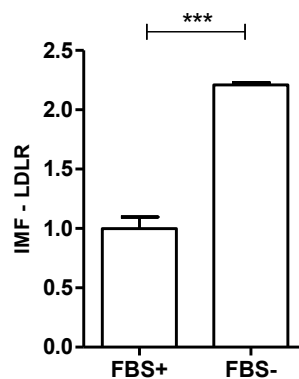


Figure 3.3 Effet de la privation de nutriments sur l'expression du LDLR.

L'expression membranaire du LDLR a été mesurée par cytométrie en flux après 24 heures d'incubation dans du milieu sans FBS (n=3). Les résultats sont exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF). Les résultats ont été analysés par un test-t non païré. *** $p \leq 0.001$

3.4 Les CEL n'expriment pas et ne sécrètent pas de PCSK9

Notre laboratoire a démontré qu'il y a du PCSK9 en circulation dans la lymphe de souris et que la fonction lymphatique est améliorée dans un modèle *Pcsk9*^{-/-120}. Sa provenance reste toutefois inconnue. Avant d'étudier les mécanismes par lesquels le PCSK9 pourrait affecter la fonction lymphatique, nous avons voulu déterminer si les CEL expriment le PCSK9 et, le cas échéant, si elles le sécrètent. Nous avons mesuré par immunobuvardage la sécrétion de PCSK9 dans du surnageant de CEL concentré, du surnageant d'hépatocytes (HepG2) comme contrôle positif et du surnageant de HEK comme contrôle négatif (Figure 3.4A). On observe une bande qui apparaît seulement dans les CEL et les HEK, mais étant donné que les HEK ne sécrètent pas du tout de PCSK9 nous pouvons en conclure qu'il s'agit d'une bande non spécifique. Pour confirmer ces résultats, nous avons utilisé un test ELISA pour PCSK9 humain pour avoir une plus grande sensibilité (Figure 3.4B). Nous observons un signal négligeable dans le lysat et le surnageant de CEL, et une forte sécrétion du PCSK9 dans le surnageant d'hépatocytes (HuH7). L'expression du PCSK9 a aussi été mesurée par ELISA dans un lysat de CEL (Figure 3.4B) et nous obtenons un signal négligeable. Nous pouvons conclure à partir de ces résultats que les CEL n'expriment pas de PCSK9 car les niveaux détectés dans les CEL sont similaires à ceux des HEKs.

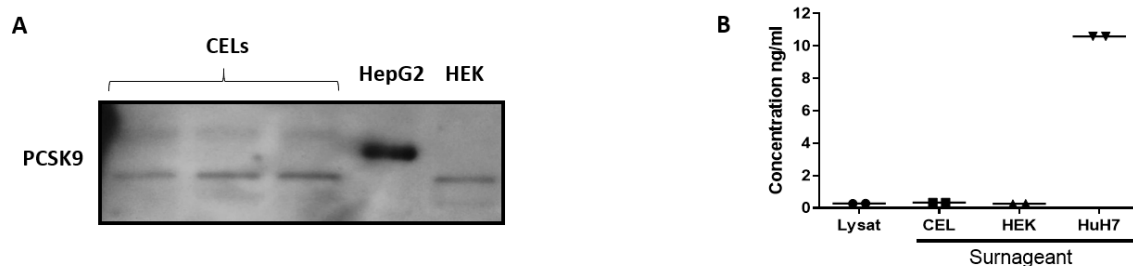


Figure 3.4 Expression et sécrétion de PCSK9 par les CEL humaines. (A) La sécrétion de PCSK9 par les CEL a été mesurée dans le surnageant concentré de CEL, d'hépatocytes (HepG2) et de HEK par immunobuvardage (n=3). (B) L'expression du PCSK9 a été mesurée dans un lysat de CEL et sa sécrétion a été mesurée le surnageant concentré de CEL, d'hépatocytes (HepG2) et de HEK par un kit ELISA spécifique au PCSK9 humain (n=2).

3.5 L'expression du LDLR peut être modulée par le PCSK9 exogène

Après avoir démontré que les CEL n'expriment ni ne sécrètent le PCSK9, nous avons incubé les CEL avec du PCSK9 purifié dans le but d'obtenir une diminution significative du LDLR et déterminer si le PCSK9 a un effet néfaste sur la fonction lymphatique, soit directement via son action sur le LDLR, soit via des effets pléiotropes. Nous mesurons l'expression du LDLR pour confirmer que le PCSK9 est sous sa forme active et qu'il est capable d'interagir avec les CEL. Lorsque les CEL sont incubées pendant 16 heures avec du PCSK9 (6,5 µg/ml), nous observons une diminution significative du LDLR total (Figure 3.5A) et membranaire (Figure 3.5B). Le PCSK9 peut donc efficacement diminuer l'expression du LDLR au niveau protéique et nous pouvons utiliser ces conditions pour tester l'effet de la présence du PCSK9 sur l'endothélium lymphatique.

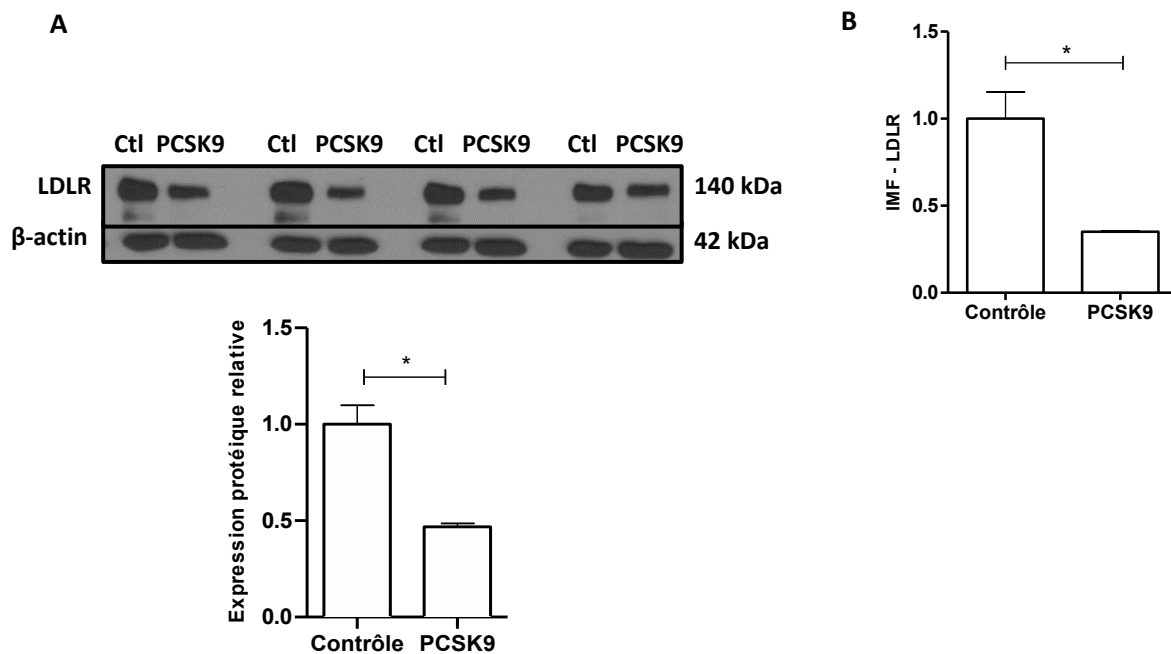


Figure 3.5 Interaction entre du PCSK9 exogène et les CEL humaines. L'expression du LDLR a été détectée dans les CEL par (A) immunobuvardage et (B) cytométrie en flux après traitement de 16 heures avec du milieu contrôle ou 6,5 µg/ml de PCSK9 (n=4 et n=3 respectivement). Les résultats ont été analysés par un test-t non païré. * $p \leq 0.05$

3.6 Le PCSK9 n'induit pas la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les cellules endothéliales lymphatiques

Il a déjà été rapporté que l'expression du PCSK9 est stimulée en condition inflammatoire au niveau de l'endothélium vasculaire et que sa présence induit la sécrétion de cytokines proinflammatoires par les cellules endothéliales et les macrophages au niveau d'une plaque athérosclérotique¹²⁵. Ces expériences sont faites en présence de TNF- α afin de simuler un état inflammatoire, mais nous avons voulu déterminer si le PCSK9 induit la sécrétion de cytokines proinflammatoires à l'état basal. Un kit de détection par cytométrie en flux (*Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory Cytokine Kit*, BD Biosciences) a été utilisé pour mesurer la concentration de cytokines dans du surnageant de CEL après avoir été incubé pendant 16 heures avec du PCSK9 et pendant 24 heures avec du TNF- α (Figure 3.6). Le TNF- α a été utilisé comme contrôle positif car il est connu pour induire la sécrétion de cytokines¹²⁶. Plusieurs cytokines incluses dans le kit n'ont pas été détectées et ne sont pas montrées en raison d'un signal inexistant. L'interleukine-6 (IL-6) et l'interleukine-8 (IL-8) ont été détectées, mais le PCSK9 n'a pas induit une sécrétion de cytokines significativement supérieure à son contrôle. Le PCSK9 ne semble donc pas affecter les CEL par les mêmes mécanismes que les cellules endothéliales sanguines, mais il sera nécessaire de tester l'effet du PCSK9 sur un endothélium inflammé.

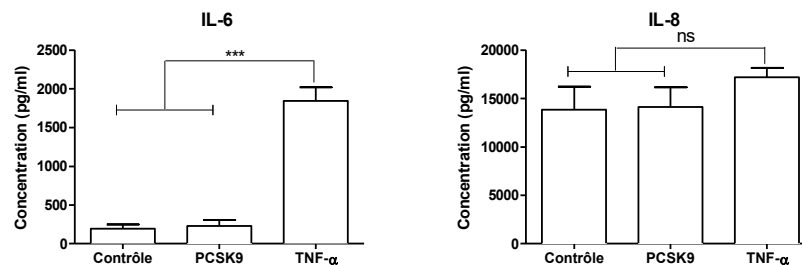


Figure 3.6 Effet du PCSK9 sur la sécrétion de cytokines inflammatoires par les CEL. La sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 a été mesurée par cytométrie en flux suite à un traitement de 16 heures avec du milieu contrôle ou 16 heures avec 6,5 μ g/ml de PCSK9 et 24 heures avec du TNF- α (n=3). Les résultats sont comparés par analyse de la variance à un facteur et un post-test de Tukey. *** $p \leq 0.001$

3.7 Le PCSK9 n'affecte pas les taux d'ARNm des marqueurs lymphatiques

Maintenant que nous savons que le PCSK9 n'affecte pas les mécanismes inflammatoires dans les CEL, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la présence du PCSK9 pourrait affecter l'expression de protéines importantes pour l'intégrité des CEL. Nous avons commencé par déterminer par RT-qPCR si les niveaux d'ARNm du *LDLR*, *VEGFR3*, *LYVE-1*, *PDPN*, *FOXC2* et *PROX1* étaient affectés par les traitements (Figure 3.7). Nos résultats suggèrent que le PCSK9 ne diminue pas l'expression de l'ARNm du LDLR, tel que suggéré dans la littérature dans d'autres types cellulaires¹²⁷. De plus, le PCSK9 ne semble pas moduler les taux d'ARNm des marqueurs de cellules endothéliales lymphatiques, mais nous n'avons pas évalué son effet à des concentrations plus élevées ou dans des temps d'incubation plus long.

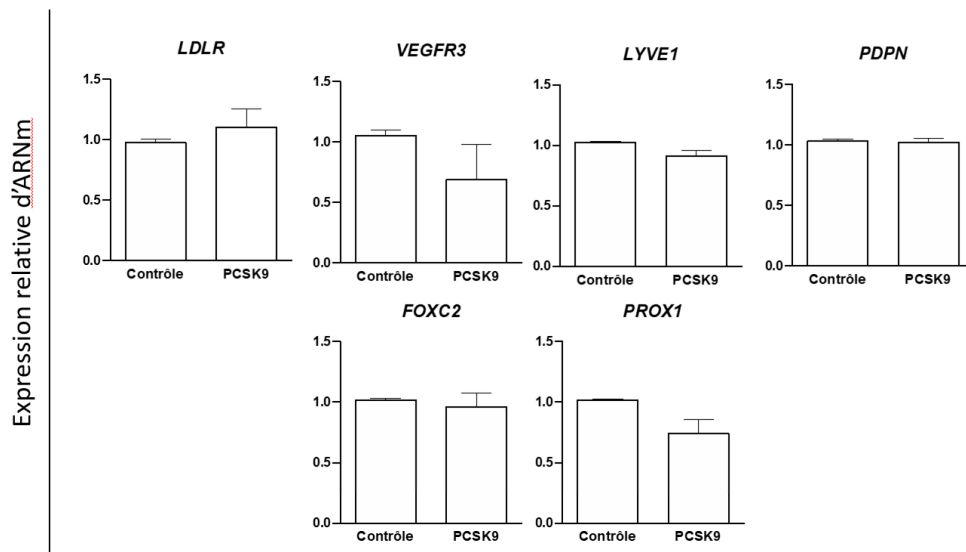


Figure 3.7 Effet du PCSK9 sur les taux d'ARNm des marqueurs lymphatiques. L'expression de l'ARNm du *LDLR*, *VEGFR3*, *LYVE-1*, *PDPN*, *FOXC2* et *PROX1* a été détectée dans les CEL par RT-qPCR suite au traitement de 16 heures avec 6,5 µg/ml de PCSK9 (n=3). Les résultats sont normalisés au gène rapporteur β 2-microglobuline. Les résultats ont été analysés par un test-t non pairé.

3.8 Le PCSK9 n'affecte pas l'expression des marqueurs lymphatiques membranaires

Même si les taux d'ARNm n'ont pas été affectés, nous avons vérifié par cytométrie en flux si l'expression des protéines membranaires LYVE-1, PDPN et VEGFR3 sur les CEL étaient modulée par du PCSK9 exogène. Nous savons que le traitement a fonctionné étant donné la diminution d'environ 65% de l'expression du LDLR, mais le PCSK9 n'a pas eu d'effet sur l'expression membranaire de LYVE-1, PDPN et VEGFR3 (Figure 3.8).

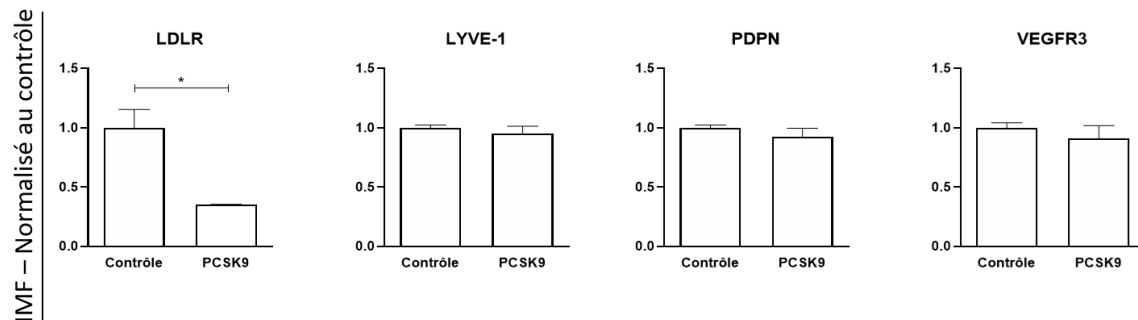


Figure 3.8 Effet du PCSK9 sur l'expression de LYVE-1, PDPN et VEGFR3. L'expression membranaire du LDLR, du VEGFR3, de LYVE-1 et de PDPN a été mesurée par cytométrie en flux après un traitement de 16 heures avec 6,5 µg/ml de PCSK9 (n=3). Les résultats ont été analysés par un test-t non païré. *p≤0.05

3.9 L'expression du LDLR peut être modulée par un siARN spécifique

Étant donné que le PCSK9 n'a pas d'effets sur l'expression des marqueurs lymphatiques, nous nous sommes penchés sur l'effet de la diminution spécifique du LDLR indépendamment de la présence du PCSK9. Nous observons une diminution d'environ 60% de la protéine totale (Figure 3.9A) et une diminution d'environ 40% de la protéine membranaire (Figure 3.9B). On peut observer que les bandes pour le siCTL augmentent d'intensité de gauche à droite, ce qui indique que la révélation n'a pas été faite uniformément pour cette membrane. Il ne peut s'agir d'une différence dans la quantité de protéine des échantillons étant donné que les bandes de la β-actine sont toutes égales. Ce problème de révélation est la raison pour laquelle l'écart-type du groupe siCTL est aussi élevé.

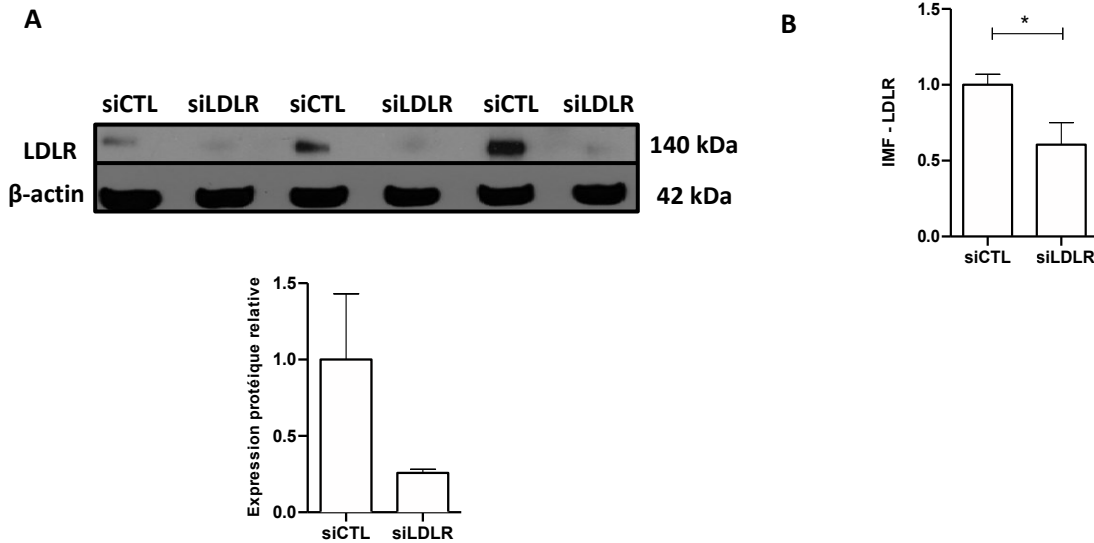


Figure 3.9 Modulation du LDLR par des siARN spécifique.

L'expression du LDLR a été détectée dans les CEL par (A) immunobuvardage et (B) cytométrie en flux suite à un traitement de 48 heures avec 25 nM de siCTL non spécifique ou de siLDLR (n=3). Les résultats ont été analysés par un test-t non païré. *p≤0.05

3.10 La diminution de l'expression du LDLR affecte les taux d'ARNm de *VEGFR3*, *LYVE1* et *PDPN*

Nous avons commencé par mesurer si la diminution du LDLR dans les CEL avec un siLDLR affecte les taux d'ARNm des marqueurs lymphatiques (Figure 3.10). Pour une diminution d'environ 50% de l'ARNm du *LDLR*, nous observons une diminution d'environ 30% de *VEGFR3*, une diminution d'environ 60% de *LYVE1* et une diminution d'environ 20% de la *PDPN*. Les taux d'ARNm de *FOXC2* et *PROX1* n'ont pas été affectés.

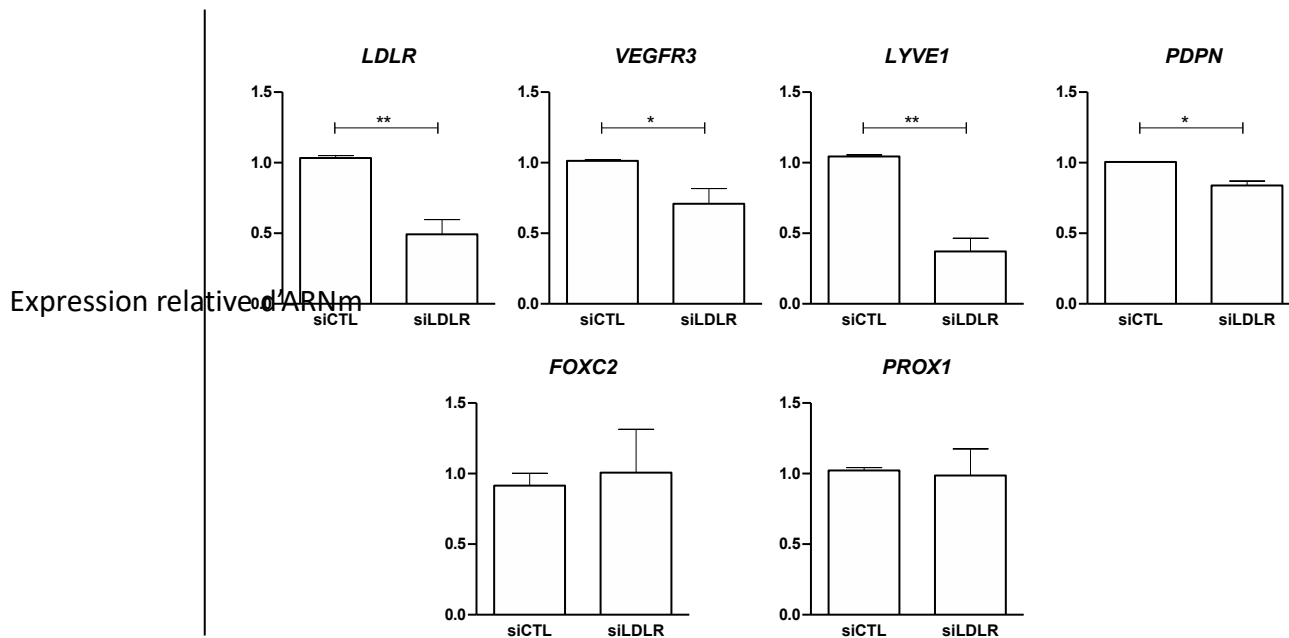


Figure 3.10 Effet de la diminution du LDLR sur les taux d'ARNm de marqueurs lymphatiques.

L'expression de l'ARNm du *LDLR*, *VEGFR3*, *LYVE-1*, *PDPN*, *FOXC2* et *PROX1* a été détectée dans les CEL par RT-qPCR suite aux traitements de 48 heures avec 25 nM de siLDLR (n=3). Les résultats ont été analysés par un test-t non pairé. * $p \leq 0.05$ et ** $p \leq 0.01$

3.11 La diminution de l'expression du LDLR diminue l'expression membranaire de LYVE-1 et de la PDPN

Nous avons ensuite vérifié si la diminution de l'ARNm se traduit par une diminution de l'expression membranaire de LYVE-1, PDPN et VEGFR3 (Figure 3.12). Nous observons une diminution d'environ 25% pour LYVE-1 et d'environ 40% pour la PDPN, mais pas de diminution VEGFR3. Nous n'avons pas mesuré l'expression de FOXC2 et de Prox1 par cytométrie en flux car ce ne sont pas des protéines membranaires.

intensité moyenne de fluorescence

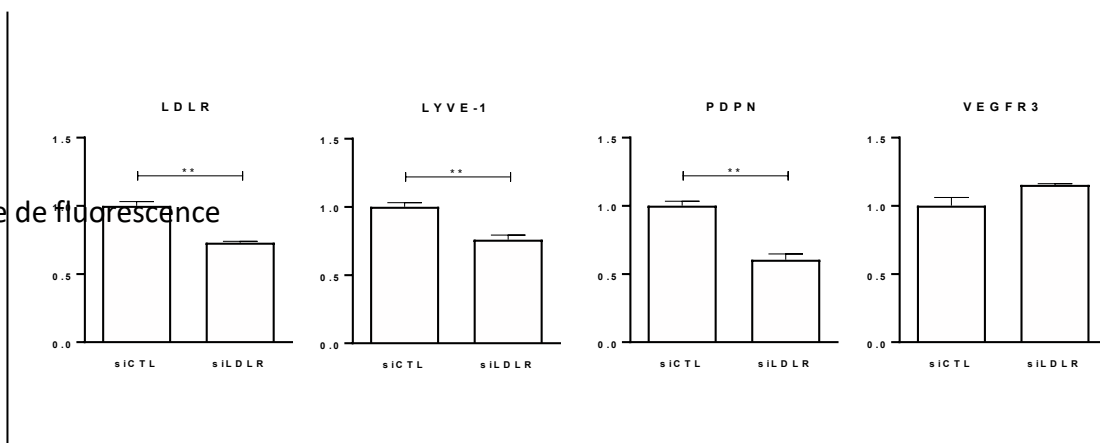


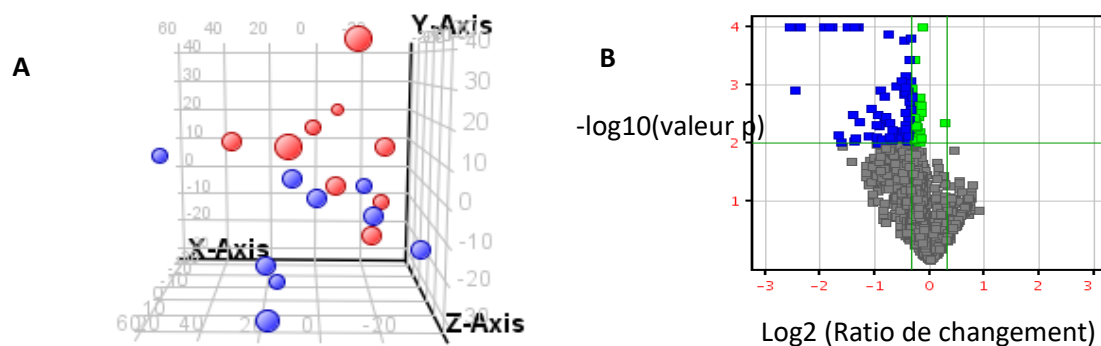
Figure 3.11 Effet de la diminution du LDLR par siARN sur l'expression membranaire de LYVE-1, PDPN et VEGFR3.

L'expression protéique du LDLR, du VEGFR3, de LYVE-1 et de PDPN a été mesurée par cytométrie en flux suite au traitement de 48 heures avec 25 nM de siLDLR (n=3). Les résultats ont été analysés par un test-t non pairé. **= $p \leq 0.01$

3.12 Une diminution du LDLR membranaire réduit la quantité intracellulaire de différents sous-types de lipides.

Étant donné que nous observons une diminution de Lyve-1 et de la PDPN qui sont deux marqueurs membranaires, nous nous sommes intéressés aux mécanismes par lesquels le LDLR pourrait affecter l'intégrité de la membrane. Nous avons donc entrepris une étude exploratoire par une analyse lipidomique non-ciblée sur des cellules traitées au siLDLR afin de déterminer si la diminution du LDLR pourrait affecter la quantité de lipides intracellulaires. L'avantage de cette approche est qu'elle permet une analyse de tous les lipides sans à priori en une seule analyse¹⁴¹. Les cellules ont été cultivées dans des pétris de verre pour limiter la contamination de polymères et ont été traitées pendant 48 heures avec 25 nM de siLDLR. Les résultats sont d'abord représentés sous forme d'une analyse en composantes principales (Figure 3.12A) afin d'évaluer de manière globale si le profil lipidomique affecte différenciellement nos deux groupes. Dans le cas présent, nous observons clairement une séparation entre le groupe siCTL (rouge) et le groupe siLDLR (bleu), ce qui indique un profil lipidique différent entre les deux conditions. Les 2139 entités détectées sont représentées sous forme de volcano plot (Figure 3.12B) qui permet d'observer les changements relatifs les plus discriminants entre les conditions siLDLR et

siCTL sur la base du ratio d'augmentation ou diminution (en abscisse) et de la valeur de P (en ordonnée). Sur la base des critères de sélection suivants : valeur de $P \leq 0.01$ et un ratio de changement de 1,25, nous observons que 80 signaux de spectrométrie de masse ont été modulés à la baisse (carrés bleus) dans le groupe siLDLR. Parmi les 80 signaux qui sont significativement différents après le traitement, on a identifié avec exactitude par MS/MS 12 lipides pour lesquels les résultats sont compilés dans un tableau (Figure 3.12C). Parmi ce nombre il y avait 5 lipides qui étaient diminués et qui sont des lipides pouvant jouer un rôle important au niveau de la membrane plasmique : 2 phosphatidylcholines (PC(18:2_22:6) et PC(16:1_18:2)), 1 sphingomyéline (SM(d18:1/21:0)) et 2 céramides (Cer(d18:1/22:0) et Cer(d18:1/23:0)). Le ratio de changement pour chaque lipide est indiqué dans le tableau. Nous observons donc que la diminution de l'expression du LDLR module les taux de lipides intracellulaires dont certains sont connues pour être impliqués dans le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique. Afin de confirmer ces résultats, il sera nécessaire de mesurer spécifiquement l'effet de la diminution du LDLR sur les lipides présents dans des échantillons de membranes isolées de CEL.



Type	Lipides	Variation après traitement (ratio de changement)
<i>Phosphatidylcholines</i>	PC(18:2_22:6)	Diminution (1,28)
	PC(16:1_18:2)	Diminution (1,28)
<i>Sphingomyélines</i>	SM(d18:1/21:0)	Diminution (1,35)
<i>Céramides</i>	Cer(d18:1/22:0)	Diminution (1,31)
	Cer(d18:1/23:0)	Diminution (1,29)
<i>Triglycérides</i>	TG(15:0_16:0_14:0)	Diminution (1,35)
	TG(14:0_16:0_16:0)	Diminution (1,36)
	TG(16:0_18:0_14:0)	Diminution (1,37)
	TG(16:0_16:0_18:0)	Diminution (1,35)
	TG(16:0_16:0_18:1) iso2	Diminution (1,27)
Ester de cholestérol	CE 16:0	Diminution (2,81)
	CE 18:1	Diminution (3,43)

Figure 3.12 Effet de la diminution du LDLR par siARN sur les taux de lipides intracellulaires des CEL.

Les lipides intracellulaires ont été détectés et quantifiés par LC/MS-QTOF suite au traitement de 48 heures avec 25 nM de siLDLR (n=9). Les résultats sont présentés par (A) analyse en composante principale (siLDLR en bleu et siCTL en rouge) et par (B) *volcano plot* avec le ratio de changement en Log2 en abscisse et la valeur de p en $-\log_{10}$ en ordonné. (C) Les lipides d'intérêts, les plus discriminants et identifiés par MS/MS, sont compilés dans un tableau selon leur type. Les données ont été analysées par un test t de student non païré suivi d'une correction de Benjamini-Hochberg.

Chapitre 4 : Discussion, conclusions et perspectives

4 Discussion

La recherche des dernières décennies a permis le développement de nouvelles thérapies visant à prévenir les maladies cardiovasculaires dans les patients prédisposés et traiter les patients atteints. Bien que plusieurs thérapies aient efficacement permis de réduire les taux de mortalité qui y sont associés, les maladies cardiovasculaires demeurent à ce jour la première cause de mortalité dans les pays développés. Nos projets s'inscrivent dans une démarche à long terme qui a pour but de développer des outils basés sur l'évaluation de la fonction lymphatique pour permettre de prévenir l'athérosclérose chez des sujets pour lesquels aucun facteur de risque apparent n'est présent. Dans le cadre de ce projet, nous avons démontré que CEL humaines expriment le LDLR et qu'il est capable d'exercer sa fonction principale qui est de lier et d'internaliser le LDL. Nous montrons aussi que les CEL n'expriment pas et ne sécrètent pas de PCSK9, mais qu'elles sont sensibles au PCSK9 exogène. Le PCSK9 n'a pas affecté la sécrétion de cytokines inflammatoires ou l'expression des marqueurs lymphatiques, tandis que le siLDLR a significativement diminué l'expression membranaire de LYVE-1 et PDPN. Nous avons aussi observé que la diminution de l'expression du LDLR a entraîné une diminution des taux de lipides intracellulaires.

4.1 L'expression du LDLR dans les CEL

Dans le but de tester nos hypothèses et d'évaluer l'effet spécifique de la modulation de l'expression du LDLR sur la fonction lymphatique, nous avons commencé par mesurer l'expression du LDLR sur les CEL humaines. Nous avons détecté le LDLR à l'intérieur et à la surface de la cellule et c'est à partir de ces observations que les hypothèses déjà émises et celles à suivre deviennent plausibles. Tout d'abord, il a déjà été décrit que l'expression de la protéine passe par le réticulum endoplasmique et le golgi¹²⁸. Ceci implique que les CEL peuvent elles aussi être affectées par la mutation du LDLR qui engendre un défaut dans le transport de la protéine entre le RE et le golgi¹²⁸.

4.2 Potentielles interactions entre le LDLR des CEL et les lipoprotéines présentes dans la lymphe

4.2.1 Interactions entre le LDLR et le HDL

Nos résultats indiquent que les CEL humaines expriment du LDLR à leur surface et qu'il peut exercer sa fonction de récepteur qui est de lier et d'internaliser du LDL natif. Cette fonction ouvre la porte à la possibilité d'interactions avec d'autres lipoprotéines, notamment le HDL. Nous savons que les taux de HDL dans la lymphe sont beaucoup plus élevés que ceux du LDL et il a déjà été démontré que le LDLR peut interagir avec le HDL via l'apoE^{129, 130}. Des effets physiologiques de cette interaction ont été démontrés dans des modèles de souris *Ldlr*^{-/-} dans lesquels une diminution significative de l'internalisation de HDL par le foie a été observée¹³¹. Cette diminution serait due à l'absence de LDLR et serait indépendante de l'expression du récepteur classique du HDL (SR-B1) sur les hépatocytes. Dans le même ordre d'idées, il a été démontré que les concentrations de HDL contenant de l'apoE diminuaient dans un modèle *Pcsk9*^{-/-} qui surexprime le LDLR¹³². Le métabolisme du HDL dépend donc en partie du LDLR. Il serait alors pertinent d'étudier si l'interaction entre le HDL et le LDLR serait nécessaire au maintien d'une fonction lymphatique. À ce propos, il a déjà été décrit que l'apoA-1 (l'apolipoprotéine principale du HDL) a des effets protecteurs sur la fonction lymphatique en condition d'athérosclérose¹³³. Ces effets protecteurs ont été étudiés dans un modèle de souris athérosclérotique (*Ldlr*^{-/-} sur une diète riche en cholestérol) dans lequel un traitement avec de l'apoA-1 pendant 6 semaines a réduit l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux collecteurs et la quantité de lipides accumulés dans l'aorte, et a restauré le transport cellulaire par le système lymphatique. Il s'agirait donc d'évaluer si une absence ou une dysfonction du LDLR dans les vaisseaux lymphatiques empêcheraient une interaction avec les particules de HDL qui serait bénéfique pour les cellules lymphatiques. Le HDL lymphatique a une forme discoïdale et est fortement chargé en cholestérol, contrairement au HDL plasmatique qui en contient moins et qui a une forme sphérique. Le défi serait donc de pouvoir obtenir la bonne forme de HDL à injecter dans ces souris afin d'avoir des effets physiologiques représentatifs.

4.2.2 Interactions entre le LDLR et le LDL

Il a été démontré que l'injection de LDL dans l'espace interstitiel à proximité des vaisseaux lymphatiques au niveau du diaphragme de rat a un effet bénéfique sur la fonction lymphatique¹³⁴. Le LDL a induit une nette amélioration de la fonction lymphatique en augmentant la fréquence des contractions des vaisseaux (+126% par rapport au contrôle). Ce résultat est pertinent dans le cadre de ce projet pour deux raisons. En omettant le fait que les taux de LDL sont très faibles dans la lymphe, cette étude vient appuyer notre hypothèse selon laquelle le LDLR aurait un rôle spécifique à jouer dans la fonction lymphatique. Par contre, l'expression du LDLR ou son interaction avec le LDL n'ont pas été abordés dans cette étude et il sera donc nécessaire de tester notre hypothèse *in vivo*. La deuxième raison est que cette étude a montré une amélioration de la capacité de contraction et nous savons que non seulement la dysfonction lymphatique en condition d'athérosclérose survient au niveau des vaisseaux collecteurs, mais aussi que le fait d'améliorer la capacité contractile de ces vaisseaux réduit la progression de l'athérosclérose¹⁰³. De ce fait, cette étude appuie notre hypothèse selon laquelle la diminution de l'expression du LDLR sur les CEL pourrait induire une perte de la capacité de contraction des vaisseaux collecteurs, causant ainsi l'apparition de la dysfonction lymphatique. Il reste toutefois à élucider les mécanismes via lesquels la perte du LDLR pourrait mener à cette dysfonction lymphatique.

4.3 Mécanisme de régulation de l'expression du LDLR dans les CEL

Puisque les cellules lymphatiques entrent en contact avec différentes lipoprotéines, il serait justement pertinent de se pencher sur les mécanismes qui régissent le métabolisme du cholestérol dans les CEL. Nos résultats suggèrent que les CEL réagissent de la même façon que les fibroblastes ou les hépatocytes lorsqu'elles sont incubées avec du milieu sans suppléments. Ces types cellulaires ont tendance à surexprimer le LDLR en condition de privation de nutriments et on observe cette même réponse par les CEL. Cette réponse vise probablement à essayer de pallier la carence en nutriments et le fait que les CEL surexpriment le LDLR dans cette condition suggère qu'il est important pour le bon fonctionnement des cellules en conditions normales. Les mécanismes moléculaires de l'hypercholestérolémie familiale ont été mis en lumière *in vitro* grâce à la culture de

fibroblastes provenant de patients sains et de patients atteints d'hypercholestérolémie familiale. Ces patients avaient une mutation dans le LDLR et leurs fibroblastes isolés étaient incapables de dégrader le LDL présent dans le milieu et ne réagissaient pas aux changements entre un milieu riche en LDL ou pauvre en LDL¹⁴. Une absence ou une dysfonction du LDLR sur les CEL dans des patients hypercholestérolémiques pourraient donc affecter les mécanismes d'homéostasie cellulaire en limitant l'apport en cholestérol provenant du LDL.

4.4 PCSK9 et fonction lymphatique

Étant donné qu'une amélioration de la fonction lymphatique est observée dans un modèle *Pcsk9*^{-/-}, l'une de nos hypothèses est que le PCSK9 jouerait un rôle important dans l'apparition de la dysfonction lymphatique. Son expression est induite en condition d'inflammation et il est non seulement connu pour activer les voies menant à l'expression de cytokines pro-inflammatoires, mais aussi pour être impliqué dans l'apoptose des cellules endothéliales sanguines¹³⁵.

4.4.1 Origine du PCSK9 en circulation dans la lymphe

Nous savons qu'il est peu ou pas présent dans la lymphe à l'état basal, mais il est détecté en assez forte quantité en condition pathologique dans les souris athérosclérotiques¹²⁰. Nous avons déterminé qu'il n'est pas exprimé ou sécrété par les CEL et donc qu'il proviendrait d'ailleurs dans la circulation. Une première hypothèse serait qu'il y a du PCSK9 qui se retrouve dans le fluide interstitiel et qui est absorbé par les capillaires lymphatiques. Cette hypothèse est d'autant plus plausible dans le contexte d'une dysfonction lymphatique liée à l'athérosclérose étant donné que les concentrations de PCSK9 augmentent en conditions pathologiques¹³⁶⁻¹⁴¹. De plus, nous savons que la dysfonction lymphatique survient au niveau des collecteurs et non pas des capillaires, ce qui implique que les capillaires lymphatiques pourraient absorber le PCSK9 en condition pathologique, indépendamment d'une dysfonction lymphatique qui serait observée au niveau des collecteurs. La deuxième hypothèse serait qu'il proviendrait de la circulation sanguine suite à une perte de l'intégrité de la jonction lymphoveineuse¹⁴², ce qui est abordé plus en détail dans la section 4.5.2. À cette jonction, la lymphe se déverse dans le sang, mais le sang ne devrait pas pouvoir se retrouver dans la lymphe, du moins en condition

normale. Une perte de l'intégrité de cette jonction impliquerait un retour du sang vers la lymphe et, se faisant, pourrait mener à l'entrée du PCSK9 dans la lymphe. Une autre hypothèse serait que le PCSK9 soit sécrété par les CMLym qui recouvrent la monocouche de cellules endothéliales dans les vaisseaux lymphatiques. En effet, même si les cellules endothéliales lymphatiques n'expriment pas de PCSK9, il a été démontré que les CML et les cellules endothéliales sanguines au niveau de l'aorte sécrètent une forme active de PCSK9^{143, 144}. Cela impliquerait toutefois que le PCSK9, après avoir été sécrété par les CMLym, puisse traverser la monocouche de CEL pour ensuite être diffusé dans la lymphe. Cette hypothèse pourrait être sujette à débat étant donné les interactions entre les CML et les cellules endothéliales ont déjà été bien décrites dans les vaisseaux sanguins, et il a été relevé que la membrane basale et la limitante élastique empêchent des interactions physiques entre les deux types cellulaires. Il sera toutefois nécessaire de vérifier cette hypothèse pour les CMLym. Nous pouvons regarder par immunofluorescence si les CMLym des vaisseaux de souris expriment le PCSK9 dans différents modèles comme des WT, des *Pcsk9*^{-/-} et des *Ldlr*^{-/-}. Nous pouvons alors comparer entre les différents modèles si la variation de la concentration de PCSK9 dans la lymphe correspond à son niveau d'expression dans les CMLym.

4.4.2 Interactions entre le PCSK9 et les CEL via le LDLR

Bien que nous soupçonnions un effet du PCSK9 indépendant de son interaction avec le LDLR, le fait de mesurer la dégradation de son récepteur nous indique que le PCSK9 est sous sa forme active et que le traitement a fonctionné. Le fait que le PCSK9 exogène réduit l'expression du LDLR dans des CEL en culture est un résultat en soi. Ce test a échoué dans plusieurs types cellulaires comme les fibroblastes et les cellules ovariennes de hamster chinois qui expriment le LDLR, mais ne montre pas de réponse au PCSK9. Il se pourrait donc que les cinétiques d'interactions entre le LDLR et le PCSK9 diffèrent d'un type cellulaire à l'autre, par exemple que la constante de dissociation du PCSK9 soit plus élevée pour le LDLR des CEL que celui des hépatocytes.

4.4.3 Effets de la présence du PCSK9 sur les CEL

Après avoir déterminé que le PCSK9 exogène module l'expression du LDLR sur les CEL, nous avons mesuré la sécrétion de cytokines inflammatoires suite à l'incubation

avec du PCSK9. Nous nous attendions à une augmentation de la sécrétion de cytokines de la même manière que dans les cellules endothéliales sanguines, mais ce mécanisme ne semble pas être affecté dans les CEL. Suite à ce résultat négatif, nous nous sommes penchés sur l'effet du PCSK9 sur l'expression des marqueurs lymphatiques importants et sa présence n'a pas affecté les taux d'ARNm ni l'expression protéique de ces marqueurs. Nous n'avons donc, pour le moment, aucun indice qui nous permette de croire que la dysfonction lymphatique observée dans le modèle *Ldlr*^{-/-};*hApoB*^{+/+} est due à l'augmentation du PCSK9 en circulation dans la lymphe, ou que l'amélioration de la fonction dans le modèle *Pcsk9*^{-/-} serait due à l'absence du PCSK9. À noter toutefois que ces expériences ont été faites dans des conditions physiologiques en absence de stress comme l'inflammation et une seule dose de PCSK9 a été utilisée pour les expériences présentées. Nous pourrions donc tester l'effet du PCSK9 en condition pathologique en évaluant l'effet de doses croissantes de PCSK9 sur un endothélium inflammé. Pour ce faire, nous pouvons simuler un phénotype inflammatoire en incubant les CEL avec du TNF- α ¹⁴⁵. Nous pouvons ensuite ajouter le PCSK9 et mesurer la sécrétion de cytokines, les taux d'apoptose et les niveaux d'expression des marqueurs lymphatiques.

4.5 Effet de la diminution du LDLR sur l'expression de marqueurs lymphatiques

Étant donné que nous n'observons pas d'effet direct du PCSK9 sur l'intégrité des CEL, nous nous sommes concentrés sur la diminution spécifique de l'ARN du LDLR. Avec le traitement au siLDLR, nous observons une diminution de la quantité d'ARNm et de protéines pour LYVE-1 et podoplanine, et une diminution de la quantité d'ARNm de VEGFR3 sans toutefois observer de changement dans la protéine. Il sera toutefois nécessaire d'évaluer si des traitements à des concentrations plus élevées ou des temps d'incubation plus longs auraient des effets sur l'expression du VEGFR3.

4.5.1 LYVE-1

LYVE-1 est exprimé dans les capillaires lymphatiques et joue un rôle important dans l'entrée des leucocytes par intravasation dans le système lymphatique. Les capillaires lymphatiques sont généralement caractérisés par des jonctions de type bouton¹⁴⁶ et il

s'avère que l'intravasation de leucocytes comme les cellules dendritiques nécessite l'envoi de signaux intracellulaires afin d'induire un déboutonnement de ces jonctions. Une diminution de l'expression de LYVE-1 sur les capillaires lymphatiques pourrait réduire les interactions entre les CEL et l'acide hyaluronique présent sur les cellules dendritiques, ce qui va limiter l'entrée de cellules immunitaires dans le système lymphatique et affecter la réaction immunitaire en condition pathologique. Il a été démontré *in vitro* sur une monocouche de CEL que de l'acide hyaluronique purifié, le ligand de LYVE-1, active la voie de signalisation des tyrosines kinases et mène à la phosphorylation de la VE-cadhérine et à son internalisation, ce qui va diminuer la rigidité des jonctions endothéliales et augmenter la perméabilité cellulaire¹⁴⁷. Étant donné qu'il est exprimé dans les cellules endothéliales des capillaires lymphatiques, il serait logique d'émettre l'hypothèse que la diminution de LYVE-1 induite par la diminution du LDLR affecterait l'absorption de liquide interstitiel. Toutefois, lorsque la fonction lymphatique a été évaluée dans des souris *Ldlr^{-/-};hApoB100^{+/+}* comparativement à des souris *Pcsk9^{-/-}*, il n'y avait pas de défaut dans l'expression de LYVE-1 sur les vaisseaux capillaires et leur capacité d'absorption. LYVE-1 est aussi impliqué dans la lymphangiogénèse¹¹⁰ et jouerait un rôle structural¹⁴⁸. Nous suspectons que la diminution de LYVE-1 pourrait être le résultat d'une dysfonction lymphatique généralisée causant une perte de l'intégrité des cellules endothéliales, autant dans les capillaires que les collecteurs.

4.5.2 PDPN

Bien qu'elle soit majoritairement étudiée durant le développement, il n'en demeure pas moins qu'il s'agit d'une protéine transmembranaire fortement exprimée dans les vaisseaux collecteurs et une diminution significative de son expression pourrait affecter l'intégrité structurale des vaisseaux. De plus, grâce à son interaction avec le CLEC-2 exprimé sur les plaquettes, elle permet la séparation efficace entre le système lymphatique et le système sanguin au niveau de la veine sous-clavière (endroit où la lymphe se déverse dans le sang) afin d'empêcher un retour du sang dans la lymphe^{149, 150}. L'intégrité de cette jonction lymphoveineuse est cruciale durant le développement et la perte de l'intégrité de ce site mène à l'apparition d'œdème et un retour anormal du sang dans le système lymphatique¹⁴². Ceci nous ramène à l'hypothèse selon laquelle le PCSK9 dans la lymphe

proviendrait d'une dysfonction de la jonction lymphoveineuse qui, à présent, est plus plausible. Nous pouvons tester cette hypothèse *in vitro* en mesurant le niveau d'adhésion plaquettaire sur les CEL suite au traitement au siLDLR. Nous nous attendons à ce qu'il y ait une moins bonne adhésion des plaquettes à cause de la diminution de l'expression de la PDPN. La PDPN joue aussi un rôle important dans la migration et la formation de vaisseaux et des défauts dans la formation de tubes capillaires, l'adhésion et la migration cellulaire ont été observés chez des souris *Pdpr*^{-/-}.

4.5.3 VEGFR3

Nous n'avons pas observé de diminution de la protéine pour le VEGFR3 malgré une diminution significative de son ARNm lorsque les CEL étaient traitées au siLDLR. Étant le récepteur de facteur de croissance des cellules endothéliales lymphatiques, son expression doit être étroitement régulée¹⁵¹. Les traitements au siLDLR se font dans du milieu supplémenté afin d'éviter la mort des cellules après 48 heures, ce qui implique que les cellules sont constamment en contact avec les facteurs de croissance. Il se pourrait qu'il s'agisse d'un mécanisme de compensation des cellules qui les poussent à maintenir une expression constante et un recyclage intracellulaire maintenu tant qu'il y a des nutriments. Il faut aussi tenir compte du fait qu'un changement dans l'ARNm ne se traduit pas nécessairement par un changement dans l'expression de la protéine, et ce à cause de plusieurs composantes intracellulaires. La traduction d'un ARNm en protéine peut varier en fonction de la séquence de l'ARNm, de la présence et de la liaison d'éléments non-codants et en fonction des mécanismes de régulation post-traductionnels¹⁵²⁻¹⁵⁴. La synthèse de protéine peut aussi varier en fonction du temps et il est possible d'observer un délai entre les changements en ARNm et la quantité de protéines produites et une fois produites, les taux de protéine peuvent être modulés par le protéasome et des mécanismes d'autophagie^{155, 156}. Il s'agit de mécanismes de régulation assez complexe à contrôler *in vitro* étant donné que les cellules ont une durée de vie très limitée et que les traitements risquent de perdre leur efficacité au-delà des temps d'incubation recommandés par la compagnie.

4.5.4 FOXC2 et Prox1

Nous n'avons pas observé de changement dans les taux d'ARNm de *FOXC2* et de *Prox1* lorsque les CEL étaient traitées au siLDLR. *FOXC2* est principalement retrouvé au niveau des valves des vaisseaux collecteurs et l'étude de son expression est plus pertinente *in vivo*. Il a d'ailleurs été démontré que l'expression de *FOXC2* sur les CEL des vaisseaux collecteurs diminue dans des souris *Ldlr^{-/-}* sur une diète riche en cholestérol (qui ont développé de l'athérosclérose) et qu'un traitement visant à maintenir et améliorer la fonction lymphatique permet de prévenir cette diminution de *FOXC2*¹⁰³. Son expression reste donc un paramètre pertinent à mesurer dans le cadre de l'apparition de la dysfonction lymphatique. Bien que son expression soit donc rarement étudiée *in vitro*, des études ont été faites dans des CEL en culture dans lesquelles ses mécanismes de phosphorylation ont été étudiés. Des sites de phosphorylation ont été identifiés sur *FOXC2* et la perte de phosphorylation à ces sites affecte les mécanismes de transcription des CEL en perturbant l'expression d'une multitude de gènes. Les gènes étudiés dans le cadre de ce projet ne figurent pas dans cette liste. On retrouve toutefois des gènes qui codent pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (cyclines A1, A2, B2, E2, *cyclin-dependent kinase 1*, *wee1-like protein kinase* et *kinesin family member 11*). Nous pourrions donc étudier les domaines phosphorylés et les mécanismes par lesquels ils régulent la transcription et le cycle cellulaire dans les CEL. Nous pouvons vérifier cette hypothèse par un test de cytométrie en flux qui permet de mesurer la quantité de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire. Un protocole déjà bien établi dans la littérature consiste à incuber les cellules avec de l'iodure de propidium qui est une molécule fluorescente qui se lie à l'ADN, et les niveaux de fluorescence permettent de différencier les différentes phases du cycle cellulaire (S, G1 et G2/M)¹⁵⁷. En parallèle, il faudrait mesurer les niveaux des protéines comme les cyclines A1, A2, B2 et E2 qui régulent le cycle cellulaire. Quant à *Prox1*, il est principalement étudié à l'étape de la différenciation durant le développement, mais aussi dans la régulation du cycle cellulaire des CEL¹⁵⁸. Bien que son expression ne soit pas affectée, l'hypothèse du cycle cellulaire sera tout de même étudiée avec la méthode décrite précédemment.

4.6 Effet de la diminution du LDLR sur les taux de lipides intracellulaires

Nous remarquons que le siLDLR affecte l'expression de protéines membranaires et nous nous sommes penchés sur le lien qu'il pourrait y avoir entre la diminution du LDLR, l'expression de marqueurs membranaires et les taux de lipides intracellulaires. Il est possible que l'expression de Lyve-1 et de la podoplanine ne soit pas directement affectée par la diminution du LDLR, mais plutôt indirectement par la diminution des lipides causée par l'absence du LDLR. L'effet du PCSK9 sur ces lipides n'a pas été évalué étant donné qu'il n'a pas eu d'effet sur les marqueurs lymphatiques membranaires. Parmi tous les lipides détectés qui ont diminués suite au traitement au siLDLR, nous sommes intéressés aux phosphatidylcholines, aux sphingomyélines et aux céramides qui peuvent tous être des composants importants de la membrane plasmique.

4.6.1 Les phosphatidylcholines

Les phosphatidylcholines sont des lipides qui comptent pour environ 40% des phospholipides dans les cellules¹⁵⁹. Leur importance dans le maintien de l'intégrité des membranes a été démontrée *in vivo* chez des souris dans lesquelles la voie qui mène à leur synthèse a été bloquée. Étant donné que les ratios de lipides membranaires (phosphatidylcholines sur phosphatidyléthanolamines) ont été perturbés, ces souris ont développé une insuffisance hépatique causée par une perte de l'intégrité de la membrane des cellules du foie¹⁶⁰. Cette étude a montré l'importance de réguler les ratios de lipides membranaires et une diminution des phosphatidylcholines pourraient fortement affecter l'intégrité structurale de la membrane plasmique de la cellule et des organites. En plus des effets néfastes sur l'intégrité structurale des cellules, une altération de la quantité de phosphatidylcholines peut affecter les processus normaux de prolifération et de viabilité cellulaire. Par exemple, une forte diminution de la quantité de phosphatidylcholines peut mener à la mort cellulaire¹⁶¹. Il faut aussi savoir que les phosphatidylcholines peuvent être clivés par la *phosphatidylcholine-specific phospholipase C* (PC-PLC)¹⁵⁹. Bien qu'elle n'ait pas été étudié dans les CEL, la PC-PLC est exprimé dans les cellules endothéliales sanguines et sa suppression empêche le fonctionnement normal des voies de signalisation d'apoptose¹⁶².

4.6.2 Les sphingomyélines et les céramides

Les sphingomyélines sont des lipides membranaires qui participent au maintien de la rigidité de la bicouche lipidique et les céramides sont un produit du clivage des sphingomyélines par l'acide sphingomyélinase¹⁶³. Les céramides peuvent aussi être synthétisés *de novo*¹⁶⁴ et, bien que moins abondants que les phosphatidylcholines, les céramides sont aussi des composants de la membrane plasmique¹⁶⁵. Les sphingomyélines sont un sous-type de lipides de la famille des sphingolipides qui sont plus abondants dans les radeaux lipidiques que le reste de la membrane plasmique^{166, 167} et il a été rapporté que le LDLR est détecté spécifiquement dans les radeaux lipidiques¹⁶⁸. Les radeaux lipidiques sont des domaines de la membrane caractérisés par une grande proportion de cholestérol et de phospholipides saturés¹⁶⁹. Ils sont reconnus pour être impliqués dans plusieurs processus biologiques de la membrane tels que l'acheminement des protéines, l'internalisation et la transduction de signaux intracellulaires^{170, 171}. La diminution de la quantité de sphingomyélines pourrait donc non seulement affecter l'intégrité de la membrane plasmique en perturbant la composition des radeaux lipidiques, mais aussi affecter tous les processus régits par ces domaines spécialisés. Étant donné que les céramides sont dérivées des sphingomyélines, il est logique d'observer une diminution de leur quantité. Les céramides sont importants pour la stabilité de la bicouche lipidique¹⁷² et ils participent à la régulation de la prolifération cellulaire en induisant l'apoptose en condition normale^{173, 174}

Chapitre 5 : Conclusion et perspectives

5.1 Conclusion

Basé sur une étude qui a démontré que des souris *Ldlr^{-/-};hApoB100^{+/+}* développent une dysfonction lymphatique tandis que des souris *Pcsk9^{-/-}* ont une fonction lymphatique améliorée, ce projet vise à étudier les mécanismes par lesquels l'expression du LDLR ou la présence de PCSK9 pourraient affecter la fonction lymphatique. Ces résultats préliminaires nous ont permis de trouver des pistes à suivre pour élucider les mécanismes par lesquels l'absence du LDLR sur les vaisseaux lymphatiques collecteurs induit une dysfonction lymphatique. Nous savons désormais que la diminution de l'ARNm du LDLR des cellules endothéliales lymphatiques affecte l'expression de marqueurs lymphatiques importants (LYVE-1 et PDPN). Étant fortement exprimés dans les vaisseaux lymphatiques, la diminution de l'expression de ces deux marqueurs pourrait mener à la perte de l'intégrité de l'endothélium lymphatique. Une diminution de l'expression de la PDPN pourrait aussi limiter les interactions entre les plaquettes et les CEL et mener à la perturbation de la jonction lymphoveineuse. Nous avons aussi montré que la diminution du LDLR affecte les taux de lipides qui sont impliqués dans plusieurs mécanismes cellulaires, tels que la prolifération et l'apoptose, et dans la composition des membranes cellulaires. Globalement, ces résultats nous portent à croire que la dysfonction lymphatique observée en absence du LDLR pourrait être causée par une perturbation des membranes plasmiques et des processus normaux des CEL.

5.2 Perspectives

5.2.1 Expériences *in vitro* à compléter

Bien que ce projet nous ait permis d'obtenir des résultats intéressants et des pistes pour comprendre la dysfonction lymphatique induite par l'absence du LDLR, il reste beaucoup d'hypothèses à confirmer. Nous devons tout d'abord confirmer par immunofluorescence que le LDLR et le Golgi sont colocalisés, et que le LDLR et le LDL sont internalisés en complexe suite à leur liaison. Il serait aussi pertinent d'observer par cytométrie en flux les effets du PCSK9 et du siLDLR sur les mécanismes d'apoptoses des CEL et, en parallèle, de mesurer l'expression de protéines pro-apoptotiques (Bax et caspase-3) et anti-apoptotiques (Bcl-2)¹³⁵. Nous avons fait des tests préliminaires avec du

PCSK9 et nous n'avons pas observé de changement dans les taux d'apoptose. Il faudrait aussi tester l'effet du PCSK9 et du siLDLR sur le cycle cellulaire et sur l'expression des protéines qui le régulent (par ex. les cyclines A1, A2, B2 et E2). Pour le moment, nous avons travaillé avec une dose minimale de PCSK9 qui induit une diminution significative du LDLR. Or, pour simuler une condition pathologique, il serait non seulement pertinent de tester de plus hautes doses de PCSK9, mais aussi de tester l'effet du traitement sur un endothélium inflammé. Nous allons donc commencer par traiter les CEL avec du TNF- α pour induire un phénotype inflammatoire¹⁴⁵ puis incuber les cellules avec des doses croissantes de PCSK9.

On note que les marqueurs lymphatiques dont l'expression a diminué suite au traitement au siLDLR, soit LYVE-1 et PDPN, sont deux protéines transmembranaires. Il serait intéressant de tester si le LDLR interagit physiquement avec ces protéines à l'aide d'un test de co-immunoprécipitation. Ce test permet de détecter les interactions protéine-protéine et serait donc adéquat dans ce contexte. Le fait que seules les protéines membranaires sont affectées peut nous amener à penser qu'il pourrait y avoir des effets directs sur la structure de la membrane. Grâce à l'approche de lipidomique non-ciblée, nous savons que plusieurs lipides sont modulés à la baisse suite au traitement au siLDLR. Ces résultats indiquent que la diminution de l'expression du LDLR pourrait affecter la structure membranaire. Toutefois, afin de tirer des conclusions claires, nous allons spécifiquement mesurer les lipides membranaires d'extraits contenant uniquement des membranes isolées de CEL. En cas de diminution des lipides membranaires, nous allons spécifiquement nous intéresser aux radeaux lipidiques qui sont des domaines de la membrane caractérisés par une grande proportion de cholestérol et de phospholipides saturés¹⁶⁹. Ces domaines sont reconnus pour être impliqués dans plusieurs processus biologiques de la membrane tels que l'acheminement de protéines, l'internalisation et la transduction de signaux intracellulaires^{170, 171}. Nous allons détecter ces radeaux par immunofluorescence en incubant les cellules avec un anticorps spécifique à la flotiline, une protéine enrichie dans les radeaux lipidiques, et évaluer s'il y a une colocalisation du LDLR dans ces domaines. Nous allons aussi déterminer si un traitement au siLDLR affecte l'intégrité des radeaux lipidiques en utilisant comme contrôle la méthyl- β -cyclodextrine, un agent qui perturbe les radeaux lipidiques.

5.2.2 Expériences *in vivo* à venir

Les expériences *in vivo* seront menées dans un modèle de souris *Pcsk9^{-/-}* dans lequel nous injectons un adénovirus qui bloque spécifiquement l'expression du LDLR dans les cellules endothéliales lymphatiques. Avec ce modèle, nous pouvons évaluer spécifiquement l'effet de la diminution du LDLR sur la fonction lymphatique sans interférer avec le reste de la périphérie. Étant donné qu'il n'y a pas de PCSK9 en circulation dans ce modèle, il nous permettra de confirmer que la dysfonction lymphatique est due uniquement à l'absence du LDLR. Les méthodes *in vivo* sont déjà bien mises au point dans notre laboratoire et nous pouvons efficacement mesurer le transport lymphatique, la perméabilité des vaisseaux, la capacité d'absorption des capillaires, la capacité de contractions des collecteurs et le contenu de la lymphe. Il a déjà été démontré que la perméabilité des vaisseaux lymphatiques augmentait dans des souris *Ldlr^{-/-};hApoB100^{+/+}* et que la fréquence de contractions des vaisseaux lymphatiques diminuait, sans toutefois observer de changement dans l'absorption de la lymphe par les capillaires lymphatiques. Nous pensons donc que la diminution du LDLR dans notre modèle *Pcsk9^{-/-}* va augmenter la perméabilité et induire une fuite des vaisseaux lymphatiques sans nécessairement affecter la capacité d'absorption des capillaires. Par contre, nous devrions observer une diminution de la fréquence des contractions des vaisseaux collecteurs et, en cas de résultats positifs, nous pouvons nous pencher sur les mécanismes d'action possibles, par exemple en mesurant l'expression des marqueurs lymphatiques comme LYVE-1, VEGFR3, PDPN, Prox1 et FOXC2 comme nous l'avons fait *in vitro*. Nous allons surtout nous concentrer sur le VEGFR3 et ses mécanismes de signalisation via le VEGFC qui sont impliqués dans les contractions des vaisseaux collecteurs.

5.2.3 Projet clinique et perspectives thérapeutiques

Les résultats inclus dans ce mémoire combinés à nos publications antérieures suggèrent qu'une absence ou une dysfonction du LDLR, comme c'est le cas chez la majorité des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, pourrait être la cause d'une dysfonction lymphatique. Des mutations dans le LDLR favoriseraient donc l'apparition et la progression de l'athérosclérose en perturbant le métabolisme du cholestérol et la fonction lymphatique. Nous pouvons même, à partir des résultats obtenus chez la souris, extrapoler

et émettre l'hypothèse que cette dysfonction lymphatique survient avant l'accumulation de cholestérol dans la périphérie, ce qui impliquerait que cette dysfonction serait l'un des premiers signes de l'apparition de l'athérosclérose. Ces hypothèses sont actuellement à l'étude dans notre laboratoire.

Bibliographie

1. Yamamoto, T. *et al.* The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* **39**, 27-38 (1984).
2. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **232**, 34-47 (1986).
3. Radding, C.M., Bragdon, J.H. & Steinberg, D. The synthesis of low- and high-density lipoproteins by rat liver in vitro. *Biochim Biophys Acta* **30**, 443-444 (1958).
4. Wiklund, O., Dyer, C.A., Tsao, B.P. & Curtiss, L.K. Stoichiometric binding of apolipoprotein B-specific monoclonal antibodies to low density lipoproteins. *J Biol Chem* **260**, 10956-10960 (1985).
5. Martinez-Olivan, J. *et al.* Low-density lipoprotein receptor is a calcium/magnesium sensor - role of LR4 and LR5 ion interaction kinetics in low-density lipoprotein release in the endosome. *FEBS J* **281**, 2638-2658 (2014).
6. Hu, J., Zhang, Z., Shen, W.J. & Azhar, S. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab (Lond)* **7**, 47 (2010).
7. Herrmann, T. & Sharma, S. Physiology, Membrane, in *StatPearls* (Treasure Island (FL); 2019).
8. Hamilton, R.L., Williams, M.C., Fielding, C.J. & Havel, R.J. Discoidal bilayer structure of nascent high density lipoproteins from perfused rat liver. *J Clin Invest* **58**, 667-680 (1976).
9. Green, P.H., Tall, A.R. & Glickman, R.M. Rat intestine secretes discoid high density lipoprotein. *J Clin Invest* **61**, 528-534 (1978).
10. Goldstein, J.L. & Brown, M.S. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* **46**, 897-930 (1977).
11. Brown, M.S., Dana, S.E. & Goldstein, J.L. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts by lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 2162-2166 (1973).
12. Goldstein, J.L. & Brown, M.S. Familial hypercholesterolemia: identification of a defect in the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity associated with overproduction of cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 2804-2808 (1973).
13. Goldstein, J.L., Harrod, M.J. & Brown, M.S. Homozygous familial hypercholesterolemia: specificity of the biochemical defect in cultured cells and feasibility of prenatal detection. *Am J Hum Genet* **26**, 199-206 (1974).
14. Goldstein, J.L. & Brown, M.S. Binding and degradation of low density lipoproteins by cultured human fibroblasts. Comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* **249**, 5153-5162 (1974).

15. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. *Cell* **6**, 307-316 (1975).
16. Shimomura, I. *et al.* Cholesterol feeding reduces nuclear forms of sterol regulatory element binding proteins in hamster liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12354-12359 (1997).
17. Eberle, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P. & Foufelle, F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie* **86**, 839-848 (2004).
18. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **89**, 331-340 (1997).
19. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11041-11048 (1999).
20. Smith, J.R., Osborne, T.F., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem* **265**, 2306-2310 (1990).
21. Vallett, S.M., Sanchez, H.B., Rosenfeld, J.M. & Osborne, T.F. A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *J Biol Chem* **271**, 12247-12253 (1996).
22. Horton, J.D., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* **109**, 1125-1131 (2002).
23. Benjannet, S. *et al.* NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem* **279**, 48865-48875 (2004).
24. Lagace, T.A. *et al.* Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest* **116**, 2995-3005 (2006).
25. Fisher, T.S. *et al.* Effects of pH and low density lipoprotein (LDL) on PCSK9-dependent LDL receptor regulation. *J Biol Chem* **282**, 20502-20512 (2007).
26. Ferro, C.J. *et al.* Lipid management in patients with chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol* **14**, 727-749 (2018).
27. Paththinige, C.S. *et al.* Spectrum of low-density lipoprotein receptor (LDLR) mutations in a cohort of Sri Lankan patients with familial hypercholesterolemia - a preliminary report. *Lipids Health Dis* **17**, 100 (2018).
28. Hobbs, H.H., Leitersdorf, E., Goldstein, J.L., Brown, M.S. & Russell, D.W. Multiple crm- mutations in familial hypercholesterolemia. Evidence for 13 alleles, including four deletions. *J Clin Invest* **81**, 909-917 (1988).
29. Lehrman, M.A. *et al.* Mutation in LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains. *Science* **227**, 140-146 (1985).

30. Davis, C.G. *et al.* Deletion of clustered O-linked carbohydrates does not impair function of low density lipoprotein receptor in transfected fibroblasts. *J Biol Chem* **261**, 2828-2838 (1986).
31. Hobbs, H.H., Brown, M.S. & Goldstein, J.L. Molecular genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat* **1**, 445-466 (1992).
32. Vega, G.L. & Grundy, S.M. In vivo evidence for reduced binding of low density lipoproteins to receptors as a cause of primary moderate hypercholesterolemia. *J Clin Invest* **78**, 1410-1414 (1986).
33. Innerarity, T.L. *et al.* Familial defective apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 6919-6923 (1987).
34. Abifadel, M. *et al.* Mutations and polymorphisms in the proprotein convertase subtilisin kexin 9 (PCSK9) gene in cholesterol metabolism and disease. *Hum Mutat* **30**, 520-529 (2009).
35. Abifadel, M. *et al.* Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* **34**, 154-156 (2003).
36. Kim, Y.R. & Han, K.H. Familial hypercholesterolemia and the atherosclerotic disease. *Korean Circ J* **43**, 363-367 (2013).
37. Lloyd-Jones, D. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* **119**, 480-486 (2009).
38. Navab, M. *et al.* The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**, 831-842 (1996).
39. Jessup, W., Kritharides, L. & Stocker, R. Lipid oxidation in atherogenesis: an overview. *Biochem Soc Trans* **32**, 134-138 (2004).
40. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* **344**, 1383-1389 (1994).
41. Shepherd, J. *et al.* Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. 1995. *Atheroscler Suppl* **5**, 91-97 (2004).
42. Ramsey, S.A., Gold, E.S. & Aderem, A. A systems biology approach to understanding atherosclerosis. *EMBO Mol Med* **2**, 79-89 (2010).
43. Chiu, J.J. & Chien, S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. *Physiol Rev* **91**, 327-387 (2011).
44. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-126 (1999).
45. Williams, K.J. & Tabas, I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **15**, 551-561 (1995).

46. Napoli, C. *et al.* Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* **100**, 2680-2690 (1997).
47. Yoshida, H. & Kisugi, R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta* **411**, 1875-1882 (2010).
48. Henriksen, T., Mahoney, E.M. & Steinberg, D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6499-6503 (1981).
49. Heinecke, J.W., Rosen, H. & Chait, A. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J Clin Invest* **74**, 1890-1894 (1984).
50. Morel, D.W., DiCorleto, P.E. & Chisolm, G.M. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* **4**, 357-364 (1984).
51. Parthasarathy, S., Printz, D.J., Boyd, D., Joy, L. & Steinberg, D. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* **6**, 505-510 (1986).
52. Hiramatsu, K., Rosen, H., Heinecke, J.W., Wolfbauer, G. & Chait, A. Superoxide initiates oxidation of low density lipoprotein by human monocytes. *Arteriosclerosis* **7**, 55-60 (1987).
53. Tangirala, R.K., Mol, M.J. & Steinberg, D. Macrophage oxidative modification of low density lipoprotein occurs independently of its binding to the low density lipoprotein receptor. *J Lipid Res* **37**, 835-843 (1996).
54. Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* **272**, 20963-20966 (1997).
55. Han, J., Hajjar, D.P., Febbraio, M. & Nicholson, A.C. Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem* **272**, 21654-21659 (1997).
56. Mehta, J.L., Chen, J., Hermonat, P.L., Romeo, F. & Novelli, G. Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1): a critical player in the development of atherosclerosis and related disorders. *Cardiovasc Res* **69**, 36-45 (2006).
57. Li, D. & Mehta, J.L. Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 1116-1122 (2000).

58. Kodama, T., Reddy, P., Kishimoto, C. & Krieger, M. Purification and characterization of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9238-9242 (1988).
59. Ramprasad, M.P. *et al.* The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9580-9584 (1995).
60. Kunjathoor, V.V. *et al.* 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 (2002).
61. Swei, A., Lacy, F., DeLano, F.A. & Schmid-Schonbein, G.W. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension* **30**, 1628-1633 (1997).
62. Springer, T.A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* **57**, 827-872 (1995).
63. Galkina, E. & Ley, K. Vascular adhesion molecules in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2292-2301 (2007).
64. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-809 (1993).
65. Bombeli, T., Schwartz, B.R. & Harlan, J.M. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta3 integrin, and GPIIb/IIIa. *J Exp Med* **187**, 329-339 (1998).
66. Shah, P.K. Plaque disruption and coronary thrombosis: new insight into pathogenesis and prevention. *Clin Cardiol* **20**, II-38-44 (1997).
67. Davies, M.J. A macro and micro view of coronary vascular insult in ischemic heart disease. *Circulation* **82**, II38-46 (1990).
68. Moore, K.J. & Tabas, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* **145**, 341-355 (2011).
69. Miller, G.J. & Miller, N.E. Plasma-high-density-lipoprotein concentration and development of ischaemic heart-disease. *Lancet* **1**, 16-19 (1975).
70. Haghpassand, M., Bourassa, P.A., Francone, O.L. & Aiello, R.J. Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels. *J Clin Invest* **108**, 1315-1320 (2001).
71. Bortnick, A.E. *et al.* The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines. *J Biol Chem* **275**, 28634-28640 (2000).
72. Zhao, G.J., Yin, K., Fu, Y.C. & Tang, C.K. The interaction of ApoA-I and ABCA1 triggers signal transduction pathways to mediate efflux of cellular lipids. *Mol Med* **18**, 149-158 (2012).

73. Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F. & Tall, A.R. 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 (2004).
74. Kennedy, M.A. *et al.* ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab* **1**, 121-131 (2005).
75. Varban, M.L. *et al.* Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4619-4624 (1998).
76. Huang, L.H., Elvington, A. & Randolph, G.J. The role of the lymphatic system in cholesterol transport. *Front Pharmacol* **6**, 182 (2015).
77. Istvan, E.S. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J* **144**, S27-32 (2002).
78. Serban, M.C. *et al.* Statin Intolerance and Risk of Coronary Heart Events and All-Cause Mortality Following Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* **69**, 1386-1395 (2017).
79. Reiner, Z. & Tedeschi-Reiner, E. Prevalence and types of persistent dyslipidemia in patients treated with statins. *Croat Med J* **54**, 339-345 (2013).
80. Semenuk, G. & Beher, W.T. The plasma lecithin: cholesterol acyltransferase reaction in normal, hypophysectomized and thyroidectomized rats and in hamsters. *Life Sci* **8**, 183-188 (1969).
81. Investigators, A.-H. *et al.* Niacin in patients with low HDL cholesterol levels receiving intensive statin therapy. *N Engl J Med* **365**, 2255-2267 (2011).
82. Schwartz, G.G. *et al.* Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med* **367**, 2089-2099 (2012).
83. Barter, P.J. *et al.* Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med* **357**, 2109-2122 (2007).
84. Taylor, A.J., Sullenberger, L.E., Lee, H.J., Lee, J.K. & Grace, K.A. Arterial Biology for the Investigation of the Treatment Effects of Reducing Cholesterol (ARBITER) 2: a double-blind, placebo-controlled study of extended-release niacin on atherosclerosis progression in secondary prevention patients treated with statins. *Circulation* **110**, 3512-3517 (2004).
85. Crouse, J.R., 3rd New developments in the use of niacin for treatment of hyperlipidemia: new considerations in the use of an old drug. *Coron Artery Dis* **7**, 321-326 (1996).
86. Martel, C. *et al.* Lymphatic vasculature mediates macrophage reverse cholesterol transport in mice. *J Clin Invest* **123**, 1571-1579 (2013).
87. Roheim, P.S., Dory, L., Lefevre, M. & Sloop, C.H. Lipoproteins in interstitial fluid of dogs: implications for a role in reverse cholesterol transport. *Eur Heart J* **11 Suppl E**, 225-229 (1990).

88. Nanjee, M.N. *et al.* Composition and ultrastructure of size subclasses of normal human peripheral lymph lipoproteins: quantification of cholesterol uptake by HDL in tissue fluids. *J Lipid Res* **42**, 639-648 (2001).
89. Randolph, G.J. & Miller, N.E. Lymphatic transport of high-density lipoproteins and chylomicrons. *J Clin Invest* **124**, 929-935 (2014).
90. Brakenhielm, E. & Alitalo, K. Cardiac lymphatics in health and disease. *Nat Rev Cardiol* **16**, 56-68 (2019).
91. Leak, L.V. & Burke, J.F. Ultrastructural studies on the lymphatic anchoring filaments. *J Cell Biol* **36**, 129-149 (1968).
92. Swartz, M.A. & Skobe, M. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc Res Tech* **55**, 92-99 (2001).
93. Földi, M. & Strössenreuther, R.H.K. *Foundations of manual lymph drainage*, Edn. 3rd. (Elsevier Mosby, St. Louis, MO; 2005).
94. Wiig, H. & Swartz, M.A. Interstitial fluid and lymph formation and transport: physiological regulation and roles in inflammation and cancer. *Physiol Rev* **92**, 1005-1060 (2012).
95. Makinen, T. Lymphatic vessels at the base of the mouse brain provide direct drainage to the periphery. *Nature* **572**, 34-35 (2019).
96. Maby-El Hajjami, H. & Petrova, T.V. Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease. *Histochem Cell Biol* **130**, 1063-1078 (2008).
97. Havas, E. *et al.* Lymph flow dynamics in exercising human skeletal muscle as detected by scintigraphy. *J Physiol* **504 (Pt 1)**, 233-239 (1997).
98. Podgrabinska, S. *et al.* Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16069-16074 (2002).
99. Kaipainen, A. *et al.* Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3566-3570 (1995).
100. Ny, A. *et al.* Role of VEGF-D and VEGFR-3 in developmental lymphangiogenesis, a chemicogenetic study in *Xenopus* tadpoles. *Blood* **112**, 1740-1749 (2008).
101. Karkkainen, M.J. *et al.* A model for gene therapy of human hereditary lymphedema. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12677-12682 (2001).
102. Joukov, V. *et al.* A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J* **15**, 290-298 (1996).
103. Milasan, A., Smaani, A. & Martel, C. Early rescue of lymphatic function limits atherosclerosis progression in *Ldlr(-/-)* mice. *Atherosclerosis* **283**, 106-119 (2019).
104. Hong, Y.K. *et al.* *Prox1* is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate. *Dev Dyn* **225**, 351-357 (2002).

105. Harvey, N.L. *et al.* Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity. *Nat Genet* **37**, 1072-1081 (2005).
106. Makinen, T. *et al.* PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature. *Genes Dev* **19**, 397-410 (2005).
107. Lim, H.Y. *et al.* Hyaluronan Receptor LYVE-1-Expressing Macrophages Maintain Arterial Tone through Hyaluronan-Mediated Regulation of Smooth Muscle Cell Collagen. *Immunity* **49**, 326-341 e327 (2018).
108. Mouta Carreira, C. *et al.* LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res* **61**, 8079-8084 (2001).
109. Banerji, S. *et al.* LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* **144**, 789-801 (1999).
110. Wu, M. *et al.* Low molecular weight hyaluronan induces lymphangiogenesis through LYVE-1-mediated signaling pathways. *PLoS One* **9**, e92857 (2014).
111. Jang, J.Y. *et al.* Conditional ablation of LYVE-1+ cells unveils defensive roles of lymphatic vessels in intestine and lymph nodes. *Blood* **122**, 2151-2161 (2013).
112. Breiteneder-Geleff, S. *et al.* Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol* **154**, 385-394 (1999).
113. Fu, J. *et al.* Endothelial cell O-glycan deficiency causes blood/lymphatic misconnections and consequent fatty liver disease in mice. *J Clin Invest* **118**, 3725-3737 (2008).
114. Kato, Y. *et al.* Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci* **99**, 54-61 (2008).
115. Schacht, V. *et al.* T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J* **22**, 3546-3556 (2003).
116. Yang, J.F. *et al.* Understanding lymphangiogenesis in knockout models, the cornea, and ocular diseases for the development of therapeutic interventions. *Surv Ophthalmol* **61**, 272-296 (2016).
117. Sabine, A. *et al.* FOXC2 and fluid shear stress stabilize postnatal lymphatic vasculature. *J Clin Invest* **125**, 3861-3877 (2015).
118. Lim, H.Y. *et al.* Lymphatic vessels are essential for the removal of cholesterol from peripheral tissues by SR-BI-mediated transport of HDL. *Cell Metab* **17**, 671-684 (2013).
119. Vuorio, T. *et al.* Lymphatic vessel insufficiency in hypercholesterolemic mice alters lipoprotein levels and promotes atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**, 1162-1170 (2014).
120. Milasan, A., Dallaire, F., Mayer, G. & Martel, C. Effects of LDL Receptor Modulation on Lymphatic Function. *Sci Rep* **6**, 27862 (2016).

121. Adorni, M.P. *et al.* Inhibitory effect of PCSK9 on Abca1 protein expression and cholesterol efflux in macrophages. *Atherosclerosis* **256**, 1-6 (2017).
122. Forest, A. *et al.* Comprehensive and Reproducible Untargeted Lipidomic Workflow Using LC-QTOF Validated for Human Plasma Analysis. *J Proteome Res* **17**, 3657-3670 (2018).
123. Ruiz, M. *et al.* Lipidomics unveils lipid dyshomeostasis and low circulating plasmalogens as biomarkers in a monogenic mitochondrial disorder. *JCI Insight* **4** (2019).
124. Makinen, T. *et al.* Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J* **20**, 4762-4773 (2001).
125. Tang, Z.H. *et al.* New role of PCSK9 in atherosclerotic inflammation promotion involving the TLR4/NF-kappaB pathway. *Atherosclerosis* **262**, 113-122 (2017).
126. Chaitanya, G.V. *et al.* Differential cytokine responses in human and mouse lymphatic endothelial cells to cytokines in vitro. *Lymphat Res Biol* **8**, 155-164 (2010).
127. Maxwell, K.N. & Breslow, J.L. Adenoviral-mediated expression of Pcsk9 in mice results in a low-density lipoprotein receptor knockout phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7100-7105 (2004).
128. Esser, V. & Russell, D.W. Transport-deficient mutations in the low density lipoprotein receptor. Alterations in the cysteine-rich and cysteine-poor regions of the protein block intracellular transport. *J Biol Chem* **263**, 13276-13281 (1988).
129. Innerarity, T.L., Mahley, R.W., Weisgraber, K.H. & Bersot, T.P. Apoprotein (E--A-II) complex of human plasma lipoproteins. II. Receptor binding activity of a high density lipoprotein subfraction modulated by the apo(E--A-II) complex. *J Biol Chem* **253**, 6289-6295 (1978).
130. Innerarity, T.L. & Mahley, R.W. Enhanced binding by cultured human fibroblasts of apo-E-containing lipoproteins as compared with low density lipoproteins. *Biochemistry* **17**, 1440-1447 (1978).
131. Rinninger, F. *et al.* High density lipoprotein metabolism in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Lipid Res* **55**, 1914-1924 (2014).
132. Choi, S. *et al.* Decreased APOE-containing HDL subfractions and cholesterol efflux capacity of serum in mice lacking Pcsk9. *Lipids Health Dis* **12**, 112 (2013).
133. Milasan, A. *et al.* Apolipoprotein A-I Modulates Atherosclerosis Through Lymphatic Vessel-Dependent Mechanisms in Mice. *J Am Heart Assoc* **6** (2017).
134. Solari, E. *et al.* Acute Exposure of Collecting Lymphatic Vessels to Low-Density Lipoproteins Increases Both Contraction Frequency and Lymph Flow: An In Vivo Mechanical Insight. *Lymphat Res Biol* (2019).

135. Li, J., Liang, X., Wang, Y., Xu, Z. & Li, G. Investigation of highly expressed PCSK9 in atherosclerotic plaques and ox-LDL-induced endothelial cell apoptosis. *Mol Med Rep* **16**, 1817-1825 (2017).
136. Horton, J.D., Cohen, J.C. & Hobbs, H.H. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism. *Trends Biochem Sci* **32**, 71-77 (2007).
137. Huijgen, R. *et al.* Plasma levels of PCSK9 and phenotypic variability in familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* **53**, 979-983 (2012).
138. Zhang, Z. *et al.* Sex Differences Associated With Circulating PCSK9 in Patients Presenting With Acute Myocardial Infarction. *Sci Rep* **9**, 3113 (2019).
139. Makela, K.A. *et al.* Effect of Physical Activity on Plasma PCSK9 in Subjects With High Risk for Type 2 Diabetes. *Front Physiol* **10**, 456 (2019).
140. Bae, K.H. *et al.* Serum Levels of PCSK9 Are Associated with Coronary Angiographic Severity in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Diabetes Metab J* **42**, 207-214 (2018).
141. Lakoski, S.G., Lagace, T.A., Cohen, J.C., Horton, J.D. & Hobbs, H.H. Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 2537-2543 (2009).
142. Geng, X. *et al.* Multiple mouse models of primary lymphedema exhibit distinct defects in lymphovenous valve development. *Dev Biol* **409**, 218-233 (2016).
143. Ferri, N. *et al.* Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels. *Atherosclerosis* **220**, 381-386 (2012).
144. Ding, Z. *et al.* Hemodynamic shear stress via ROS modulates PCSK9 expression in human vascular endothelial and smooth muscle cells and along the mouse aorta. *Antioxid Redox Signal* **22**, 760-771 (2015).
145. Zhou, P. *et al.* Attenuation of TNF-alpha-Induced Inflammatory Injury in Endothelial Cells by Ginsenoside Rb1 via Inhibiting NF-kappaB, JNK and p38 Signaling Pathways. *Front Pharmacol* **8**, 464 (2017).
146. Yao, L.C., Baluk, P., Srinivasan, R.S., Oliver, G. & McDonald, D.M. Plasticity of button-like junctions in the endothelium of airway lymphatics in development and inflammation. *Am J Pathol* **180**, 2561-2575 (2012).
147. Hou, W.H. *et al.* CRSBP-1/LYVE-1 ligands disrupt lymphatic intercellular adhesion by inducing tyrosine phosphorylation and internalization of VE-cadherin. *J Cell Sci* **124**, 1231-1244 (2011).
148. Jackson, D.G. Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. *APMIS* **112**, 526-538 (2004).
149. Hess, P.R. *et al.* Platelets mediate lymphovenous hemostasis to maintain blood-lymphatic separation throughout life. *J Clin Invest* **124**, 273-284 (2014).

150. Herzog, B.H. *et al.* Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2. *Nature* **502**, 105-109 (2013).
151. Deng, Y., Zhang, X. & Simons, M. Molecular controls of lymphatic VEGFR3 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **35**, 421-429 (2015).
152. McManus, C.J., May, G.E., Spealman, P. & Shteyman, A. Ribosome profiling reveals post-transcriptional buffering of divergent gene expression in yeast. *Genome Res* **24**, 422-430 (2014).
153. Wethmar, K., Smink, J.J. & Leutz, A. Upstream open reading frames: molecular switches in (patho)physiology. *Bioessays* **32**, 885-893 (2010).
154. Barrett, L.W., Fletcher, S. & Wilton, S.D. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cell Mol Life Sci* **69**, 3613-3634 (2012).
155. Tang, Y.C. & Amon, A. Gene copy-number alterations: a cost-benefit analysis. *Cell* **152**, 394-405 (2013).
156. Liu, Y., Beyer, A. & Aebersold, R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* **165**, 535-550 (2016).
157. Pozarowski, P. & Darzynkiewicz, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol* **281**, 301-311 (2004).
158. Baxter, S.A. *et al.* Regulation of the lymphatic endothelial cell cycle by the PROX1 homeodomain protein. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 201-212 (2011).
159. van der Veen, J.N. *et al.* The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1859**, 1558-1572 (2017).
160. Li, Z. *et al.* The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis. *Cell Metab* **3**, 321-331 (2006).
161. Cui, Z. *et al.* A genetic defect in phosphatidylcholine biosynthesis triggers apoptosis in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **271**, 14668-14671 (1996).
162. Miao, J.Y., Kaji, K., Hayashi, H. & Araki, S. Suppression of apoptosis by inhibition of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in vascular endothelial cells. *Endothelium* **5**, 231-239 (1997).
163. Pullmannova, P. *et al.* Effects of sphingomyelin/ceramide ratio on the permeability and microstructure of model stratum corneum lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1838**, 2115-2126 (2014).
164. Reynolds, C.P., Maurer, B.J. & Kolesnick, R.N. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett* **206**, 169-180 (2004).
165. Alonso, A. & Goni, F.M. The Physical Properties of Ceramides in Membranes. *Annu Rev Biophys* **47**, 633-654 (2018).
166. Ando, J. *et al.* Sphingomyelin distribution in lipid rafts of artificial monolayer membranes visualized by Raman microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 4558-4563 (2015).

167. Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimaki, P. & Slotte, J.P. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* **41**, 66-97 (2002).
168. Sorrentino, V. *et al.* The LXR-IDOL axis defines a clathrin-, caveolae-, and dynamin-independent endocytic route for LDLR internalization and lysosomal degradation. *J Lipid Res* **54**, 2174-2184 (2013).
169. Fridriksson, E.K. *et al.* Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry. *Biochemistry* **38**, 8056-8063 (1999).
170. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572 (1997).
171. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 31-39 (2000).
172. Veiga, M.P., Arrondo, J.L., Goni, F.M. & Alonso, A. Ceramides in phospholipid membranes: effects on bilayer stability and transition to nonlamellar phases. *Biophys J* **76**, 342-350 (1999).
173. Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A. & Hannun, Y.A. Programmed cell death induced by ceramide. *Science* **259**, 1769-1771 (1993).
174. Hannun, Y.A. & Obeid, L.M. Ceramide: an intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci* **20**, 73-77 (1995).