

Université de Montréal

**L'adénylate cyclase de type 9 favorise le développement de
l'athérosclérose chez la souris**

par Vanessa Deschambault

Département des Sciences biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade
de Maîtrise en Science biomédicales
option Médecine expérimentale

Septembre 2017

© Deschambault Vanessa, 2017

Université de Montréal
Faculté des études Supérieures

Ce mémoire est intitulé:

**L'adénylate cyclase de type 9 favorise le développement de
l'athérosclérose chez la souris**

Présenté par :
Vanessa Deschambault

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Yayhe Merhi, président-rapporteur
Dr Jean-Claude Tardif, directeur de recherche
Dr Eric Rhéaume, codirecteur
Dr Marc Servant, membre du jury

Résumé

Une étude pharmacogénomique a récemment démontré que des variants pour le gène ADCY9 étaient déterminants de la réponse clinique d'un inhibiteur de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) chez des patients souffrant d'athérosclérose. Ces variants contrôlant la réponse au dalcetrapib ne démontraient aucune différence avec un traitement placebo, suggérant une interaction pharmacogénomique entre le gène ADCY9 et l'activité CETP. L'étude a révélé que le dalcetrapib était également associé avec des modifications de la masse corporelle. Nous avons alors recherché le rôle d'*Adcy9* dans le développement de l'athérosclérose et le métabolisme lipidique, en interaction avec la CETP, chez la souris. Les souris inactivées pour *Adcy9* présentaient une diminution de 65% des lésions athérosclérotiques en comparaison des WT. L'athéroprotection en réponse à l'inactivation d'*Adcy9* était associée à une protection de la fonction endothéliale et une réduction de l'accumulation de cellules spumeuses au sein de la plaque. Au cours de la diète athérogène, les souris inactivées pour *Adcy9* présentaient une augmentation de leur poids et du volume de tissu adipeux corporel. Ces résultats étaient également associés à une modification du système nerveux autonome et une augmentation de l'indice de consommation chez les animaux *Adcy9^{Gt/Gt}*. Lorsqu'étudiée chez des souris transgéniques pour CETP, l'inactivation d'*Adcy9* n'avait pas d'effet significatif sur le développement de l'athérosclérose. Nous avons ainsi conclu que le développement de l'athérosclérose et le contrôle du métabolisme lipidique étaient sous le contrôle de l'expression d'*Adcy9*, mais seulement en absence de la CETP. Ces résultats confirment l'interaction entre le gène ADCY9 et la CETP et l'importance de la relation entre activité CETP et la fonction d'ADCY9 dans le traitement contre l'athérosclérose.

Mots-clés : Athérosclérose, Adénylate cyclase, *Adcy9*, AC9, CETP, souris

Abstract

A pharmacogenomic study recently showed that polymorphisms in the ADCY9 gene determine the clinical response to the cholesterol ester transfer protein (CETP) inhibitor dalcetrapib in patients suffering from atherosclerosis. These variants controlling dalcetrapib response had no effect in patients treated on placebo, suggesting interaction between ADCY9 and CETP activity. The study revealed that dalcetrapib was associated with change in body weight. We then investigated the role of *Adcy9* in atherosclerosis development and in lipid metabolism in interaction with CETP. Mice inactivated for *Adcy9* showed a 65% reduction in the development of atherosclerosis lesions compared to WT. Atheroprotection in *Adcy9*-inactivated mice was associated with a protection of endothelial function and a reduced accumulation of foam cells in the atherosclerotic lesion of the vascular wall. Metabolic study during atherosclerosis demonstrated that *Adcy9* controls body weight and fat metabolism. These results were associated with an increase in feed efficiency when *Adcy9* was inactivated and a modulation of the SNA activity. In transgenic mice expressing CETP, the atheroprotection resulting from *Adcy9* inactivation was lost. Atherosclerosis development and body weight variation were the same between mice groups. We concluded that *Adcy9* inactivation protects against atherosclerosis, but only in the absence of CETP activity. These results in mice support our pharmacogenomic discovery in patients and emphasize the interaction between of CETP activity and ADCY9 function in the treatment of patients suffering from atherosclerosis.

Keywords : Atherosclerosis, adenylyl cyclase, *Adcy9*, AC9, CETP, mice

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des sigles et des abréviations	x
Remerciements	xiv
Introduction	1
1. L'athérosclérose.....	1
1.1. <i>Contexte</i>	1
1.2. <i>Développement de l'athérosclérose</i>	2
1.2.1. Dysfonction endothéliale	2
1.2.2. Réponse inflammatoire	5
1.2.3. Recrutement des leucocytes	7
1.2.4. Maturation des monocytes	11
1.2.5. Formation de la plaque et rupture.....	14
1.2.6. Régression de l'athérosclérose	16
1.3. <i>Métabolisme du cholestérol</i>	17
1.3.1. Cholestérol	17
1.3.2. Lipoprotéines.....	17
1.3.2.1. Chylomicrons	18
1.3.2.2. VLDL	19
1.3.2.3. IDL.....	19
1.3.2.4. LDL.....	20
1.3.2.5. HDL	20
1.3.3. Transport inverse du cholestérol (TIC).....	21

1.3.3.1.	L'efflux de cholestérol.....	21
1.3.3.2.	Transfert du cholestérol par la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP).....	23
1.3.3.3.	Internalisation hépatique des HDL.....	24
1.3.4.	Le rôle protecteur des HDL dans l'athérosclérose.....	25
1.4.	<i>Modèles murins d'athérosclérose</i>	27
1.4.1.	Souris rLDL ^{-/-}	27
1.4.2.	Souris ApoE ^{-/-}	28
1.4.3.	Souris ApoE*3-Leiden (E3L).....	28
1.4.4.	Souris transgéniques pour la CETP humaine.....	29
1.4.4.1.	rLDL ^{-/-} /hCETP.....	30
1.4.4.2.	E3L.CETP.....	30
1.4.5.	Souris infectées par AAV8-PCSK9 ^{D377Y}	31
1.4.6.	Limites.....	32
2.	Adénylates cyclases.....	33
2.1.	<i>Classification des adénylates cyclases</i>	35
2.2.	<i>Signalisation des AC</i>	35
2.3.	<i>Adénylate cyclase de type 9 (AC9)</i>	36
2.3.1.	Signalisation.....	36
2.3.2.	Rôle physiologique.....	37
3.	Études cliniques.....	39
3.1.	<i>Dal-OUTCOMES</i>	39
3.2.	<i>L'étude d'association pangénomique (GWAS)</i>	39
	Objectifs du mémoire	41
	Contribution de l'étudiant	42
	Discussion	83
	Conclusion	97
	Perspectives	98

Bibliographie.....	100
ANNEXE 1.....	115

Liste des tableaux

Tableau 1: Lipoprotéines plasmatiques. Adapté de [24, 84].....	21
--	----

Liste des figures

Figure 1. Histologie de l'aorte. Adapté de [22].	5
Figure 2. Composition des lipoprotéines. Adapté de [22]	18
Figure 3. Transport inverse du cholestérol. Adapté de [100].	25
Figure 4. Résumé des effets d'Adyc9 sur le développement de l'athérosclérose.	115

Liste des sigles et des abréviations

(ET)-1 : Endothéline-1
AAV : Adeno-associated virus
ABCA1: ATP-binding cassette transporter A1
ABCG1: ATP-binding cassette transporter G1
AC : Adénylates cyclases
ACh : Acétylcholine
ADMA : Asymmetric dimethylarginine
ADNc : ADN (Acide désoxyribonucléique) complémentaire
AKAP : Protéine d'ancrage des PKA
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ApoA-I: Apolipoprotéine de type A-I
ApoA-II: Apolipoprotéine de type A-II
ApoA-IV: Apolipoprotéine de type A-IV
ApoA-V: Apolipoprotéine de type A-V
ApoB-48 : Apolipoprotéine de type B-48
ApoB-100 : Apolipoprotéine de type B-100
ApoC-I : Apolipoprotéine de type C-I
ApoC-II : Apolipoprotéine de type C-II
ApoC-III : Apolipoprotéine de type C-III
ApoE : Apolipoprotéine de type E
ApoE^{-/-} : Souris inactivées pour ApoE
ARNm : Acide ribonucléique (ARN) messenger
AVC : Accident vasculaire cérébrale
BH₄ : Tétrahydrobioptérine
Ca²⁺ : Calcium
CaM : Calmoduline
CE : Cellules endothéliales
CETP : Protéine de transfert des esters de cholestérol
CMC: Cellule de la matrice cellulaire

CML : Cellule musculaire lisse
COX : Cyclooxygénase
CRP : Protéine C-réactive
D_{2L} : récepteurs de la dopamine
DOS : Dérivés réactifs de l'oxygène
E3L : Souris ApoE*3-Leiden
EDHF : Facteurs d'hyperpolarisation dérivés de l'endothélium
eNOS : NO synthase endothéliale
EPAC : Exchange protein directly activated by cAMP
FD: Dysbétalipoprotéïnémie
GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GMPc: Guanosine monophosphate cyclique
GPCR : Récepteurs couplés aux protéines G
G α_i : GPCR inhibitrice
G α_s : GPCR stimulatrice
HC : High cholesterol
hCETP : CETP humaine
HDL : Lipoprotéines de haute densité
HDL-C : Cholestérol associé aux HDL
HRV: Variabilité du rythme cardiaque
Hsp20 : Heat-shock protein 20
ICAM-1 : Molécule d'adhésion intercellulaire de type 1
IDL: Lipoprotéines de densité intermédiaire
IgM : Immunoglobuline de type M
I K_s : Canaux ionique potassium
IL-1 : Interleukine-1
IL-10 : Interleukine-10
IL-13 : Interleukine-13
IL-17 : Interleukine-17
IL-18 : Interleukine-18

IL-1b : Interleukine-1 de type b
IL-2 : Interleukine-2
IL-21 : Interleukine-21
IL-22 : Interleukine-22
IL-3 : Interleukine-3
IL-33 : Interleukine-33
IL-4 : Interleukine-4
IL-5 : Interleukine-5
IL-6 : Interleukine-6
INF- γ : Interféron gamma
IRM: Résonance magnétique
LCAT: Lecithin:cholesterol acyltransferase
LDL : Lipoprotéines de faible densité
LH: Lipase hépatique
LPL: Lipase des lipoprotéines
LPS : Lipopolysaccharide
LRP1 : Low density lipoprotein receptor-related protein 1
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1
M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor
MMP : Métalloprotéinases matricielles
NETs : Neutrophil extracellular traps
NFR : Natural flanking regions
NO : Oxyde nitrique
oxLDL: LDL oxydés
PCSK9 : Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9
PGI₂ : Prostacycline
PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase
PKG : Protéine kinase de type G
PKC : Protéine kinase C
PLC : Phospholypase C

rLDL : Récepteur LDL
shRNA : short hairpin RNA
SNA : Système nerveux autonome
SNC : Système nerveux central
SR-BI : Récepteurs hépatiques éboueurs BI
TFG- β : Transforming growth factor beta
TG : Triglycérides
Th1 : Cellule T auxiliaire de type 1
Th17 : Cellule T auxiliaire de type 17
Th2 : Cellule T auxiliaire de type 2
TIC : Transport inverse du cholestérol
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha
TXA₂ : Thromboxane A₂
VCAM-1 : Molécules d'adhésion vasculaire de type 1
VLDL: Lipoprotéines de très faible densité
 β 2AR : Récepteurs β -adrénergique 2

*À Sébastien,
Comme dans tous nos projets de vie,
Celui-ci a également été réalisé ensemble.*

Remerciements

En premier, il me faut remercier mon superviseur, le Dr Yohann Rautureau, qui m'a épaulée depuis mes premiers pas dans ce projet, jusqu'au point final apposé à ce travail. Merci pour les conseils, pour ces longues heures passées à réviser mes présentations, pour m'avoir poussée à me dépasser et, surtout, pour les encouragements et la confiance quant à la réalisation de ce projet. Merci, vraiment. Un grand merci également à mon codirecteur de recherche, le Dr Éric Rhéaume, pour sa confiance et ses précieux conseils, sa passion, toujours. Merci de m'avoir transmis, à moi comme à tant d'autres j'en suis sûre, cette insatiable soif de connaissance, cette soif de vouloir *comprendre*. À mon directeur de recherche, le Dr Jean-Claude Tardif, merci pour son soutien et son aide à la réalisation de ce projet. Son expérience en recherche a été précieuse.

Aux membres du laboratoire, ce mémoire est également un peu le vôtre. Merci pour votre dévouement, votre passion. À Marie-Ève, sans qui le projet aurait été un vertigineux tourbillon de chaos avec toutes ces souris! Merci pour les longues heures à l'animalerie, merci pour ton aide si précieuse. Merci à Mélanie, Téo, Geneviève, votre expertise m'a été inestimable. À Matt et Julien : ces (presque) trois années n'auraient pas été aussi fabuleuses sans votre présence au labo. À Magdalena, qui s'est intégrée si facilement dans notre petit trio, *thank you for all our laugh and your contagious happiness*. Et à tous les autres, qui ont touché de près ou de loin à ce projet, merci pour votre implication.

À ma tante Manon et à ma chère grand-mère, merci d'avoir été là, d'aussi loin que je puisse m'en souvenir. Merci d'avoir cru en moi, merci d'être si fières de moi. À ma cousine Cyntia, qui a partagé une semblable traversée du désert, tes encouragements m'auront été précieux. À ma famille et à ma belle-famille, pour vos encouragements et votre présence depuis le début, merci, merci, merci. À Audrey, qui y a cru plus que moi à certains moments, pour son inestimable présence, toujours. Merci pour toutes ces années et pour tous ces moments partagés.

Finalement, mais surtout, surtout, à mon amoureux, Sébastien. Merci d'avoir été là, de jour comme de nuit, depuis toutes ces années. Merci pour les fous rires, merci de m'aimer toujours plus. Merci d'être si fier de moi, d'avoir cru en moi, même dans mes instants de doute, dans mes découragements. Merci de me rendre si heureuse.

Introduction

1. L'athérosclérose

1.1. Contexte

L'athérosclérose est la première cause de décès dans les pays industrialisés, par son rôle dans le développement de la maladie coronarienne [1]. On estime, aux États-Unis seulement, que 16 millions d'individus sont atteints de maladies cardiovasculaires associées à l'athérosclérose [2]. L'athérosclérose se caractérise par l'accumulation de plaques, de lésions athérosclérotiques, dans les principales artères du corps, telles que l'aorte, les artères coronaires, rénales ou encore cérébrales, mais peut également se retrouver dans l'ensemble de l'organisme [1, 3].

La formation de ces plaques a pour résultat le rétrécissement des vaisseaux responsables d'acheminer le sang, réduisant ainsi le flux sanguin aux organes. Ce rétrécissement entraîne à sa suite de lourdes conséquences telles que les accidents vasculaires cérébraux (AVC), la thrombose et la rupture vasculaire, les anévrismes ou même la mort [1, 3, 4].

L'athérosclérose se développe de façon progressive. L'origine et la régulation de son développement demeurent encore non résolues. Cependant, les facteurs de risques associés sont, quant à eux, bien connus et se réfèrent bien souvent à l'indice de Framingham, un algorithme permettant d'estimer le risque cardiovasculaire d'un individu, projeté sur les 10 prochaines années [1]. Cet indice comprend des facteurs invariables, soit l'âge, le sexe, l'ethnie, la génétique, mais également des facteurs associés au mode de vie, donc modifiables, comme le tabagisme, la sédentarité, l'obésité, l'hypercholestérolémie, l'hypertension et le diabète [1]. L'athérosclérose est considérée comme un symptôme systémique multifactoriel [1].

1.2. Développement de l'athérosclérose

1.2.1. Dysfonction endothéliale

L'artère est composée de trois tuniques: l'adventice, la média et l'intima (Figure 1). L'adventice est formée principalement de fibres de collagène et contient les terminaisons nerveuses [5]. On y retrouve également les canaux lymphatiques [6, 7] ainsi que des fibroblastes et des cellules de l'immunité [8]. Dans l'adventice, l'on retrouve également le vasa vasorum, un réseau de vaisseaux sanguins chargés de l'apport sanguin à la paroi des gros plus vaisseaux, tel que l'aorte [9, 10]. Elle est délimitée par une membrane élastique externe, marquant le début de la média [5, 8]. Cette dernière est d'une part composée d'une ou de plusieurs membranes élastiques internes et de l'autre d'une couche de cellules musculaires lisses vasculaires [11]. Enfin, c'est dans l'intima que l'on retrouve l'endothélium vasculaire, soit la première couche cellulaire dans la lumière du vaisseau (Figure 1) [11].

L'endothélium vasculaire est un organe paracrine, endocrine et autocrine qui possède des fonctions régulatrices de la circulation [12, 13]. Une des fonctions de l'endothélium est de s'opposer à la thrombose et à la prolifération des cellules musculaires lisses [12]. De plus, l'endothélium régule le flux sanguin en réponse au cisaillement de ce dernier [14]. Il est également responsable de la régulation et du maintien du tonus vasculaire, soit de la vasodilatation et de la vasoconstriction, des mécanismes permettant la régulation de la pression artérielle et qui sont hautement dépendants de la libération de médiateurs biochimiques [12, 15].

La production et la libération d'oxyde nitrique (NO) sont dépendantes de l'activation de voies cellulaires associées au calcium [16]. Certains médiateurs activent l'ouverture des canaux calciques, afin de permettre une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire et également de sorte à relâcher le calcium présent dans le réticulum sarcoplasmique servant de réservoir [16]. Les ions calcium ainsi relâchés peuvent alors activer la voie de la calmoduline (CaM) et permettre l'activation de la NO synthase endothéliale (eNOS), l'enzyme responsable de la production du NO [16]. Cette dernière est alors responsable du maintien d'un équilibre quant à la libération de facteurs biochimiques de vasoconstriction, tels que l'endotheline-1

((ET)-1), le thromboxane A₂ (TXA₂) et l'angiotensine II [12]. Le NO inhibe la libération de ces agents vasoconstricteurs [16].

Le NO produit par les cellules agit à titre de second messenger à l'intérieur de celles-ci [17]. Par sa diffusion, une vasodilatation vasculaire est rendue possible. Plus spécifiquement, le NO produit au niveau des cellules endothéliales est diffusé dans les cellules des muscles lisses [17]. Le NO se lie alors à une guanylate cyclase, entraînant un changement de conformation, permettant l'activation d'un domaine catalytique sur cette dernière. Cette activation entraîne une augmentation des niveaux de GMP cyclique (GMPc) [17]. Conséquemment, les GMPc phosphorylent successivement les PKG, qui sont des protéines kinases de type G dépendantes des GMPc [17, 18]. La cascade signalétique aboutit à la phosphorylation des filaments de myosines, entraînant une relaxation musculaire, une vasodilatation [17].

L'activité de la eNOS est également influencée par la voie signalétique (phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT [19]. Cette voie signalétique est impliquée dans de nombreuses branches de l'activité signalétique, tant au niveau de la réplication cellulaire, de la différenciation, de même que la croissance cellulaire [20]. L'activation de la voie PI3K/AKT permet le déclenchement d'une cascade signalétique [19]. L'activation de PI3K, notamment par des facteurs de croissance ou encore des hormones [21], permet de phosphoryler les AKT, qui sont également connues sous le nom de protéine kinase B (PKB) [22]. Les AKT sont des sérine-thréonine kinase [22]. Les AKT activés phosphorylent alors à leur tour une sérine (Ser1177) de la NO synthase, permettant son activation, et donc l'augmentation de la synthèse de NO [20].

L'angiotensine II est de nature oxydante et possède une action stimulatrice sur la production de (ET)-1 [23]. L'endotheline-1 est un peptide associé à la promotion de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, celles-ci jouant un rôle prépondérant dans la formation de plaques athérosclérotiques et donc dans le développement de l'athérosclérose [23]. La présence de NO est nécessaire à la préservation du bon fonctionnement de la régulation des fonctions endothéliales. Le NO a une action antioxydante et est également capable d'inhiber la prolifération et la migration des cellules musculaires

lisses, l'agrégation plaquettaire par l'intermédiaire de la prostacycline, une prostaglandine, de même que l'inflammation [23].

Ainsi, le développement de l'athérosclérose s'initie par la dysfonction progressive de l'endothélium vasculaire. Cette dysfonction résulte de l'action de plusieurs mécanismes, mais plus particulièrement d'une augmentation du stress oxydatif et de la diminution de la synthèse du NO [13, 24]. En présence d'une inflammation consécutive de l'un ou de plusieurs des facteurs de risques mentionnés précédemment, des dérivés réactifs de l'oxygène (DOS) se forment, réagissant à la présence de NO. Cette réaction entraîne la dysfonction de la eNOS, la protéine responsable de la production du NO, de même qu'une diminution d'activité de celle-ci, affectant de façon directe la biodisponibilité de l'oxyde nitrique [15, 25].

Le NO, est synthétisé à partir l'acide aminé L-arginine, un substrat nécessaire à l'activité de la eNOS. Cette dernière catalyse une réaction biochimique, oxydant la L-arginine en L-citrulline et produisant de l'oxyde nitrique dans le processus [24]. Cette réaction catalytique est rendue possible par le couplage de la eNOS à un cofacteur essentiel, la tetrahydrobiopterin (BH₄). En absence de BH₄, les électrons nécessaires à l'oxydation de la L-arginine sont transportés vers des molécules d'oxygène, générant des DOS [15]. Ces réactifs d'oxygène vont à leur tour réagir avec le NO, produisant du peroxy-nitrite, un ion hautement oxydatif. L'action combinée des DOS et du peroxy-nitrite entraîne en cascade la dégradation du BH₄, provoquant davantage de découplage de eNOS puis, une diminution de la synthèse de NO par une augmentation de production de molécules oxydatives, qui entraînent à leur tour une augmentation du stress oxydatif [15]. Au cours du développement de l'athérosclérose, une diminution des niveaux de BH₄ était notable, [15]. En plus de l'effet sur le BH₄, d'autres mécanismes biochimiques sont également responsables de l'inactivation du NO, notamment une diminution dans la disponibilité du substrat L-arginine [16]. Cette diminution peut résulter d'une déficience du transporteur cellulaire ou encore d'une dégradation trop rapide de l'acide aminé [16]. Une augmentation des concentrations endogènes d'inhibiteurs, comme l'ADMA (pour *asymmetric dimethylarginine*) qui est un sous-produit de la méthylation des protéines dans le cytoplasme des cellules, peuvent également entraîner l'inactivation du NO [26]. Enfin, une diminution de l'expression de la protéine eNOS [27], sa dimérisation [27, 28] ou encore

une diminution de son activité [27, 29] sont également liées à l'inactivation de la NO. La biochimie d'eNOS est ainsi un élément central dans la dysfonction endothéliale progressive qui est associée au développement de l'athérosclérose [15].

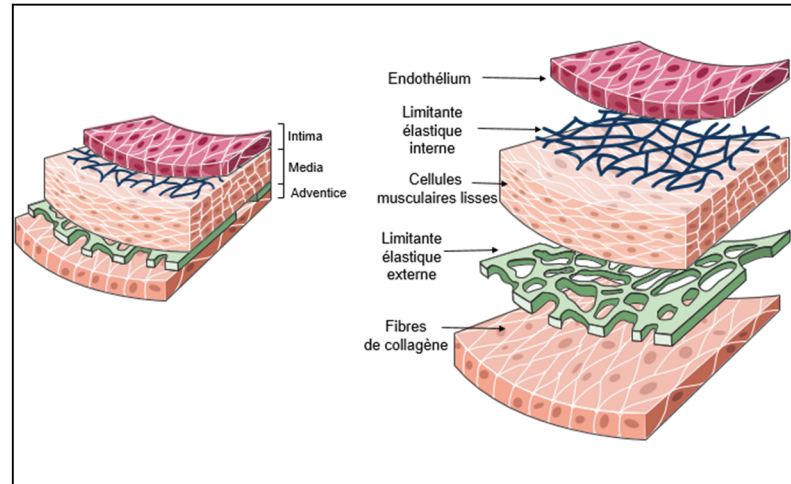


Figure 1. Histologie de l'aorte. Adapté de [30].

1.2.2. Réponse inflammatoire

Des facteurs environnementaux ou génétiques peuvent provoquer une hypercholestérolémie qui sera responsable d'une dysfonction endothéliale [31]. Avec la progression de la dysfonction endothéliale apparaît l'infiltration de petites particules lipoprotéiques de faible densité (LDL pour *Low density lipoproteins*), qui vont s'accumuler dans la média [32]. Cette accumulation est l'élément déclencheur à la réponse inflammatoire de la paroi artérielle [4]. Les LDL présents dans l'intima vont subir des modifications oxydatives et enzymatiques, les transformant en LDL oxydés (oxLDL) [32]. La présence de ces oxLDL dans l'intima entraîne l'activation de l'endothélium et la sécrétion de cytokines et de chimiokines telles que l'interleukine-1 (IL-1) et MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*). Ces molécules entraînant à leur tour le recrutement leucocytaire [32, 33]. Avec l'activation de l'endothélium s'ensuit également une augmentation d'expression et d'activation des différentes molécules d'adhésion pour le recrutement des monocytes, présentes à la surface des cellules endothéliales (CE) [32].

De nombreuses molécules d'adhésion ont été répertoriées et associées à l'athérosclérose, de même qu'à nombre de maladies inflammatoires. Dans la phase encore précoce de l'athérosclérose, les premières molécules à être dénombrées sont les molécules d'adhésion vasculaire de type 1 (VCAM-1), également connues sous l'appellation de CD106 [32]. Celles-ci font partie d'une première grande catégorie de molécules d'adhésion, qui se retrouvent dans la superfamille des immunoglobulines [32]. Les VCAM-1 se retrouvent principalement sur les cellules endothéliales [32], mais également à la surface de quelques sous-populations de leucocytes tels que les monocytes et les lymphocytes de type T [32]. ICAM-1 est une molécule d'adhésion intercellulaire de type 1 également répertoriée. Tout comme VCAM-1, les ICAM-1 sont des immunoglobulines, mais possèdent une répartition plus large dans les cellules circulantes, bien qu'on les retrouve à un plus faible niveau d'expression sur les CEs [32]. Elles peuvent également se coupler à un plus grand nombre de types de leucocytes [32].

Enfin, il existe également une autre famille de molécules d'adhésion connue pour être associée au développement de l'athérosclérose et au recrutement leucocytaire [32]. Ces molécules sont regroupées sous l'appellation de sélectines. La E-sélectine est exprimée à la surface des CEs et est responsables du recrutement des granulocytes, des leucocytes possédant des granules à l'intérieur de leur cytoplasme et qui sont caractérisés par un noyau dit polynucléaire, tels que les neutrophiles [34, 35]. Les E-sélectines ne sont cependant pas associées avec le développement précoce de l'athérosclérose, mais plutôt avec le début de la formation de la lésion athérosclérotique, qui se produit à un stade plus avancé du développement [32]. Les P-sélectines, quant à elles, seraient associées au contraire avec le développement précoce de l'athérosclérose, dû à leur expression sur les CEs, en plus de se retrouver sur les plaquettes [32, 36]. Enfin, cette famille de glycoprotéines comprend également les L-sélectines, ces dernières se trouvant à la surface des leucocytes [36]. Les L-sélectines auraient un rôle prépondérant dans le recrutement leucocytaire au cours d'une réponse inflammatoire. Cependant, une récente étude a démontré qu'elles auraient plutôt un rôle protecteur dans le développement précoce de l'athérosclérose. En effet, contrairement aux E-sélectines et aux P-sélectines, dont l'inactivation avait un effet anti-athérosclérotique,

l'inactivation des L-sélectine dans un modèle murin a permis d'observer une augmentation du développement des lésions athérosclérotiques [36, 37]. Elles auraient donc des propriétés anti-athérogènes.

Les sélectines pro-athérosclérotiques (E-sélectine et P-sélectine) ont davantage d'influence sur le mouvement saltatoire des leucocytes et le roulement sur l'endothélium [32], et ce, aux différents stades de développement de l'athérosclérose. Les VCAM-1 et les ICAM-1 sont plutôt responsables, de leur côté, de la liaison des leucocytes aux CEs au cours du mouvement saltatoire, de même qu'à leur immobilisation afin de permettre la diapédèse, un mécanisme de migration cellulaire nécessaire à l'infiltration des leucocytes, en réponse à l'inflammation [32]. Ce mécanisme sera abordé dans une section ultérieure.

1.2.3. Recrutement des leucocytes

Le recrutement leucocytaire et donc l'infiltration de ces cellules dans la paroi vasculaire de l'aorte est rendu possible, comme mentionné précédemment, par la diapédèse. En réponse à l'activation de l'endothélium au cours de la réponse inflammatoire, les leucocytes circulants vont se lier aux molécules VCAM-1, ICAM-1 et les sélectines, entraînant leur capture, à l'endothélium activé, leur roulement sur celui-ci et leur adhésion. Cette adhésion fait par la suite place à une insertion dans le lumen de la paroi vasculaire, pour finalement y migrer entièrement [38-40]. L'infiltration leucocytaire est initiée par le recrutement et l'infiltration des monocytes circulants, qui sont les premiers à répondre à la sécrétion de MCP-1 par les CEs et qui constituent la majorité des leucocytes contribuant au développement et à la progression de la plaque [32, 38]. Leur recrutement est dû en grande majorité à l'expression de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ exprimée à leur surface et spécifique de VCAM-1 [41].

Les neutrophiles jouent également un rôle dans le développement des lésions athérosclérotiques, et ce, à plusieurs stades. Au stade initial du développement de l'athérosclérose, les neutrophiles s'infiltrent dans l'intima suite à la sécrétion d'un stimulus par les cellules musculaires lisses, l'interleukine de type 8 (IL-8) [42]. De plus, la présence de

protéases spécifiques aux neutrophiles, tels que la cathepsin G ou encore l'élastase, contribuerait à une augmentation du recrutement et de l'adhésion des neutrophiles aux CEs, pour stimuler leur infiltration [42]. Ces granulocytes sont caractérisés par leur réaction immunitaire rapide, en réponse à la présence d'un agent pathogène. Ils phagocytent ces derniers et ont également la capacité de relâcher des molécules cytotoxiques [42]. Les neutrophiles possèdent également une capacité de communication intercellulaire avec d'autres types de leucocytes. Enfin, plus récemment, il a été découvert que les neutrophiles étaient capables de NETose, un mécanisme de mort cellulaire bien distinct de l'apoptose, par exemple. Cette NETose est rendue possible par le relâchement de NETs (*neutrophil extracellular traps*) lors de la dégradation de leur membrane cellulaire [42]. Ces NETs sont alors capables d'attraper les pathogènes présents dans un réseau de chromatine et d'entraîner la mort de ces derniers par le relâchement de protéases et d'agents antimicrobiens. Or, au cours du développement de l'athérosclérose, et donc en présence d'une inflammation chronique, on assiste à une dysfonction de la régulation de ces mécanismes normalement spécifiques aux agents pathogènes [42]. Cette dysfonction entraîne ainsi le relâchement de ces agents cytotoxiques, de même que des ROS contribuant à l'aggravation du stress oxydatif, conduisant la dégradation et la détérioration graduelle de la paroi vasculaire, notamment par les protéases de NETs, et contribuant ainsi au développement des lésions athérosclérotiques [42, 43].

En parallèle avec la migration des monocytes, les lymphocytes de type T sont parmi les premières cellules de l'immunité à être également recrutées dans l'intima de la paroi vasculaire. Les lymphocytes T dit auxiliaires sont l'une des sous-populations retrouvées majoritairement dans la plaque athérosclérotique, mais plus particulièrement encore les T auxiliaires CD4⁺ [44]. Ces derniers se différencieront en T auxiliaire de type 1 ou 2 (Th1 ou Th2) [44]. Des lymphocytes T auxiliaires porteurs de la protéine CD8 (T auxiliaire CD8⁺) sont également présents dans les lésions athérosclérotiques chez l'homme, et en moins grande abondance chez la souris [44]. L'implication des Th1 dans le développement de l'athérosclérose est bien connue, tout d'abord par sa capacité à produire de l'interféron- γ (IFN- γ), une cytokine induisant l'activation des monocytes [45]. De plus, les Th1 produisent

également différents types d'interleukine (IL-2, IL-18) dont les propriétés pro-athérogéniques ont été démontrées [44].

Tout comme les Th1, les Th2 ils sécrètent également nombre d'interleukines (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 et IL-33) et possèdent la capacité d'activer les lymphocytes de type B afin de produire des anticorps [44]. Le rôle dans l'athérosclérose de ces cytokines reste à élucider. L'étude d'IL-4 est un bon exemple. Il a été démontré dans un modèle murin athérosclérotique qu'une déficience en IL-4 n'entraînait aucun effet quant au développement des lésions [46], alors qu'une seconde étude aurait plutôt démontré l'effet contraire, à savoir que l'absence de IL-4 entraînerait la diminution du développement des lésions [47]. Une seconde cytokine, IL-5 est induite par la sécrétion de l'IL-33. La présence d'IL-5 permet l'activation de la production d'immunoglobulines de type M (IgM), notamment des IgM spécifiques contre les oxLDL. L'absence de ces IgM dans un modèle murin a démontré une accélération du développement de l'athérosclérose [48]. Leur rôle athéroprotecteur est bien établi chez la souris [44]. Par contre, la présence de haut niveau d'IL-5 plasmatiques a également été démontrée pour augmenter les risques de récurrence d'évènements cardiovasculaires, notamment par leur association avec des individus souffrant précédemment d'une pathologie cardiaque. L'effet de Th2 dans le développement des lésions athérosclérotiques reste à déterminer [44, 49].

Une autre classe de lymphocyte T auxiliaire a également été répertoriée au sein des lésions athérosclérotiques. Les lymphocytes Th17, contrairement aux Th1 et Th2, sont dérivés des lymphocytes T régulateurs et sont associés aux maladies auto-immunes inflammatoires, comme les rhumatismes ou encore la sclérose en plaque [44]. Leur rôle dans les maladies cardiovasculaires, et donc dans le développement de l'athérosclérose, fait l'objet de recherches intenses [44]. Les Th17 sécrètent également des interleukines (IL-17, IL-21, IL-22), de même que IFN- γ . Chez l'homme, Taleb et al. [50] ont démontré que l'expression d'IL-17 dans les lésions athérosclérotiques était associée à une diminution de l'infiltration de macrophage, de même qu'à une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) et de la chape fibreuse, diminuant ainsi l'instabilité de la plaque et donc les risques de rupture. Enfin,

la production d'IL-17 par les Th17 serait également associée à une diminution de l'expression des VCAM-1 et donc à une diminution du recrutement leucocytaire [50]. Ainsi, malgré leur rôle délétère dans un contexte de maladie auto-immune, ces résultats suggèreraient que les Th17 seraient athéroprotecteurs.

Enfin, les lymphocytes de type B sont également parmi les cellules immunitaires à avoir été dénombrées dans les plaques d'athérosclérose chez la souris. Plusieurs types ont été caractérisés. Parmi ceux-ci, ce sont les lymphocytes B1 et B2 que l'on retrouve davantage au cours du développement de l'athérosclérose, chacune avec leurs distinctions respectives [44]. Les lymphocytes de type B2 sont bien caractérisés et de nombreuses études ont depuis démontré leurs effets pro-athérogéniques [44]. En effet, en condition de déplétion de ces dernières, alors que les populations de B1 demeurent intactes, on constate une diminution du développement des lésions athérosclérotiques [51, 52]. Les lymphocytes de type B1, quant à eux, sont notamment associés à la production d'anticorps IgM. La reconnaissance des oxLDL par les IgM (IgM anti-oxLDL), par exemple, est un mécanisme athéroprotecteur [51]. Les anticorps IgM jouent également un rôle dans l'inhibition de la formation de cellules spumeuses, qui seront abordées dans une prochaine section, de même qu'en favorisant la l'efférocytose des débris cellulaires, diminuant la formation de nécrose [44, 53]. Le recrutement des lymphocytes B provient de leur extravasation depuis la circulation jusque dans l'intima, tout comme pour les lymphocytes T. De plus, les lymphocytes B se retrouvent également au sein de l'adventice de la paroi vasculaire [54]. Leur présence dans cette tunique n'est pas seulement due à l'inflammation artérielle, puisqu'elles ont été également dénombrées chez des animaux en contexte homéostatique [54]. Lors du développement de l'athérosclérose, leur nombre se multiplie à ce niveau et davantage à l'intérieur de structures lymphoïdes tertiaires qui se forment au niveau de l'adventice [54, 55]. À l'intérieur de ces structures, les lymphocytes B, de même que d'autres types leucocytaires, secrètent des cytokines qui ont la capacité de migrer par-delà la média jusque dans l'intima, contribuant au développement des plaques athérosclérotiques [54].

Ainsi, le recrutement leucocytaire est initié dès l'inflammation précoce. Au cours de cette inflammation, la sécrétion de cytokines va induire l'expression des molécules d'adhésions et des intégrines déterminantes à la migration des cellules immunitaires. Ces cellules sont alors recrutées à différents stades du développement de l'athérosclérose. Les monocytes sont les cellules cibles de ce recrutement, leur infiltration étant la résultante du développement des lésions athérosclérotiques. Les neutrophiles sont les premières cellules inflammatoires à être recrutées par la suite, suivies de près par les lymphocytes T auxiliaires (Th1 et Th2), de même que les lymphocytes T régulateurs (Th17) et les lymphocytes B. Le recrutement leucocytaire met ainsi en jeu de nombreux acteurs aux différents stades du développement de l'athérosclérose.

1.2.4. Maturation des monocytes

Différentes sous-populations de monocytes ont été répertoriées chez l'humain, toutes se caractérisant par leur expression du récepteur de lipopolysaccharide (LPS), qui est un co-récepteur de CD14, et du récepteur FcγIII (CD16) [56, 57]. Ces monocytes se sous-divisent en trois catégories distinctes : les monocytes CD14⁺⁺CD16⁻, les monocytes CD14⁺⁺CD16⁺ et les monocytes CD14⁺CD16⁺⁺ [56, 58]. Ces sous-populations de monocytes sont respectivement connues sous la forme classique, intermédiaire et non-classique [58]. Les monocytes classiques forment entre 80 à 90% de la population retrouvée chez l'humain [59, 60], les monocytes intermédiaires et non-classiques se subdivisant dans le dernier 10 à 20% [59, 60]. Chacun de ces sous-types des monocytes possède des propriétés fonctionnelles distinctes [61]. En situation d'inflammation, les monocytes classiques libèrent de grandes concentrations d'IL-6 [62], une cytokine reconnue pour être sécrétée aux sites d'inflammation dans l'organisme et pour jouer un rôle prépondérant dans la phase aiguë d'inflammation [63]. La sécrétion d'IL-6 permet notamment de réguler la migration des neutrophiles aux sites d'inflammation [62]. IL-6 permet également l'activation des EC et conséquemment une amplification du processus de recrutement et d'infiltration des cellules immunitaires, dans l'athérosclérose par exemple [62]. D'autres cytokines et chimiokines ont également été répertoriées, à de plus faibles concentrations [60, 61]. Les monocytes classiques présentent

une haute activité phagocytaire due notamment à l'expression génique de CD93, CD64, CD32, CD36 et CD14 [61]. Ils expriment également de gènes reliés à des protéines antimicrobiennes [61]. L'expression de ces différents gènes semble indiquer une implication cruciale dans les mécanismes de défense immunitaire contre des pathogènes [61]. Les monocytes non-classiques, quant à eux, sont associés davantage à une activité sentinelle dans l'organisme. Ce sous-type possède une capacité d'adhésion endothéliale, contrairement aux monocytes classiques [61]. En situation inflammatoire, ils sécrètent l'IL-1 β et du TNF- α (pour *tumor necrosis factor alpha*) [60], deux cytokines pro-inflammatoires. En contrepartie, les monocytes intermédiaires se trouvent dans un entre-deux entre les monocytes classiques et les non-classiques, comment leur nom l'indique. Ces monocytes sécrètent à la fois de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire et, dans une moindre mesure, l'IL-1 β et du TNF- α [60]. Il a été néanmoins démontré que le sous-type majoritairement retrouvé dans un contexte de maladie inflammatoire était les monocytes non-classiques, avec une faible proportion de monocytes intermédiaires [60].

La classification des sous-types monocytaires chez la souris est similaire à la classification humaine, ainsi que leurs propriétés associées [58]. Les marqueurs présents cependant à la surface des monocytes diffèrent. Les sous-types de monocytes chez la souris sont ainsi respectivement classifiés sous les appellations Ly6C⁺⁺CD43⁺, Ly6C⁺⁺CD43⁺⁺ et Ly6C⁺CD43⁺⁺[58].

Chez l'humain, les monocytes se différencient en plusieurs sous-types de macrophages polarisés: les M1 et les M2 [64, 65]. Ces différents sous-types de macrophages sont impliqués dans différents rôles physiologiques [64, 65]. Les macrophages M1 sont caractérisés pour leur production des mêmes cytokines pro-inflammatoires IFN-1 β et TNF- α que les monocytes non-classiques, mais également pour leur sécrétion d'IL-6 à des concentrations similaires aux monocytes classiques [64, 65]. Ce sont les macrophages principalement impliqués dans la réponse inflammatoire. Les macrophages M2, quant à eux, produisent des cytokines qui sont davantage associées à une action anti-inflammatoire, comme IL-10 et TGF- β (pour *transforming growth factor bêta*) [64, 65]. Ils sont davantage impliqués

dans la régulation immunitaire et dans la réduction de la réaction inflammatoire, à savoir la résolution de celle-ci [64, 65]. Les macrophages possèdent une plasticité cellulaire : ils ont la capacité de passer d'un phénotype M1 à un phénotype M2 dépendamment des conditions auxquelles ils sont soumis [66, 67].

Cette différenciation serait la conséquence de la présence des oxLDL et de la sécrétion de nombreux médiateurs inflammatoires dans la plaque, tels que IFN- γ (interféron gamma), TNF- α , TFG- β et IL-10 [41, 68]. Les facteurs M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) et MCP-1 jouent également un rôle dans la transformation des monocytes en macrophages et dans l'induction de l'expression de leurs récepteurs éboueurs à leur surface, soit SR-A, CD36 et CD68 [41, 68]. L'expression de ces récepteurs résulte également de la sécrétion de IFN- γ et TNF- α [32, 68]. C'est l'expression de ces récepteurs qui permettent aux macrophages de capter les oxLDL qui n'auraient pas été reconnus par les récepteurs LDL (rLDL) déjà exprimés à leur surface et qui sont spécifiques aux LDL dits natifs [32]. Cette internalisation des oxLDL par les macrophages va induire leur transformation en cellules spumeuses, contribuant ainsi à une accumulation de cholestérol dans l'intima et, subséquemment, au développement de la plaque [32, 41]. Les cellules spumeuses sont ainsi des macrophages ayant accumulé des lipides, jusqu'à en être gorgés. Les lipides ainsi accumulés prennent alors la forme de ce qui est appelé des gouttelettes lipidiques. Elles doivent leur nom à leur aspect émulsifié.

Ainsi, les macrophages internalisent le cholestérol et se transforment en cellules spumeuses. Ils acquièrent de nouvelles capacités avec leur accumulation dans l'intima. En effet, avec leur agrégation dans la paroi vasculaire, des facteurs de proliférations sont sécrétés (M-CSF et GM-CSF « *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* ») [32, 69]. Ces facteurs, de même que la présence de l'interleukine 3 (IL-3), entraînent la prolifération des macrophages. Ainsi, l'absorption et la rétention de cholestérol via l'accumulation et la prolifération de cellules spumeuses conduisent à la formation de stries lipidiques [32, 69]. Ces stries lipidiques représentent l'initiation de la lésion athérosclérotique [32]. En plus de contribuer à la formation de la plaque athérosclérotique, ces cellules sont également responsables de la sécrétion de divers facteurs inflammatoires favorisant la progression des

lésions [32].

Les cellules spumeuses pourraient également avoir une autre origine que les macrophages dérivés de la différenciation des monocytes. En effet, tout comme ces derniers, les CML expriment à leur surface des récepteurs éboueurs qui leur permettent d'interagir avec les lipoprotéines, et donc avec les oxLDL [70, 71]. L'accumulation lipidique a pour effet d'induire l'expression de marqueurs associés aux macrophages chez les CML et également de leur permettre d'acquérir une fonction de phagocytose [70, 71]. Ces cellules subissent donc un changement de phénotype [71]. Ainsi, les cellules retrouvées au sein des plaques athérosclérotiques, et dont les monocytes sont l'origine présumée, pourraient plutôt être des CML transformées en cellules spumeuses [70]. Les CML pourraient donc contribuer de façon importante au développement de l'athérosclérose [70]. Cette hypothèse demeure à confirmer.

1.2.5. Formation de la plaque et rupture

Au cours de la progression des lésions, on assiste également à la migration des CMLs depuis la média jusque dans l'intima. Le mécanisme impliqué derrière cette migration demeure encore partiellement incompris. Les cellules musculaires lisses dans la média ont, en conditions normales, un phénotype contractile [72, 73]. Dans cet état, les cellules quiescentes sont responsables du maintien du tonus et de la contraction vasculaire [73]. Cependant, en présence d'une physiopathologie inflammatoire comme l'athérosclérose, une partie des cellules de la média perdent leur capacité contractile pour un phénotype « synthétique ». La capacité contractile des cellules laisse place à une capacité proliférative et migratoire [72, 73].

Dans la média, les CMLs sont liées par l'intermédiaire d'intégrines à des cellules de la matrice extracellulaire (CMCs), comme la fibronectine, dont le rôle est de préserver la structure tissulaire. Les CMLs synthétiques ont la capacité de sécréter différentes métalloprotéinases matricielles (MMPs), qui entraînent la dégradation de la matrice cellulaire de par l'action de leurs protéinases [73, 74]. Les protéinases des MMPs (1, 3, 7, 9 et 14) sont connues pour permettre la dégradation des CMCs, notamment de la limitante élastique interne, et entraîner la migration des CMLs synthétiques [73, 75]. Les CMLs migrent donc de la média

vers l'intima, où elles vont contribuer à l'épaississement de la lésion athérosclérotique en s'insérant entre les CEs et les stries lipidiques [32]. Cet épaississement de la lésion résulte également en grande partie de la sécrétion de protéines comme le collagène et l'élastine, qui contribuent à la formation d'une matrice extracellulaire. Les stries lipidiques se transforment en lésions athéromateuses plus développées qui présentent une chape fibreuse [32, 76]. En plus d'être responsables de la sécrétion de fibre de collagène et d'élastine, les CMLs relâchent également nombre de cytokines comme le TNF- α , et de protéases (MMPs) au sein de la plaque [32, 39, 76].

Les cellules spumeuses contribuent également à la formation et à la progression de la plaque, et ce, au stade encore précoce du développement de l'athérosclérose. En effet, il a été démontré que les stries lipidiques contenaient une grande proportion de cellules spumeuses en stade dit sénescence, à savoir en arrêt de croissance cellulaire [77]. Des cellules sénescence sont des cellules où la division cellulaire n'a plus lieu et où les processus biologiques sont diminués [78, 79]. Cette sénescence des cellules spumeuses a pour effet d'entraîner une surexpression de cytokines inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 α , mais également de facteurs chimiotactiques spécifiques des macrophages, comme MCP-1 [77]. L'expression de ces facteurs entraîne ainsi la progression de la maturation des stries lipidiques, de même qu'un recrutement accru des monocytes au sein de la plaque, et ce, à tous les stades de développement de l'athérosclérose [77].

En parallèle du processus de formation de la chape fibreuse, on voit également apparaître la formation d'un noyau nécrotique. L'apoptose des cellules spumeuses est un mécanisme pouvant expliquer la formation d'un noyau nécrotiques [76, 80]. Les cellules spumeuses présentes au sein de l'intima passent également par ce processus de mort cellulaire. À l'accumulation de cellules spumeuses s'ajoute donc l'accumulation de déchets cellulaires, mais également une accumulation du contenu de ces cellules, soit du cholestérol [76, 80]. Lorsqu'il y a mort cellulaire, les débris sont normalement phagocytés, notamment par des macrophages; un processus qu'on nomme efferocytose [76, 80]. Or, il y a un défaut de ce processus au cours du développement de l'athérosclérose, notamment en raison de la

modification de la fonction des macrophages transformés en cellules spumeuses [76, 80]. Aux stades précoces du développement des lésions, les macrophages dits sains, qui sont présents dans la plaque, parviennent à phagocyter ces déchets. Avec la progression des lésions cependant, le ratio de macrophages sains diminue au profit de l'accumulation des cellules spumeuses et on voit apparaître le défaut d'efferocytose [80]. Ainsi, l'accumulation des déchets cellulaires dans la plaque laisse place à la formation d'un noyau nécrotique [32, 76, 80]. Les CMLs synthétiques contribuent également à la formation du noyau nécrotique par leur apoptose et l'accumulation de leurs déchets.

La formation de ce noyau nécrotique exacerbe l'inflammation et entraîne l'instabilité de la plaque athérosclérotique. Les protéinases des MMPs, provenant des CMLs synthétiques de même que des cellules spumeuses, provoquent la dégradation graduelle de la structure matricielle de la plaque et donc de la chape fibreuse [39, 80]. Cette dernière, qui protégeait le cœur lipidique de la lumière de l'artère, s'amincit jusqu'à sa rupture. La rupture de la plaque forme alors un thrombus qui peut être ou ne pas être obstructif [39, 80]. Les conséquences de cette rupture peuvent mener à la mort.

1.2.6. Régression de l'athérosclérose

L'inflammation chronique contribue de façon substantielle à la progression de pathophysiologie comme l'athérosclérose. Cette inflammation contribue à l'infiltration continue de monocytes, qui se différencieront en macrophages, puis en cellules spumeuses [81]. On assiste alors à une inflammation non résolue, qui se perpétue notamment en raison de la rétention des macrophages au sein de la lésion et de leur défaut d'efferocytose [82, 83]. Or, de récentes études ont mis en évidence l'implication des macrophages dans la régression des lésions, un processus dit impossible dû à l'irréversibilité des plaques. Cette irréversibilité serait la conséquence de la présence d'un noyau nécrotique, mais également la fibrose et de la calcification des lésions [84]. En effet, les macrophages possèdent la capacité d'émigrer hors de la plaque [83]. Cette émigration a été démontrée dans des modèles de souris de régression d'athérosclérose, où une déplétion en macrophage et en cellules spumeuses a été dénombrée [85, 86]. Une des avenues dans le traitement de l'athérosclérose pourrait donc résider dans

cette voie de transport cellulaire.

Des études ont également démontré l'importance du transport du cholestérol, dans la régression des lésions athérosclérotiques [87]. L'émigration des macrophages est diminuée au cours de l'athérosclérose. Or, une augmentation de l'expression des transporteurs de cholestérol [88, 89] et une augmentation des accepteurs (apolipoprotéine A-I) ont été précédemment associées à la promotion de la régression des athéromes, à la fois dans des modèles murins [90] et chez l'homme [91]. Ces augmentations semblent indiquer une implication considérable de l'efflux de cholestérol, dans la régression de l'athérosclérose [87]. L'efflux de cholestérol et l'implication des donneurs et des accepteurs de cholestérol seront abordés dans un prochain chapitre.

1.3. Métabolisme du cholestérol

1.3.1. Cholestérol

Les lipides sont un constituant majeur des membranes cellulaires, mais sont également essentiels au stockage énergétique. Le cholestérol est une molécule lipidique organique de type stérol, qui peut être synthétisée par la majorité des eucaryotes [32, 92]. De plus, environ 15% du cholestérol circulant peut également provenir de l'alimentation [78]. La molécule est également un précurseur à la formation des hormones stéroïdiennes, des sels biliaires et de la vitamine D [78]. Dans l'organisme, le cholestérol est retrouvé sous deux formes : le cholestérol estérifié ou le cholestérol libre [32]. Le cholestérol libre est celui constituant principalement les membranes cellulaires. Cependant, en circulation dans le plasma, c'est sous sa forme estérifiée que le cholestérol est retrouvé principalement. En effet, plus hydrophobe que le cholestérol libre, le cholestérol estérifié se retrouve au niveau du cœur de particules de transport, les lipoprotéines [32].

1.3.2. Lipoprotéines

Les lipoprotéines sont responsables du transport des lipides dans l'organisme. [32, 93]. Les différentes lipoprotéines retrouvées dans le plasma sont classifiées en fonction de leur

densité, qui se traduit directement par leur composition respective en lipides et par leur taille. Ainsi, les plus grosses lipoprotéines retrouvées dans le plasma sont également celles avec la plus faible densité [32, 92]. Les sous-sections suivantes décrivent les différentes classes de lipoprotéines répertoriées dans l'organisme (Tableau 1).

Les lipoprotéines sont constituées d'une enveloppe lipidique (phospholipides et cholestérol libre). Le cœur de ces particules, tel que stipulé dans la section précédente, est formé d'une part de cholestérols estérifiés, mais également de triglycérides (TG) [32]. Enfin, sur leur surface, diverses protéines peuvent également se retrouver, dont des apolipoprotéines [32] (Figure 2). Ce sont ces dernières qui sont responsables du transport du cholestérol dans les lipoprotéines [32, 78].

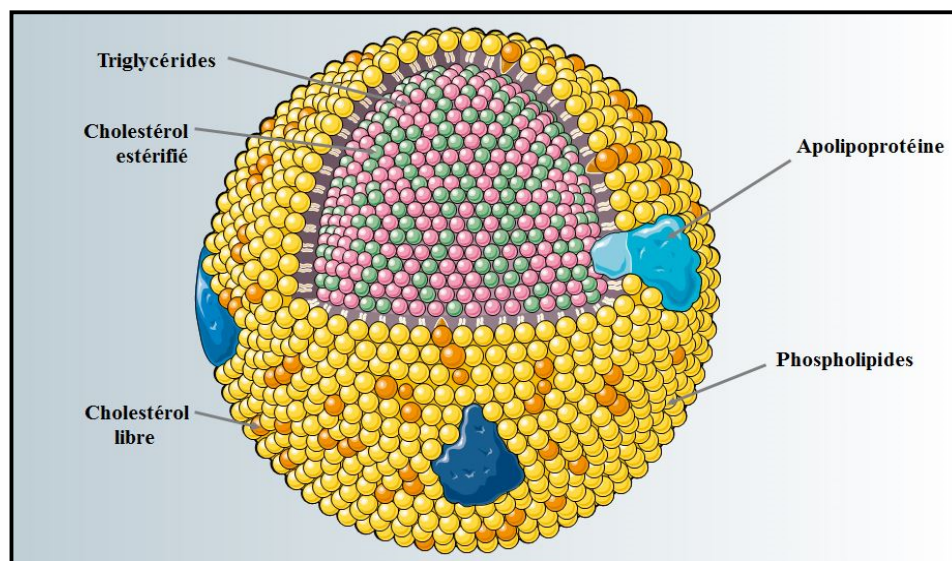


Figure 2. Composition des lipoprotéines. Adapté de [30]

1.3.2.1. Chylomicrons

Les chylomicrons sont les lipoprotéines avec la plus faible densité retrouvée, celle-ci étant inférieure à 0,95 g/mL. Ils sont sécrétés depuis les intestins et sont essentiellement composés du cholestérol dérivé de l'alimentation [32, 92]. Ce sont les lipoprotéines les plus riches en TG. Les chylomicrons se caractérisent par leur expression d'une forme particulière

d'apolipoprotéine de type B : l'apolipoprotéine B-48 [32, 94]. Cette dernière permet la formation et la sécrétion des chylomicrons par l'intestin [95]. Sur sa surface, on retrouve également trois formes d'apolipoprotéines C [32, 95]. Ces protéines sont impliquées dans diverses fonctions métaboliques, notamment dans l'activation et l'inhibition de la lipoprotéine lipase (LPL) [32]. Enfin, l'apoE est également retrouvée à sa surface et joue un rôle dans la capture de la lipoprotéine au foie par un récepteur spécifique à l'apoE, LRP1 (pour *low density lipoprotein receptor-related protein 1*) [32]. Cette capture est nécessaire à leur dégradation et pour le recyclage de leurs composants.

1.3.2.2. VLDL

Les VLDL (pour *very-low-density lipoprotein*) sont une autre classe de lipoprotéines répertoriée dans la circulation [92]. Ces dernières sont sécrétées par le foie dans la circulation, afin de subvenir aux besoins énergétiques. Bien que plus petites que les chylomicrons, les VLDL possèdent cependant une densité presque aussi faible ($< 1,006$ g/mL) et sont très riches en TG [32, 92]. À leur surface, on retrouve également une forme d'apolipoprotéine A (apolipoprotéine A-V), de même que 2 formes d'apolipoprotéine C (C-II et C-III) [32]. De plus, les VLDL présentent de l'apoE. Enfin, on retrouve sur ces lipoprotéines une apolipoprotéine de type B-100 [32]. Contrairement à l'apolipoprotéine B-48, qui n'a qu'une fonction structurale, l'apolipoprotéine B-100 permet aux VLDL d'être reconnues par les récepteurs LDL et d'ainsi être recaptées et hydrolysées [32]. Cette hydrolyse permet la diminution des triglycérides des VLDL, transformant ces dernières en IDL (pour *intermediate-density lipoprotein*) et, subséquemment, en LDL [32]. Cette voie du transport du cholestérol sera abordée plus en détail dans une section ultérieure.

1.3.2.3.IDL

L'hydrolyse des VLDL permet d'obtenir une lipoprotéine intermédiaire, partiellement appauvrie en cholestérol et à la surface de laquelle on ne retrouve plus qu'une apolipoprotéine B-100 de même que l'apoE [92]. En effet, en plus des chylomicrons et des VLDL, les IDL sont les principales lipoprotéines à exprimer l'apoE [92]. La densité de ces lipoprotéines est

estimée entre 1,006 et 1,019 g/mL. C'est dans les IDL que l'on retrouve des niveaux de cholestérol les plus variables. En effet, les proportions peuvent être équivalentes à près de 50% pour les TG et le cholestérol estérifié (Tableau 1) [92].

1.3.2.4.LDL

Tout comme les IDL, les LDL sont issus de l'hydrolyse des triglycérides des IDL et des VLDL. Cette hydrolyse résulte de l'activité de la lipase hépatique (LH), aussi appelée triglycéride lipase hépatique [92]. Ainsi, l'appauvrissement en triglycérides des IDL entraîne leur transformation en LDL. Ces dernières possèdent également une densité variable, soit entre 1,019 à 1,063 g/mL [32, 92]. Les particules LDL, contrairement aux autres lipoprotéines de faible densité, sont composées majoritairement de cholestérol estérifié (40 à 50 % contre 5 à 10% de TG) [32]. De plus, avec l'hydrolyse par la LH, elles perdent l'expression de leur apoE [92]. L'apolipoprotéine B-100 est ainsi la seule apolipoprotéine retrouvée sur la surface des LDL [32].

1.3.2.5.HDL

Les HDL se divisent principalement en deux sous-populations : les HDL3 et les HDL2 [96, 97]. Quelle que soit la sous-population à laquelle elles appartiennent, ces HDL ont pour caractéristique d'être de petites lipoprotéines sphériques hétérogènes en termes de taille et de composition [92, 98]. Ce sont les plus petites lipoprotéines répertoriées et celles possédant la plus grande densité (1,063 à 1,210 g/mL) [92]. Elles sont composées en plus grande proportion par des CE (15 à 30%), avec un pourcentage en TG similaire à ce qui est également retrouvé chez les LDL (5 à 10%). Les HDL sont sécrétées par les hépatocytes et les entérocytes [99]. De plus, certaines HDL sont également formées par le remodelage des chylomicrons ou encore par l'hydrolyse des lipoprotéines de faible densité [92]. Les principales apolipoprotéines retrouvées sur les surfaces des HDL sont l'apolipoprotéine A-I et A-II [92, 99]. Le rôle de l'apolipoprotéine A-I consiste en l'activation d'une enzyme, la lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT), qui est responsable du remodelage des HDL (pré β -HDL) et des apolipoprotéines de type B [92, 99]. De plus, l'apoA-I joue également un rôle dans l'interaction cellulaire avec certains transporteurs, comme ABCA1 (ABCA1 pour

ATP-binding cassette transporter A1) [99]. Cette interaction sera abordée plus en détail dans une autre section 1.3.3.1.

Lipoprotéines	Densité (g/mL)	TG (%)	Cholestérol estérifié (%)	Apolipoprotéines principales	Apolipoprotéines secondaires	Origine
Chylomicrons	< 0,95	85	5	ApoB-48, ApoE	ApoC-I, II, et III.	Intestins
VLDL	< 1,006	55	15	ApoB-100, ApoE	ApoC-II, et III ApoA-V	Foie
IDL	[1,006-1,019[25	30	ApoB-100, ApoE	-	VLDL
LDL	[1,019-1,063[5-10	40-50	ApoB-100	-	IDL
HDL	[1,063-1,210]	5-10	15-30	ApoA-I, ApoA-II	ApoA-IV, V ApoC-I, II, et III ApoE	Foie, intestins

Tableau 1: Lipoprotéines plasmatiques. Adapté de [32, 92].

1.3.3. Transport inverse du cholestérol (TIC)

L'accumulation du cholestérol entraîne une lipotoxicité et augmente les risques de maladies cardiovasculaires [92]. Ainsi, l'élimination du cholestérol circulant dans l'organisme est impérative. Or, l'organisme est incapable de le dégrader : il ne peut être que modifié ou transporté hors de celui-ci, notamment par les HDL [92, 99]. Le transport inverse du cholestérol (TIC) est un des principaux mécanismes utilisés par l'organisme pour ce faire [99]. La circulation entéro-hépatique, où on assiste à la transformation du cholestérol en sels biliaires, et le transport du cholestérol par le foie sont également des voies métaboliques par lesquelles le cholestérol est excrété. Ces mécanismes seront également abordés dans ce chapitre. Le TIC s'effectue en trois étapes distinctes : l'efflux de cholestérol par les macrophages, l'estérification et le transfert du cholestérol entre les lipoprotéines et finalement l'internalisation des HDL au foie [92, 100].

1.3.3.1. L'efflux de cholestérol

L'augmentation des LDL dans le plasma, et donc du cholestérol, entraîne leur accumulation dans la paroi vasculaire [92, 99]. Cette accumulation, comme mentionnée

précédemment, peut mener au développement de l'athérosclérose. Dans un premier temps, ce sont les HDL dans le plasma qui permettent le transport de ce cholestérol hors de l'organisme, empêchant ainsi son accumulation [92, 99].

L'efflux de cholestérol constitue la première étape essentielle du TIC. Dans l'organisme, l'efflux de cholestérol s'effectue notamment au moyen d'un mécanisme passif : la diffusion aqueuse [101-103]. Cet efflux de cholestérol passif fait partie intégrante du TIC. La diffusion aqueuse s'effectue sans interaction entre un récepteur d'une cellule donneuse de cholestérol et son accepteur [101]. Le processus débute par la dissociation spontanée du cholestérol présent à la surface membranaire, un processus qu'on appelle la désorption [102, 103]. Les molécules de cholestérol vont alors passer par diffusion dans l'espace aqueux présent entre la surface cellulaire et l'accepteur de cholestérol. Le cholestérol est par la suite incorporé dans ce dernier à son contact [101, 102]. Le mécanisme dépend dans son intégrité du gradient de concentration en cholestérol entre les cellules périphériques donneuses et le milieu extracellulaire associé où la diffusion est observée [101]. Ainsi, le taux d'efflux obtenu par ce mécanisme n'est pas dépendant dans la concentration cellulaire en cholestérol du donneur, mais bien de l'accepteur. En effet, le transfert en cholestérol entre une cellule et une lipoprotéine acceptrice dépend de la composition de cette dernière, mais également de sa taille [101, 102]. Cette voie passive contribue de façon importante à l'efflux de cholestérol des macrophages dans le processus du TIC [102, 103].

L'efflux de cholestérol est également rendu possible par un processus actif mettant à contribution les HDL [99]. Le processus s'amorce par la formation des HDL [99]. Cette formation résulte tout d'abord de la sécrétion de l'apoA-I par le foie et les cellules intestinales [99]. Un processus de lipodation de l'apoA-I s'ensuit, la molécule s'associant au transporteur ABCA1 à la surface membranaire de cellules périphériques, telles que les macrophages, ou encore du foie et de l'intestin [92, 99]. Cette interaction permet l'efflux de cholestérol libre et de phospholipides, pour former un complexe avec ApoA-I [32, 104]. La formation de ce complexe mène à la biogenèse de HDL prématurées, les pré β -HDL [104]. Ces pré β -HDL estérifiées permettent l'enrichissement du cœur lipidique des HDL [99]. Cet enrichissement

aboutit à la maturation des HDL en HDL3 puis HDL2 [32, 99]. Un second acteur, ABCG1 (pour *ATP-binding cassette transporter G1*), intervient également dans l'efflux de cholestérol. ABCG1 se retrouve principalement à la surface des macrophages [99]. Il contribue à l'enrichissement du transport du cholestérol vers les HDL matures, préférentiellement les HDL2 [32].

1.3.3.2. Transfert du cholestérol par la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP)

Le cholestérol des HDL peut également être échangé avec d'autres lipoprotéines au cours du transport inverse du cholestérol. En effet, en plus de l'efflux de cholestérol qui contribue à l'excrétion du cholestérol hors de l'organisme, le transfert du cholestérol par une tierce protéine est également possible. La protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) est responsable d'un échange entre les lipoprotéines de faible densité et les HDL. L'échange résulte en un transfert de cholestérol estérifié depuis les HDL vers les lipoprotéines apoB et de TG depuis ces dernières vers les HDL [32, 99]. Ce transfert entre les HDL et les LDL permet une modification dans la densité de ces particules, diminuant ainsi la taille des HDL et augmentant la densité des LDL. Cette augmentation de densité permet d'augmenter l'affinité des LDL à leurs récepteurs, de sorte à diminuer leur rétention dans la circulation, de même que la réaction d'oxydation qui est leur associée [105]. Les lipoprotéines de type apoB impliquées dans cet échange peuvent par la suite être capturées par le foie, de sorte à permettre l'excrétion du cholestérol, notamment par les sels biliaires. [92].

De plus, l'excrétion du cholestérol peut également passer par la voie du transport indirect du cholestérol, qui est un mécanisme parallèle, étroitement lié au TIC. Cette voie est également connue sous l'appellation de voie hépatique [32]. Ainsi, l'excrétion de cholestérol dépend de la formation des lipoprotéines de faible densité. Les VLDL, excrétées par le foie et les cellules intestinales, suite à l'apport en acide gras à partir de l'alimentation, peuvent emprunter deux voies distinctes : elles peuvent être captées par le foie par le LRP1, considérant la présence de l'apoE à leur surface, ou encore subir une hydrolyse de leurs triglycérides par la LPL [92, 106]. Cette réaction enzymatique, comme mentionnée

précédemment, mène au remodelage des lipoprotéines et donc à une augmentation de leur densité. L'hydrolyse des VLDL mène à la formation des IDL. Ces dernières peuvent à leur tour subir le même processus de recapture par le foie, dû à la présence de l'apoE à leur surface, ou être hydrolysés en LDL, cette fois-ci par l'action de la LH [92, 106]. Les LDL sont finalement internalisés par le foie en majorité, ou encore par les tissus périphériques en plus faibles proportions, par l'intermédiaire des rLDL [106]. Chez les individus normolipidémiques, cette portion de cholestérol peut être récupérée pour la fonction tissulaire ou encore être dirigée dans les tissus périphériques où elle sera prise en charge par les HDL et éventuellement internalisée par le foie [32], pour être excrétée [92, 106].

1.3.3.3. Internalisation hépatique des HDL

Suite à l'efflux de cholestérol et au remodelage des HDL par différents mécanismes, le cholestérol peut être excrété hors de l'organisme par un mécanisme connu comme la captation sélective des HDL. Cette captation permet une internalisation des HDL par le foie [32]. En effet, les HDL gorgées de cholestérol estérifié provenant, entre autres, des tissus périphériques comme les macrophages, peuvent être captées par les récepteurs hépatiques éboueurs BI (SR-BI), présents à la surface du foie [32, 107]. Cette captation permet d'augmenter l'efflux de cholestérol et ainsi de diminuer les niveaux de cholestérol plasmatiques [107]. De plus, la réduction de l'accumulation de cholestérol dans les macrophages entraîne à son tour une diminution dans la formation des stries lipidiques associées au développement de l'athérosclérose [107].

En plus de SR-BI, les HDL peuvent également être captées par les LRP1, puisque tout comme les VLDL et les IDL, ils possèdent à leur surface l'apoE [99]. Le cholestérol estérifié alors contenu dans les HDL est également acheminé au foie. Les HDL sont alors internalisées par le même mécanisme relatif à SR-BI [99].

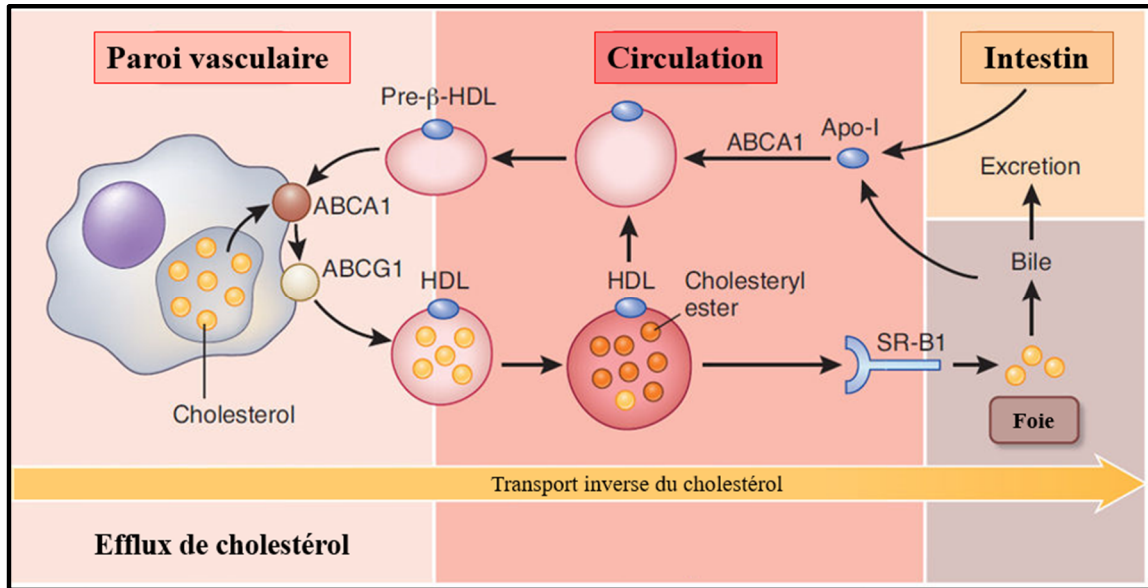


Figure 3. Transport inverse du cholestérol. Adapté de [108].

1.3.4. Le rôle protecteur des HDL dans l'athérosclérose

Les HDL pourraient jouer un rôle prépondérant dans la diminution du risque de développement de maladies cardiovasculaires et coronariennes, qui sont associées au développement de l'athérosclérose. En effet, de nombreuses études ont démontré jusqu'à maintenant que de faibles niveaux de HDL cholestérol (HDL-C) corrélaient directement avec le développement de l'athérosclérose, et ce, indépendamment des niveaux d'apolipoprotéines de type B [109, 110]. Les lipoprotéines de type apoB sont associées à l'accumulation et à la rétention du cholestérol dans les parois vasculaires et sont des précurseurs du développement des maladies cardiovasculaires [109]. Cette athéro-protection associée aux HDL ne relève pas seulement de leurs niveaux en tant que HDL-C dans la circulation, mais également de leur capacité fonctionnelle [107, 111]. En effet, les HDL d'individus en santé possèdent de nombreux bienfaits biologiques, en plus leur fonction dans la promotion de l'efflux du cholestérol [99, 109]. Ainsi, de hauts niveaux de HDL sont associés à une diminution de l'inflammation dans la paroi vasculaire [109], de même qu'à une activité anti-oxydative [99, 110]. En effet, les HDL inhibent l'action oxydative associée aux LDL [110]. De plus, les HDL possèdent également des bienfaits antithrombotique et vasodilatateur, associés à la protection de la fonction endothéliale [99, 110].

L'implication de la dysfonction des HDL, dans le développement de l'athérosclérose est cruciale. Au cours de l'efflux de cholestérol, une portion du cholestérol est acheminée aux tissus périphériques par une capture des LDL par leurs récepteurs respectifs, les rLDL [32, 92]. En circonstance homéostatique, les HDL prennent en charge le cholestérol acheminé aux tissus périphériques pour le transporter jusqu'au foie, comme mentionné dans la sous-section 1.3.3.3. Ce processus est observé chez les patients normolipidémiques. Chez les patients hypercholestérolémiques, la situation est différente. Ces derniers, par définition, possèdent de hauts niveaux de VLDL/LDL et de bas niveaux de HDL [31]. Ce bas niveau de HDL diminue directement le TIC et donc l'efflux de cholestérol [107, 111]. En effet, on assiste à une accumulation du cholestérol dans les tissus périphériques, comme les macrophages, et donc à la formation des stries lipidiques [92].

La recherche clinique et fondamentale actuelle se concentre sur l'étude des thérapies HDL. En effet, quelques études précédentes ont permis de déterminer que l'augmentation des niveaux de HDL était associée à une régression des lésions athérosclérotiques [110], tant au niveau de l'étendue de ces lésions [87, 112], que du volume de ces dernières [113], ou encore de leur composition [90, 114]. En 2011, un groupe a également mis en évidence l'importance de la fonction d'efflux de cholestérol des HDL dans la protection du développement de l'athérosclérose [115]. L'efflux de cholestérol est une fonction importante des HDL et la capacité d'efflux du cholestérol des HDL ne corrèle pas parfaitement avec les concentrations en HDL-C. En effet, de nombreuses études publiées dans les dernières années ont également démontré des résultats variables et peu concluants quant aux bénéfices associés avec une augmentation du contenu en cholestérol dans les HDL (HDL-C) [116]. Ces résultats ont mené à remettre en question les hypothèses émises quant aux bénéfices des HDL et de cibler exclusivement une augmentation de leur contenu en cholestérol [116, 117]. En effet, la quantité de particules HDL présente en circulation jouerait un rôle important et devrait être prise en considération, de même que des fonctions de ces dernières, telles que leur capacité d'efflux du cholestérol [116, 118]. Les études cliniques se concentrant sur les thérapies HDL dans le traitement de l'athérosclérose devraient donc s'orienter dans une optique de tenir en compte tous ces facteurs.

1.4. Modèles murins d'athérosclérose

Le premier modèle animal répertorié dans le cadre de la recherche sur l'athérosclérose remonte à 1908. À l'époque, les expériences du Dr Alexander I. Ignatowski sur le lapin permirent la mise en évidence de l'induction de lésions athérosclérotiques chez l'animal [119]. Depuis, de nombreux modèles animaux pour l'étude de l'athérosclérose ont été établis, tant chez les mammifères que chez les primates non-humains [119]. L'utilisation de petits mammifères tels que les lapins, hamster, souris, rats et hamsters demeurent parmi les plus fréquentes, bien que l'on puisse également répertorier des modèles de chiens, cochons et d'oiseaux et de primates non-humains [119]. L'utilisation des modèles animaux a permis nombre de découvertes, non seulement sur l'induction des lésions athérosclérotiques, mais également sur leur évolution, sur l'implication des autres facteurs connus, mais également sur des traitements contre le développement de l'athérosclérose. Ainsi, l'implication de l'inflammation, de l'alimentation, mais également du stress oxydatif sur la fonction endothéliale a pu être mise en lumière [119].

Parmi tous les modèles utilisés dans la recherche sur la compréhension du développement et de la progression de l'athérosclérose, la souris est le modèle animal le plus utilisé actuellement [120, 121]. Ceci est dû notamment à l'accessibilité des manipulations génétiques chez la souris [120, 121], mais également à leur cycle de reproduction rapide et au faible coût associé à l'entretien des colonies [120]. Néanmoins, la résistance naturelle de la souris au développement de l'athérosclérose nécessita sa modification génétique [111].

1.4.1. Souris rLDL^{-/-}

Le modèle de souris inactivé génétiquement pour l'expression des récepteurs LDL (rLDL^{-/-}) est l'un des modèles les plus largement utilisés pour l'étude de l'athérosclérose. Le principe repose sur une modification génétique de la lignée germinale [122]. La construction d'un vecteur de remplacement a été élaborée, afin de permettre l'interruption de l'expression génique du récepteur par une recombinaison homologe sur des cellules souches d'embryons murins [123]. Le vecteur était composé par le promoteur murin de la polymérase II, sous le contrôle duquel se trouvait le gène de sélection *neo* [123]. Le vecteur contenait également un

site de polyadénylation (pA) [123]. Le vecteur a été inséré au niveau du quatrième (4) exon du locus. L'expression de ce dernier permet ainsi d'obtenir une protéine tronquée et non-fonctionnelle du fait de l'arrêt de sa traduction, résultant en l'inactivation de l'expression des rLDL chez la souris [123]. Cette inactivation de l'expression des rLDL inhibe le transport du cholestérol vers le foie, augmentant ainsi les concentrations plasmatiques de cholestérol. Sans rLDL, ces animaux ne peuvent excréter leur cholestérol, puisque le captage des LDL devient impossible. Chez la souris, les principales lipoprotéines retrouvées sont les HDL, contrairement à l'homme qui a un plasma plus riche en LDL [121, 124]. L'inhibition de l'expression de rLDL permet ainsi d'obtenir un profil humanisé plus riche en LDL et VLDL, associé au développement de l'athérosclérose. Ce profil peut être généré sur un court laps de temps sous une diète riche en cholestérol.

1.4.2. Souris ApoE^{-/-}

Le modèle de souris inactivé pour l'expression de l'apoE (*ApoE^{-/-}*) est également l'un des modèles les plus répandus pour l'étude de l'athérosclérose. [121]. L'inactivation de l'expression d'*ApoE* entraîne une augmentation des niveaux circulants de chylomicrons, de VLDL et de LDL chargés en cholestérol [120]. L'expression d'*ApoE* à la surface de ces lipoprotéines est nécessaire pour leur capture par le récepteur LRP1 [32]. L'inactivation d'*ApoE* permet la rétention d'un plus large éventail de lipoprotéines, puisque toutes les apolipoprotéines de type B portent à leur surface l'*ApoE*, à l'exception des LDL [92]. Or, sans apoE, ces lipoprotéines ne sont reconnues par aucun récepteur et s'accumulent, provoquant une hypercholestérolémie chez les animaux [120]. Tout comme les rLDL^{-/-}, une diète riche en cholestérol facilite le développement de l'hypercholestérolémie et accélère le développement des lésions athérosclérotiques. Néanmoins, les souris *ApoE^{-/-}* développent également le même genre de lésions sur une diète normale [119, 121] mais à un rythme moindre. Chez ces animaux, l'athérosclérose se développe plus rapidement que chez les souris rLDL^{-/-} [125].

1.4.3. Souris ApoE*3-Leiden (E3L)

Un autre modèle de souris est également utilisé pour l'étude de l'athérosclérose. Ce modèle a été développé afin d'humaniser le profil de lipoprotéines de ces animaux. Les souris *APOE*3-*

Leiden (E3L) sont issues de l'insertion du gène muté *ApoE* découverte chez l'homme (*APOE*3*-Leiden) [126]. La mutation *APOE*3*-Leiden entraîne une diminution de l'affinité de l'*ApoE* pour les LRP [121, 127]. Cette diminution de l'affinité entraîne à son tour une diminution dans la clairance des lipoprotéines [127]. Chez l'homme, cette mutation résulte à une dysbêtalipoprotéïnémie (FD), une affection qui entraîne l'accumulation de hautes concentrations en TG et en cholestérol [128]. Cette accumulation prédispose les patients affectés à une athérosclérose précoce, de même qu'à des problèmes coronariens [128]. La FD est généralement la conséquence de l'expression du gène *ApoE*2*, si les deux allèles expriment celui-ci [129]. Cependant, une faible proportion des patients affectés par l'expression d'*APOE*2* développe la FD [128]. L'affection est néanmoins également associée à une hétérozygotie du gène *APOE*3*-Leiden, où la majorité des individus développe une dysbêtalipoprotéïnémie [128]. La sévérité du phénotype est cependant affectée par l'environnement [128]. Sous diète HC, les souris E3L développent des lésions athérosclérotiques similaires à ce qui est retrouvé chez les *ApoE*^{-/-} [121, 127].

1.4.4. Souris transgéniques pour la CETP humaine

Comme mentionné dans la section 1.4.1., les principales lipoprotéines retrouvées chez la souris sont des HDL, contrairement à l'homme [121, 124]. Or, chez ce dernier, la concentration de HDL-C est régulé entre autres par l'activité de la CETP [121]. La souris n'exprime pas la CETP [130, 131]. Ainsi, considérant le rôle qu'exerce cette protéine sur les niveaux de HDL et l'importance de ceux-ci dans le développement de l'athérosclérose, un modèle murin transgénique pour la CETP humaine a été mis au point. Le modèle résulte d'une modification génétique au niveau de la lignée germinale. Un second modèle de souris transgénique pour la CETP humaine a donc été mis au point, le minigène de la CETP étant inséré avec ses régions adjacentes (NFR pour *natural flanking region*) [131]. Le modèle NFR-CETP ainsi obtenu permet l'étude de l'expression de la CETP spécifiquement dans les tissus, de même que l'étude de son expression [131]. L'expression de la CETP est augmentée par une diète riche en cholestérol, [131]. Ce patron d'expression correspond davantage à ce qui est retrouvé chez l'humain [131], à savoir une expression de l'ARNm de la CETP dans le foie, l'intestin grêle, la rate et les tissus adipeux [131].

De nombreux modèles de souris ont par la suite été dérivés des NFR-CETP, de par leur croisement avec d'autres modèles modifiés génétiquement. L'étude de l'athérosclérose par l'utilisation de modèles de rongeurs exprimant la CETP a mené jusqu'ici à des résultats variables [132]. La CETP s'est démontrée être pro-athérogéniques dans des modèles inactivés pour l'apoE [133], E3L [134] ou encore rLDL [133]. D'autres modèles, où SR-BI est inactivé, ont démontré que la CETP ne semblait avoir aucun effet quant au développement de l'athérosclérose [135]. Enfin, nombre de modèles ont également démontré que l'expression de la CETP semblait avoir des effets anti-athérosclérotiques chez ceux-ci [132], notamment chez la souris utilisée pour étudier l'obésité et le diabète (*db/db*) [136] ou encore chez des souris transgéniques pour la LCAT [137]. Chez la souris, les effets pro- ou anti-athérosclérotiques semblent entièrement dépendants du modèle et des conditions dans lesquelles est étudiée l'athérosclérose.

1.4.4.1. *rLDL^{-/-}/hCETP*

Un modèle de souris rLDL^{-/-}/CETP a été utilisé pour étudier l'hyperlipidémie familiale [138], mais également l'impact de la CETP dans une athérosclérose avancée [133]. Les souris doubles mutantes exprimant la CETP humaine (NFR), mais sans expression des rLDL, démontrent des niveaux plus élevés de LDL (8,1 mM versus 5,8 mM), comparativement aux souris rLDL^{-/-} seulement [133]. De plus, l'expression de la CETP entraîne une diminution de HDL plasmatique (41 mg/dL versus 45 mg/dL) [133]. L'étude des lésions athérosclérotiques a également permis de déterminer une augmentation de la taille des lésions. Ainsi, l'expression de la CETP entraîne une augmentation conséquente de l'hyperlipidémie chez ces animaux, de même qu'une aggravation de l'athérosclérose.

1.4.4.2. *E3L.CETP*

Les souris E3L ont également été croisées avec des souris NFR-CETP afin d'obtenir un modèle avec une double mutation (E3L.CETP) de sorte à étudier plus en détail l'implication de la CETP dans le développement de l'athérosclérose [129]. Le modèle démontre également une différence au niveau de son profil lipoprotéique, lorsque comparé aux

E3L [129]. On assiste à une augmentation significative des niveaux de VLDL circulants, pour environ 5 mM versus 1,5 mM [129]. De plus, l'analyse des lésions athérosclérotiques démontre que ces souris développent des lésions neuf (9) fois plus étendues que celles des souris E3L [129]. Comme pour les souris rLDL^{-/-}/CETP, l'expression de la CETP entraîne une modification du profil de lipoprotéines, en augmentant ici les niveaux de VLDL circulants.

1.4.5. Souris infectées par AAV8-PCSK9^{D377Y}

La modification génétique d'une lignée germinale pour obtenir un modèle animal peut être contraignante. La difficulté réside généralement dans la nécessité d'effectuer différents croisements pour obtenir des souris expérimentales avec les mutations désirées [139]. Cette contrainte se retrouve dans les études concernant le développement de l'athérosclérose [139]. En effet, l'ingénierie génétique s'avère être un obstacle de taille dans l'étude de traits polygéniques associés à l'athérosclérose [139]. La nécessité de contourner cette problématique a permis le développement d'une nouvelle méthode d'induction du développement de l'athérosclérose chez la souris, évitant ainsi l'obligation de croisements fastidieux et coûteux [139]. Le principe repose sur la construction d'un vecteur viral codant une forme murine de la protéine PCSK9 (PCSK9 pour « *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9* »), avec un gain de fonction [139, 140]. Cette protéine est responsable dans l'organisme de la dégradation lysosomale des rLDL [139, 140]. Le vecteur a été conçu sous forme d'un plasmide où l'expression de la forme murine de PCSK9 (D377Y) est sous le contrôle du promoteur *ApoE* spécifique au foie [139]. Le vecteur viral dans lequel le plasmide est inséré est un virus adéno-associé (AAV pour « *adeno-associated virus* ») de type 8. Cet AAV possède un tropisme pour le foie. L'AAV8-PCSK9^{D377Y}, de son appellation, peut alors être injecté (*iv*) dans une souris de type sauvage afin d'induire le développement de l'athérosclérose [139, 140]. L'injection permettant l'expression accrue de PCSK9 et entraîne une diminution drastique de l'expression des rLDL de par leur dégradation dans le foie [139, 140]. Cette dégradation laisse en circulation les LDL, ceux-ci ne pouvant être recaptés efficacement, l'expression de rLDL dans les tissus périphériques étant négligeable en comparaison du foie [141, 142]. Sous diète HC, on assiste alors à l'apparition d'une hypercholestérolémie chez ces animaux, les lipoprotéines à apoB s'accumulant [139, 140]. L'analyse des lésions athérosclérotiques chez ces animaux

démontre le développement d'une surface de lésion comparable entre le modèle classique rLDL^{-/-} et le modèle induit par PCSK9^{D377Y}, avec une surface s'étendant de 35 et 40% de la racine aortique respectivement [139]. La vitesse d'induction de cette hypercholestérolémie et du développement de l'athérosclérose est similaire à ce qui a été précédemment observé chez les souris rLDL^{-/-} ou encore le modèle *ApoE*^{-/-} [139, 140].

1.4.6. Limites

L'utilisation de modèles de souris dans la recherche sur le développement et le traitement de l'athérosclérose chez l'homme comportent des désavantages non négligeables [120]. Certains modèles en particulier, comme le modèle *ApoE*^{-/-}, ont des désavantages qui doivent être considérés, particulièrement lors de l'analyse de résultats obtenus chez ces souris [120]. L'inactivation de l'*ApoE* n'a pas seulement un effet sur le métabolisme des lipoprotéines, mais également sur la fonction immunitaire. *ApoE* jouerait également un rôle au niveau des macrophages et des tissus adipeux [143].

De façon plus globale, d'autres limitations doivent être considérées lors d'une étude d'athérosclérose sur un modèle murin. Le premier point relève du profil lipoprotéique de la souris. Ses concentrations en cholestérol total sont peu élevées. Les lipoprotéines dénombrées dans leur plasma sont à majorité HDL. La prise en charge de son cholestérol diffère également de l'humain, ces animaux n'exprimant pas la CETP. De plus, les lésions athérosclérotiques qui peuvent être quantifiées chez la souris démontrent un patron d'accumulation différent de l'humain. On retrouve ces lésions principalement dans la racine aortique, le sinus aortique, l'aorte et les artères carotidiennes (innominée). Quelques petites lésions peuvent également être répertoriées dans les artères coronaires. La chronologie du développement de ces lésions est également à prendre en compte. En effet, ces animaux développent une athérosclérose de façon précoce, en conditions favorables, alors que le développement de cette condition s'observe sur quelques décennies chez l'homme. Il s'agit là d'un autre facteur à considérer et qui est difficilement comparable entre ces deux espèces.

2. Adénylates cyclases

Les adénylates cyclases (AC) ont été découvertes à la fin des années 1950. À l'époque, Earl Wilbur Sutherland a isolé un composé inconnu, l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), et a déterminé qu'il jouait un rôle intermédiaire dans la fonction des hormones; un rôle de second messenger [144, 145]. Il a étudié le mécanisme par lequel adrénaline régula la dégradation du glycogène en glucose, dans le foie [144, 145]. L'étude plus approfondie du mécanisme de phosphorylation a démontré que la formation de la phosphorylase était dépendante d'un facteur inconnu [144, 145]. Ce facteur s'est révélé être l'AMPc, et qu'il se retrouvait dans de nombreux organes [144, 145]. Cette étude lui a permis de déterminer que l'adrénaline activait une phosphorylase, par l'intermédiaire de laquelle le glycogène pouvait se dégrader en glucose [144, 145]. La découverte de ce second messenger a mené à la compréhension de son mécanisme, et donc à la découverte des adénylates cyclases, qui permettent leur formation [144, 145].

Les adénylates cyclases sont des enzymes transmembranaires exprimées dans de nombreux types cellulaires [146]. L'activité catalytique de ces enzymes permet de produire de l'AMPc à partir de l'hydrolyse de l'ATP [146, 147]. Un premier messenger, généralement une hormone comme adrénaline, se lie à son récepteur à la surface cellulaire [146]. Ces récepteurs membranaires sont couplés des protéines G trimériques (GPCR) [148]. L'activation de ces récepteurs entraîne l'activation des GPCR couplés aux GTPases trimériques inhibitrices ($G\alpha_i$) ou stimulatrices ($G\alpha_s$), selon le récepteur concerné [146, 148]. Les GPCR régulent alors l'activité de l'adénylate cyclase, permettant finalement la formation de l'AMPc à partir de l'ATP [146].

Chez les mammifères, dix (10) AC sont connues [149, 150]. Neuf (AC1 à AC9) de ces dix sont transmembranaires [151, 152] tandis que l'AC10 est sous forme cytosolique [152]. On les retrouve dans de nombreux compartiments physiologiques. Dans le cœur, toutes les isoformes s'y retrouvent, à l'exception de l'adénylate cyclase de type 8 (AC8) [153-155]. La présence des adénylates cyclases de type 5 et 6 (AC5 et AC6) a été bien caractérisée dans les cardiomyocytes [152, 156-158]. Dans le système nerveux, les niveaux d'expression des

différentes AC sont variables en fonction de la région du cerveau étudiée [146]. AC1 [159], de même que AC8 ont été bien répertoriées [152, 160], de même qu'AC7 [161]. L'expression des isoformes 2, 4, 6, 7 et 9 ont quant à elles été détectées au niveau des cellules musculaires lisses et des muscles squelettiques [158, 162]. Le système digestif comprend de nombreux organes. Ces différents organes expriment donc différents niveaux d'AC, selon leur compartiment [163]. Au niveau du pancréas, AC6 est exprimée en majorité, alors que la fonction hépatique est plutôt régulée par un nombre variable d'AC [163]. AC7 est majoritairement exprimée dans le système immunitaire, particulièrement dans les lymphocytes (B et T), de même que dans les macrophages [151, 152]. L'expression d'AC3 est principalement détectée au niveau de l'épithélium nasal, l'isoforme jouant un rôle primordial au niveau de la détection des odeurs et des phéromones dans le bulbe olfactif [164]. Finalement, l'expression d'AC10 est encore peu étudiée. Néanmoins, il a été possible de détecter cette dernière dans des lignées murines. AC10 est exprimée au niveau du système reproducteur, mais plus particulièrement par les spermatozoïdes, où une inactivation de l'enzyme conduit à un défaut de motricité des gamètes et, par conséquent, à l'infertilité [165, 166].

Les adénylates cyclases ont des séquences qui sont comprises entre 1080 et 1353 acides aminés [152]. Structurellement, elles sont composées d'un domaine N-terminal, de deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2), chacun comprenant 6 hélices alpha hydrophobes et deux domaines cytosolique (C1 et C2) [152, 163]. Ces derniers se subdivisent en domaines catalytiques (C1a et C2a) et en domaines régulateurs (C1b et C2b) [152, 163]. Les domaines catalytiques C1a et C2b, qui constituent le cœur catalytique, sont particulièrement bien conservés dans l'ensemble des mammifères [152, 163].

2.1. Classification des adénylates cyclases

Les adénylates cyclases sont classifiées en fonction de leur mode de régulation par les voies de signalisation intracellulaire [148]. Les neuf AC membranaires sont classifiées en fonction de la régulation par la signalisation intracellulaire [148]. Ainsi, l'activité d'AC1, AC3 et AC8 est activée par le Ca^{2+} , de même qu'indirectement par CaM. Ces isoformes font parties du groupe I. Les AC5 et AC6, du groupe III, sont inhibés par le calcium. Le Ca^{2+} seul n'a cependant pas d'effet sur l'activité d'AC2, AC4, AC7 (groupe II) et AC9 (groupe IV) [148]. Les AC5 et AC6 sont inhibées par le Ca^{2+} indépendamment de la CaM [148].

La régulation de leur activité par les protéines kinase C (PKC) fait moins l'unanimité [148]. Les études proposant l'activation ou l'inhibition de ces dernières par les PKC se contredisent parfois. Les PKC ont ainsi un effet activateur quant à l'activité d'AC2, AC3, AC5 et AC7 [148]. L'activité enzymatique d'AC6 et AC9 est, quant à elle, inhibée par les PKC [148].

2.2. Signalisation des AC

Les AC sont modulés par les GPCR, par exemple les récepteurs β -adrénergique 2 (β 2AR) [147]. Ce couplage permet l'activation des EPAC (EPAC pour *exchange protein directly activated by cAMP*), qui sont des GEF (GEF pour *guanine exchange factors*) et qui sont régulées par l'AMPc. Elles permettent le contrôle de l'activité des GTPases [167]. Elles se retrouvent sous deux isoformes [167]. Le rôle des EPAC résiderait dans les fonctions cellulaires associées à l'AMPc, telles que l'adhésion cellulaire [167]. Les EPAC sont impliquées notamment au niveau du cœur. Les protéines kinases de type A (PKA), quant à elles, sont également impliquées dans l'activation de GTPases. Leur activation permet d'augmenter la probabilité d'une ouverture des canaux porteurs de courant calciques de type L (ICaL). Cette phosphorylation permet la modulation des myofilaments par le relâchement de calcium, de sorte à entraîner une contraction. C'est l'effet inotrope [168]. Les EPAC sont

également impliquées dans un effet chronotrope du cœur. En effet, les EPAC peuvent moduler les concentrations de calcium retrouvées dans l'organe, de façon spontanée. Cette fluctuation peut entraîner une augmentation du rythme cardiaque [168]. Enfin, les EPAC sont également impliqués dans la régulation des cellules musculaires lisses. Les EPAC permettraient l'induction d'une vasorelaxation. Cette vasorelaxation est cependant induite de façon indirecte par la régulation des canaux potassiques sensibles au calcium [168]. Les protéines kinases de type A (PKA) sont une deuxième famille de protéine associée aux AMPc.

2.3. Adénylate cyclase de type 9 (AC9)

L'adénylate cyclase de type 9 (AC9) a été isolée à partir d'une lignée cellulaire d'hypophyse de souris [169], dans un premier temps, mais également du cerveau [170]. Au niveau chromosomique, l'AC9 humaine (ADCY9), de même que celle murine se retrouvent sur le 16^e chromosome [147, 171]. Chez l'homme, sa distribution dans les tissus est variée. L'isolement de l'ARN messager (ARNm) a néanmoins permis de déterminer qu'on la retrouve majoritairement au niveau des muscles squelettiques et cardiaques, de même que dans le pancréas et le cerveau [164]. Les poumons, les reins et le foie expriment également l'ARNm, bien qu'à des niveaux inférieurs [164]. Les AC9 chez l'humain et la souris présentent un degré de conservation de 97% de la séquence protéique [172].

2.3.1. Signalisation

L'activité d'AC9 est régulée par les protéines $G\alpha_i$ ou $G\alpha_s$ suite à l'activation des GPCR [172]. Ainsi, l'activité d'AC9 peut notamment être modifiée par l'activation des protéines $G\alpha_i$ couplées aux récepteurs de la dopamine (D_{2L}) [173]. Cette activation diminue l'accumulation du second messenger et inhibe l'activité d'AC9 [173].

Tel que stipulé précédemment dans la section 2.1, l'activité d'AC9 est également stimulée par l'action du complexe Ca^{2+}/CaM , et inhibée par les PKC. Cependant, l'activité d'AC9 est également inhibée par l'action de la phosphatase calcineurine, qui est sensible au calcium [174].

2.3.2. Rôle physiologique

Les β 2AR sont l'une des principales cibles thérapeutiques dans le traitement de l'asthme [147, 175]. Tel que mentionné précédemment, les AC, comme AC9, agissent en aval des β 2AR et sont impliqués dans la régulation des voies respiratoires au niveau des muscles lisses. Or, les bronchodilatateurs sont largement prescrits pour permettre le contrôle de cette affection et ce sont des agonistes des β 2AR [147]. Les β 2AR sont activés par des molécules agonistes comme l'albutérol [175]. L'activation des β 2AR entraîne une activation successive des GTPases activatrices ($G\alpha_s$), puis de l'adénylate cyclase de type 9 [175]. Cette dernière entraîne alors la conversion de l'ATP en AMPc, de sorte à activer les PKA [175]. Ces protéines phosphorylent alors les protéines associées aux muscles des voies respiratoires, tel que MLCK (pour *myosin light-chain kinase*) [176], entraînant la relaxation des muscles des voies respiratoires, et donc une bronchodilatation [175]. Or, la variété des polymorphismes codants d'ADCY9 a été démontrée pour influencer la réponse thérapeutique des β 2AR à ses agonistes [147]. En effet, l'un de ces polymorphismes codants est notamment connu pour exprimer une meilleure réponse envers les agonistes β -adrénergiques dans le traitement pour l'asthme [175]. Cette démonstration a permis de montrer l'implication d'AC9 dans la réponse physiologique quant à l'activation des récepteurs β -adrénergiques.

AC9 a également un rôle dans le chimiotactisme des neutrophiles, soit la régulation de la migration des neutrophiles en réponse à un chimioattractant [177]. En effet, l'expression d'AC9 permet la polarisation du réseau de filaments d'actine et de myosine [177], deux protéines essentielles dans la contraction musculaire, mais également dans les processus de motilité des cellules inflammatoires [178]. Cette régulation dans la migration a été déterminée par l'utilisation de cellules pluripotentes différenciée en neutrophiles-like, qui ont été transfectés avec un shRNA (pour « short hairpin RNA ») pour inactiver AC9 [177]. En présence d'un chimioattractant, leur capacité de migration a été évaluée. Or, en l'absence d'expression d'AC9, le front de migration de ces cellules se voit fortement inhibé [177]. Ces observations ont ainsi permis de déterminer que l'activité d'AC9 est nécessaire à la migration des neutrophiles [177].

Dans le cœur, AC9 est exprimée dans les cardiomyocytes murins isolés [179]. La protéine forme un complexe avec une protéine d'ancrage des PKA (AKAP), Yotiao [180]. Dans le cœur de souris, AC9 est la seule adénylate cyclase à être associée avec Yotiao [180]. Cette dernière est une importante protéine d'ancrage jouant un rôle déterminant dans la régulation et l'acheminement de l'AMPc aux PKA [179, 180]. Ce complexe est associé à la repolarisation cardiaque, par l'intermédiaire des canaux ioniques de potassium (I_{Ks}) [179, 180]. Les canaux I_{Ks} sont composés de deux sous-unités- α KCNQ1 et de deux sous-unités- β KCNE1 [180]. La phosphorylation des KCNQ1 par les PKA augmente le courant I_{Ks} pour accélérer la repolarisation [179, 180]. La phosphorylation de KCNQ1 est dépendante de l'association des PKA avec Yotiao [179, 180]. Les souris *Adcy9^{Gt/Gt}* présentaient une diminution importante de leur fréquence cardiaque [180].

Enfin, toujours dans le cœur, AC9 est également associée à la protection cardiovasculaire [180]. Il a été démontré que l'inactivation d'AC9 entraînait une diminution dans la phosphorylation de la Hsp20 (pour *heat-shock protein 20*) dépendante des PKA [181]. Or, la phosphorylation de la Hsp20 a des effets cardioprotecteurs associés à une inhibition de l'hypertrophie cardiaque et de l'apoptose des cardiomyocytes [182]. De plus, l'inactivation de l'expression d'AC9 a également des conséquences quant à la fonction diastolique. En effet, l'absence de l'adénylate cyclase entraîne une dysfonction diastolique du ventricule gauche, chez la souris [180].

Ainsi, outre son implication à ces niveaux, on en connaît encore relativement peu quant au rôle physiologique d'ADCY9, particulièrement chez l'homme.

3. Études cliniques

3.1. Dal-OUTCOMES

Les HDL possèdent une action cardiovasculaire protectrice démontrée à maintes reprises dans la littérature, notamment quant au stress oxydatif et à son rôle dans le TIC [183]. Ces effets protecteurs sont la cible d'une classe de molécule développée pour traiter les risques de récurrences post-infarctus par l'inhibition de la CETP [117, 184]. L'inhibition de la CETP permet l'augmentation du HDL-C [117]. Le dalcetrapib est un inhibiteur de la CETP [117, 184]. L'étude Dal-OUTCOMES est une étude clinique de phase 3 qui regroupait 15 871 patients afin d'étudier l'efficacité du dalcetrapib pour diminuer le risque cardiovasculaire chez des patients atteints d'un syndrome coronarien aigu [184]. Malgré une augmentation de 30% des HDL-C en réponse au dalcetrapib [184], les patients traités ne présentaient aucun effet bénéfique significatif [184]. Or, cette étude fait partie des nombreuses qui ont été réalisées afin de cibler les effets protecteurs des HDL et dont les résultats se sont avérés décevants [184, 185]. En effet, malgré les effets positifs sur l'élévation des biomarqueurs lipidiques, aucune différence significative n'a été observée quant à une différence des événements cardiovasculaires. Ces recherches relevaient de l'étude de molécules ciblant l'inhibition de la CETP, tout comme le dalcetrapib, telles que l'evacetrapib [186] et le torcetrapib [187]. L'ensemble de ces résultats amenaient à remettre en question les effets cardioprotecteurs des HDL [184]. Il a été suggéré que ces résultats pourraient plutôt dépendre de la génétique des patients [184].

3.2. L'étude d'association pangénomique (GWAS)

Ainsi, suite aux résultats obtenus dans Dal-OUTCOMES, une étude d'association pangénomique (GWAS) a été réalisée afin de déterminer si les effets associés au dalcetrapib étaient dépendants de la génétique des patients [184, 185]. L'étude a permis de déterminer que le dalcetrapib a un effet clinique dépendant de l'expression de plusieurs variants, localisés dans un bloc de déséquilibre de liaison, associé au gène ADCY9 [184, 185]. L'étude Dal-PLAQUE-2, où une étude de l'épaisseur de l'intima a été réalisée, a également permis de confirmer l'implication du locus d'ADCY9 dans la modulation des risques cardiovasculaires chez les patients traités au dalcetrapib. Ainsi, trois génotypes pour le SNP rs1967309 sont possibles :

AA, GG ou AG [185]. Les individus de génotype AA, lorsque traités au dalcetrapib, se voyaient protégés, une réduction de près de 39% des événements cardiovasculaires étant observés par rapport au placebo [185]. Les patients porteurs du génotype GG, quant à eux, voyaient une augmentation de 27% des événements cardiovasculaires, attestant d'un effet délétère du variant G en association avec le dalcetrapib [185]. La CRP (pour *C-reactive protein*) a également été évaluée tout au long de cette étude [185]. Cette protéine est un biomarqueur d'inflammation [188], qui peut inhiber l'efflux de cholestérol [188]. Ainsi, les patients porteurs du génotype GG présentaient une augmentation de près de 18% de leur concentration en CRP, par rapport aux valeurs au début du traitement, alors qu'une diminution était plutôt observée chez les patients AA [185]. L'efflux de cholestérol a également été étudié, étant donné que le transport inverse du cholestérol, et sa première étape l'efflux de cholestérol depuis les macrophages vers les HDL-C, sont connus pour protéger contre l'athérosclérose [184, 185]. De plus, considérant l'association de l'efflux de cholestérol et de la CRP, cette observation était d'autant plus pertinente. Ainsi, les patients avec le génotype AA présentaient une augmentation de leur capacité globale d'efflux de cholestérol, lorsque comparés à un traitement placebo [185]. Au contraire, la capacité d'efflux de cholestérol provenant de patients du groupe GG, et traités au dalcetrapib, était similaire au placebo [185]. Les effets cliniques favorables du dalcetrapib chez les patients avec le génotype AA, sont donc être associés à une meilleure capacité d'efflux de cholestérol.

Objectifs du mémoire

Le dalcetrapib est une molécule pharmacologique ciblant l'inhibition de la CETP afin d'augmenter les niveaux de cholestérol dans les HDL. Chez l'homme, des études ont permis de déterminer que l'effet clinique du dalcetrapib était dépendant des gènes des patients, et plus particulièrement de variants du gène ADCY9. Une perte de poids de ces patients a par exemple été observée lorsqu'ils étaient traités, et cette perte était dépendante du génotype du gène (G homozygote pour rs1967309). Ce sont ces effets observés chez les patients traités au dalcetrapib, où une interaction entre l'activité CETP et l'expression d'ADCY9, qui ont motivés cette étude. Peu d'informations sont encore connues quant au rôle physiologique d'AC9, bien que son implication dans la migration des cellules immunitaires, de même qu'au niveau de la réponse bêta-adrénergique ait été démontrée. Nous savons également qu'elle est exprimée dans de nombreux organes, dont le cœur. Le dalcetrapib étant une molécule ciblant les patients souffrant d'athérosclérose, nous avons décidé de développer un modèle animal afin d'étudier le rôle d'ADCY9 dans l'athérosclérose.

Nous avons développé un modèle de souris athérosclérotique inactivée pour le gène *Adcy9*. L'athérosclérose était développée en induisant une hypercholestérolémie chez des souris infectées avec AAV8-*Pcsk9*^{D377Y}.

Notre objectif était d'étudier l'effet de l'inactivation d'*Adcy9* sur le développement de l'athérosclérose chez la souris en l'absence ou en présence de l'expression de la CETP. De plus, nous nous sommes également intéressés aux mécanismes impliqués dans le développement de l'athérosclérose.

Notre hypothèse est que l'expression d'*Adcy9* régule le développement de l'athérosclérose.

Article

Contribution de l'étudiant

L'article qui suit comprend une grande partie de mes travaux de maîtrise. J'ai contribué à l'élaboration de l'étude et à sa mise en place dès le début de ma maîtrise. J'ai réalisé la majorité des mises au point et l'élaboration des méthodologies quant à la validation du modèle murin pour le développement de l'athérosclérose. Ces travaux comprennent la validation de l'inactivation d'*Adcy9* par RT-qPCR. J'ai également effectué les dosages du cholestérol, des concentrations en PCSK9 et les quantifications des niveaux d'expression protéique des récepteurs LDL. De plus, j'ai également réalisé la quantification des lésions athérosclérotiques observées chez nos animaux.

Au niveau des manipulations qui ont été effectuées dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'athéroprotection de l'inactivation d'*Adcy9*, j'ai contribué à l'étude sur l'expression de *d'Adcy9* et au travail sur les mécanismes vasculaires et inflammatoires impliqués sur les effets d'*Adcy9* sur l'athérosclérose. Enfin, j'ai contribué à la rédaction de l'article en participant à l'élaboration des figures et à l'écriture du texte.

Soumission de l'article à *Circulation* le 11 août 2017.

Interactions between adenylate cyclase type 9 (ADCY9) and cholesteryl ester transfer protein (CETP) in atherosclerosis

Yohann Rautureau, Vanessa Deschambault, Marie-Ève Higgins, Mélanie Mecteau, Géraldine Miquel, Daniel Rivas, Kurunradeth Uy, Pascale Geoffroy, Pierre-Marc-Williams, Maria Laura Suarez, Geneviève Brand, Line Lapointe, Marc-Antoine Gillis, Samaneh Samami, Gaétan Mayer, Philippe Pouliot, Adeline Raignault, Marie-Pierre Dubé, Éric Thorin, David Rhains, Éric Rhéaume, Jean-Claude Tardif*.

Montreal Heart Institute, Université de Montréal, Montreal, Canada

*Corresponding author:

Dr. Jean-Claude Tardif, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada.

Abstract

BACKGROUND: Pharmacogenomic studies have shown that *ADCY9* genotype determines the effects of the cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitor dalcetrapib on cardiovascular events and atherosclerosis imaging. The underlying mechanisms responsible for the interactions between *ADCY9* and CETP have not yet been determined. **METHODS:** *Adcy9*-inactivated (*Adcy9*^{Gt/Gt}) and wild-type (WT) mice, that were or not transgenic for the CETP gene (CETP^{Gt} and CETP^{WT}), were submitted to an atherogenic protocol (injection of an AAV8 expressing a PCSK9 gain-of-function variant and 0.75% cholesterol diet for 16 weeks). Atherosclerosis, vasorelaxation, telemetry and adipose tissue MRI were evaluated. **RESULTS:** *Adcy9*^{Gt/Gt} mice had a 65% reduction in aortic atherosclerosis compared to WT ($P<0.01$). CD68-positive macrophage accumulation and proliferation in plaques were reduced in *Adcy9*^{Gt/Gt} mice compared to WT animals ($P<0.05$ for both). Femoral artery endothelial-dependent vasorelaxation was improved in *Adcy9*^{Gt/Gt} mice (versus WT, $P<0.01$). Selective pharmacological blockade showed that the nitric oxide, cyclooxygenase and endothelial-dependent hyperpolarization pathways were all responsible for the improvement of vasodilatation in *Adcy9*^{Gt/Gt} ($P<0.01$ for all). *Adcy9*^{Gt/Gt} mice gained more weight than WT with the atherogenic diet, and this was associated with an increase in whole body adipose tissue volume ($P<0.05$ for both). Feed efficiency was increased in *Adcy9*^{Gt/Gt} compared to WT mice ($P<0.05$), which was accompanied by prolonged cardiac RR interval ($P=0.05$) and improved nocturnal heart rate variability ($P<0.05$). *Adcy9* inactivation-induced effects were lost in CETP^{Gt} mice ($P=NS$ versus CETP^{WT}). **CONCLUSIONS:** *Adcy9* inactivation protects against atherosclerosis, but only in the absence of CETP activity. This atheroprotection may be explained by decreased macrophage accumulation and proliferation in the arterial wall, improved endothelial function and altered autonomic nervous system activity.

Keyword: Atherosclerosis, adenylyl cyclase, *Adcy9*, AC9, CETP, mice

1. Introduction

High-density lipoproteins (HDL) have multiple potentially protective cardiovascular effects, including those on reverse cholesterol transport, endothelial function and inflammation.¹ Cholesteryl ester transfer protein (CETP) mediates the exchange of cholesteryl esters from HDL to ApoB-containing lipoproteins. CETP inhibitors have yielded variable results in large clinical trials, which include the recent report from the REVEAL study.²⁻⁶ The pharmacogenomic analysis of the dal-Outcomes trial showed that patients with the AA genotype at rs1967309 in the *ADCY9* gene benefited from a 39% reduction in cardiovascular events when treated with dalcetrapib compared to placebo, and these results were supported by atherosclerosis regression on imaging.⁶ Furthermore, patients bearing the protective *ADCY9* genotype had a large increase in cholesterol efflux when treated with dalcetrapib and no increase in the inflammation biomarker C-reactive protein, the latter in contrast to results obtained with all CETP inhibitors when administered to unselected populations.⁷ The significant *ADCY9* gene-by-treatment arm interaction and the lack of *ADCY9* genotype-dependent effect in the placebo group suggest a pharmacogenomic effect. The underlying mechanisms responsible for the interaction between *ADCY9* and CETP have not yet been determined. The opposing genotype-dependent differences in body weight and atherosclerosis-related outcomes in dalcetrapib clinical trials, along with the role of *ADCY9* in adrenergic signal transduction,⁸ suggest that the autonomic nervous system might be involved in the observed effects. *ADCY9* encodes adenylate cyclase type 9, an enzyme producing the ubiquitous second messenger cyclic AMP. Therefore, in this investigation we studied the effects of *ADCY9* inactivation on atherosclerosis and related processes in the absence or presence of CETP in mice.

2. Methods

Animals

Adcy9 gene-trapped (*Adcy9*^{Gt/Gt}) mice were generated initially from Lexicon Pharmaceuticals.⁹ Cryo-preserved sperm from the B6;129S5-*Adcy9*^{Gt(neo)¹⁵⁹Lex}/Mmucd strain was imported from the Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC) and used for *in vitro* fertilization and oviduct transfer at the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) animal facility in a specific-pathogen-free area and their breeding and reproduction was approved by the University de Montréal Deontology Committee on Animal Experimentation. MaxBax accelerated backcrossing and genotyping (Charles River, Sherbrooke, Canada) was performed to achieve >98.6% C57BL/6J genetic background. Procedures involving mice were performed at the Montreal Heart Institute (MHI) Research Center and approved by the local ethics committee for animal research in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. *Adcy9*^{Gt/Gt} mice were bred by mating *Adcy9*^{WT/Gt} animals. Mice hemizygous for transgenic human CETP minigene¹⁰ (CETP^{WT}) were obtained from Jackson laboratory (Bar Harbor, ME) and were on 100% C57BL/6J genetic background. To obtain mice that were transgenic for CETP and with homozygous inactivation for *Adcy9* (CETP^{Gt}), CETP^{WT} mice were first crossed with *Adcy9*^{WT/Gt} animals, then mice transgenic for CETP and heterozygote for *Adcy9*^{WT/Gt} were crossed with *Adcy9*^{Gt/Gt} or *Adcy9*^{WT/Gt} animals. All mice were under a C57BL/6J background, males and aged from 8 to 12 weeks. Blood collection was performed after 4 hours of fasting.

Atherosclerosis Model

Wild-type (WT) and *Adcy9*^{Gt/Gt} male mice (8 to 12-week-old) were injected with a single dose of an AAV8 viral vector expressing gain-of-function *Pcsk9*^{D377Y} (AAV8-*Pcsk9*^{D377Y}, 6.5x10¹¹ gene copies) as previously described.¹¹ A control group was injected with a saline solution in preliminary experiments to confirm the effect of the AAV8-*Pcsk9*^{D377Y} infection on LDL receptor expression. Starting one week after AAV8-*Pcsk9*^{D377Y} injection, mice were fed for 16 weeks with a chow-based (Purina 5015) atherogenic diet (TD,

150545, Envigo, Madison, WI) enriched with 0.75% cholesterol and having the following caloric composition: proteins 20.4%, carbohydrates 42.7% and fats 36.9% (3.9 kcal/g). Food and water were available *ad libitum*. After the sacrifice, atherosclerosis development was investigated in the whole aorta, aortic root and brachiocephalic artery by an experienced observer blinded to the mouse genotype.

Quantification of *Adcy9* mRNA Expression by Reverse Transcription-Quantitative PCR (RT-qPCR)

Mice total RNA were extracted from heart ventricles using RNeasy isolation kit (QIAGEN, Toronto, ON, Canada) with DNase I procedure according to the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized with components from High-Capacity cDNA Reverse transcription Kits without inhibitor (Applied Biosystems #4368814, Foster City, CA) and with the use of MultiScribe™ Reverse Transcriptase, according to the manufacturer's procedures. RNA quantification and quality were assessed using Agilent RNA 6000 Nano Kit for Bioanalyzer 2100 System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Primers for *Adcy9* were designed using the Beacon designer software v.8 (Premier Biosoft) and obtained from IDT (Coralville, IA). *Gapdh* was used as the reference gene for normalization. The quantitative PCR (qPCR) was performed with SYBR-Green reaction mix (BioRad, Hercules, CA). The qPCR conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 3 minutes followed with 40 cycles of amplification, each cycle consisting of 95°C for 10 seconds and 60°C for 30 seconds.

Western-Blotting

Tissues from WT and *Adcy9*^{Gt/Gt} mice were lysed with TissueLyser II (QIAGEN) in buffer containing (in mM) Tris Base 50, NaCl 125, EDTA 0.1, EGTA 0.1, sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.1%, sodium deoxycholate 0.5%, IGEPAL 1% protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, P2714), on ice. The protein concentration was assessed by Lowry assay. Proteins were loaded and migrated in SDS-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) for 90 minutes at 100V. Proteins in gel were then transferred overnight on a polyvinylidene difluoride (PVDF, BioRad) membrane. Membranes were blocked using TBST 5% non-fat

dried milk (NFDM). For detection of low-density lipoprotein receptor (LDLR) in livers from mice infected with AAV8-*Pcsk9*^{D377Y} or control mice injected with saline, the membranes were then incubated with a goat primary antibody targeting mouse LDL receptor (Novus Biologicals, AF2255, Littleton, CO) at 1/5000 dilution, in TBST 1% NFDM at 4°C overnight. A rabbit secondary anti-goat antibody (Abcam, ab6741, Cambridge, MA) was incubated at 1/5000 for 60 minutes at room temperature in TBST 3% BSA. For detection of adenylate cyclase type 9 protein (AC9) in dorsal skeletal muscle, antiserum against AC9 was produced by immunizing rats (Thermo Fisher Scientific) with C-terminal mouse AC9 peptide 1313-REPVKAEERFPFGKAIEKD-1331 (NP_033754.2) conjugated with KLH. Membranes were incubated with rat serum diluted 1/500 in TBST and then with goat anti-rat secondary antibody (ThermoFisher, cat # 31475) diluted 1/10000 in TBST containing 3% BSA. Detection was performed using Western Lightning ECL Pro (Perkin Elmer, Waltham, MA).

Determination of Plasma Cholesterol Concentration, Lipoprotein Profile and Plasma PCSK9

Blood samples were collected in EDTA-coated tubes and plasma was separated by centrifugation (2000 x g, 10 minutes) and conserved at -80°C until analysis. Total cholesterol was quantified by colorimetric enzymatic assay (Wako Diagnostics, 999-02601, Richmond, VA) and measured at 600 nm in 96-well black microplates with flat bottom according to a micro-method used in our laboratory. To determine the lipoprotein profile, blood samples were pooled from 5 mice per group and a fast protein liquid chromatography (FPLC) size fractionation on Sepharose was performed by a specialized lipidomics core facility (University of Alberta, Edmonton, AB). PCSK9 concentration in plasma was determined using an ELISA kit targeting mouse PCSK9 (Cyclex Co, #CY-8078, Japan).

***En Face* Quantification of Aortic Atherosclerotic Lesions**

Atherosclerosis lesions were quantified on whole aorta dissected *en face*. Aortas were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) overnight and then stained with a 0.7% solution of Oil Red O (Sigma-Aldrich) for 1 hour and then counterstained with Nuclear Fast Green at 0.05%

(Sigma-Aldrich, F7258) to optimize contrast. Images were captured using a Leica Microsystem (Concord, ON, Canada) stereomicroscope with digital camera (MC170 HD, Leica Microsystem). Atherosclerotic lesions were quantified from the aortic root down to the iliac artery bifurcation using Image-Pro Premier 9.2 (Media Cybernetics, Inc, Rockville, MD). Percent atherosclerotic lesion area was expressed as the percentage of the intima area presenting Oil Red O staining.

Atherosclerotic Lesion Cross-Sectional Quantification in the Aortic Root

The base of the heart was embedded in OCT compound and sliced in 10 μm sections before fixation with 10% cold formalin for five minutes and then rinsed twice with deionized water. Slides were immersed twice in 100% propylene glycol for five minutes. Aortic roots were stained with a 0.7% Oil Red O solution for 48 hours at room temperature. Afterwards, slides were successively immersed in 100% propylene glycol, 85% propylene glycol solution and deionized water baths, using agitation. Slides were counterstained with a hematoxylin solution for a few seconds, rinsed and then mounted using an aqueous medium. Atherosclerosis lesions were quantified at regular distances from the base of the aortic sinuses to 500 μm more distally in the aortic root. Images were obtained by microscope and quantified by Image-Pro Premier 9.2.

Atherosclerotic Lesion Quantification in the Brachiocephalic Artery

The presence of plaques, fibrin, red blood cells and break in the plaque cap was determined in the brachiocephalic artery. All solutions used for staining were from EMS (Hatfield, PA) except for phosphotungstic acid that was from Sigma-Aldrich. Six micrometer-thick sections (6 μm), taken from paraffin-embedded brachiocephalic artery, were stained according to the Carstairs' method with modification as described previously.¹² After rehydration, sections were incubated in 5% ferric ammonium sulfate solution for 5 minutes and rinsed with tap water. Sections were then stained with Mayer hematoxylin solution for 5 minutes and rinsed with tap water. Additional stainings were performed with picric acid orange G for 1 hour and Ponceau-fuchsin for 5 minutes before rinsing with distilled water for

each staining. Muscle tissue was differentiated from other structures with 1% phosphotungstic acid for 3 minutes before rinsing with distilled water. Final staining for collagen was performed with Anilin Blue (2.5%, 2 minutes) before dehydration clearing with xylene and mounting in Permount (Thermo Fisher Scientific, Toronto, ON, Canada). We scored the sections for presence of plaques, fibrin deposition at the surface of the plaque, and breaks in the plaque cap. To be scored positively, a mouse needed to show the feature of interest in two sections separated by 48 μm .

Immunofluorescent Detection of CD68-Positive Macrophages (foam cells) and their Proliferation in the Aortic Root

The base of the heart was embedded in OCT compound and 10 μm sections were cut with a cryostat. Slides were incubated in PBS to remove the OCT and then immersed in 4% PFA (pH 7.4) for 20 minutes. After fixation, slides were washed in PBS. Permeabilization, blocking and antibody incubation were performed in a Tris solution (in mM): Tris-base 50, NaCl 150, BSA 1%, Triton X-100 0.4% and fetal bovine serum 20% at pH 7.4. Rat antibody against CD68 was diluted 1/200 (BioRad, #MCA19557) and rabbit antibody against Ki67 was used at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Abcam, #ab15580). For determination of CD68-positive cell accumulation in the atherosclerotic lesions, CD68 was visualized using goat anti-rat antibody labeled with Alexa-647 (Thermo Fisher Scientific, # cat A-21247). For co-staining with Ki67, CD68 was visualized with goat anti-rat antibody labeled with Alexa-568 (Thermo Fisher Scientific, #A11077) and Ki67 was visualized with a goat anti-rabbit antibody labeled with Alexa-647 (Thermo Fisher Scientific, #A-27040). The nuclei were counterstained with DAPI. Images were acquired with a confocal microscope (LSM 710, Zeiss, Peabody, CA). Imaging quantifications were performed with Image-Pro Premier 9.2 from three sections of the aortic root. Accumulation of CD68-positive foam cells was quantified as percent of the total lesion area from three aortic root sections. Cells were considered positive for Ki67 if the staining colocalized with DAPI. To evaluate proliferation of CD68-positive foam cells, double positive Ki67/CD68 cells were counted.

Measurement of Vascular Tone in Isolated Aortic Rings

The thoracic aorta from untreated and atherosclerotic mice was removed and placed in ice-cold Krebs buffer with the following composition (in mM): NaCl 130, KCl 4.7, MgSO₄*7H₂O 1.18, KH₂PO₄ 1.18, CaCl₂*2H₂O 1.6, NaHCO₃ 20, glucose 5.5 and EDTA 0.03, and the pH was 7.4. The aorta was cut into 2-3 mm long aortic rings. These rings were mounted in 20 mL organ baths filled with Krebs buffer at 37°C and oxygenated (95% O₂, 5% CO₂). Their isometric tension was measured with a force displacement transducer and displayed on a computer (IOX v.1.5.7 software, EMKA Inc, Middletown, PA). Data were analyzed using Datanalyst software v.1.83.0 (EMKA Inc). Cumulative concentration-response curves were constructed to acetylcholine (ACh) or sodium nitroprusside (SNP) in phenylephrine-precontracted rings (3.10⁻⁷ to 10⁻⁶M), at a concentration yielding 80% of the maximum response obtained with KCl 80 mM. Endothelium-denuded rings were used for SNP curves. Vasorelaxation is expressed as the percentage change in the maximal tension of vessel rings after addition of phenylephrine.

Assessment of Endothelial Function in the Femoral Artery with Pressurized Arteriography

Vascular reactivity was studied in the femoral artery of untreated and atherosclerotic mice as already described.¹³ Femoral arteries, 250-350 μm in diameter, were bathed in physiological saline solution (PSS) of the following composition (mM): NaCl 130, KCl 4.7, CaCl₂ 1.6, MgSO₄ 1.17, NaHCO₃ 14.9, KH₂PO₄ 1.18, EDTA 0.026, and glucose 10.0, and pressurized to 80 mmHg. PSS was bubbled with a gas mixture containing 12% O₂, 5% CO₂ and 83% N₂. Before construction of concentration-response curves to vasodilator or shear stress, segments were precontracted with phenylephrine at a concentration from 10⁻⁶ M to 10⁻⁵ M. ACh and SNP were used for assessment of endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilatation, respectively. SNP curves were created with endothelium-denuded segments. To study the role of endothelial cell signaling, segments were incubated with the nitric oxide synthase blocker L-NNA (10⁻⁴ M, Sigma-Aldrich), the cyclooxygenase blocker

meclofenamate (10^{-6} M, Sigma-Aldrich) or a cocktail of endothelial potassium channel blockers TRAM34 (10^{-5} M, Tocris bioscience, Minneapolis, MN) and apamin (10^{-7} M, Tocris Bioscience) and the curves were constructed in presence of the blocker. Shear stress was calculated using the following equation: $t = 4\eta Q/\pi r^3$, where t is the shear stress (dyn/cm^2), η the viscosity [0.009 Poise], Q the flow rate (ml/s) through the lumen, and r the inside radius (cm). Vasodilatation is expressed as the change (%) in diameter normalized to the maximal passive diameter obtained with SNP in absence of calcium.

***In situ* Hybridization**

In situ hybridization was performed according to the manufacturer's recommended procedure (Advanced Cell diagnostic, Hayward, CA). Staining was performed on 6 μm -thick sections of paraffin-embedded femoral artery or aortic root. Sections were counterstained with hematoxylin. We observed that the signal for *Adcy9* was specific by comparing tissue sections from *Adcy9*^{Gt/Gt} and WT mice (data not shown). *Adcy9* probe was Mm-*Adcy9* targeting nucleotides 1522-2502 of NM_009624.3. Probe for the bacterial gene *dapB* was used as a negative control.

Quantification of Whole Body Adipose Tissue Volume by MRI

Whole mouse MRI was performed in the prone position on a 30 cm 7T horizontal MR scanner (Agilent, Palo Alto, CA), with a 12 cm inner diameter gradient coil insert, gradient strength 600 mT/m, rise-time 130 μs and an Agilent quadrature transmit/receive birdcage coil with an internal diameter of 38 mm. A pressure transducer for respiratory monitoring and gating (used for shimming) was placed under the abdomen near the sternum. Anesthesia was maintained with 2.0-3.0% isoflurane in pure oxygen to target a respiration rate between 80 and 120 BPM while heart rate and oxygen saturation were monitored with a pulse oximeter on the right hindpaw and body temperature was maintained at 37.0°C with a rectal probe and a warm air fan (SA Instruments, Stony Brook, NY). A 3D TFISP sequence was used to image the whole mouse (except the tail), with isotropic voxels and FOV 70x36x36 mm, matrix size 256x192x192, resolution 270x190x190 μm , an asymmetric 500 μs pulse with 30 degrees flip

angle, TR/TE=4.8/2.4 ms, 83 kHz acquisition bandwidth, 8 frequency-shifted scans reconstructed by square-root-of-sum-of-squares, for an acquisition time of 24 minutes.¹⁴ Mouse fat was manually quantified using ITK-SNAP.¹⁵

Telemetry for ECG Recording

Telemetry was used to monitor and record ECG in conscious free moving unanesthetized WT and *Adcy9^{Gt/Gt}* mice. Mice were equipped with an ECG transmitter (ETA-F10, DSI, St Paul, MN) for mice and electrodes were placed subcutaneously on the abdomen in a conventional lead II position.¹⁶ Recordings were performed continuously at 1 KHz per channel with IOX (version 2.8.0.17, EMKA Inc) 10 days post-surgery. ECGs were analyzed for heart rate variability (HRV) according to the guide by Thireau *et al.*,¹⁷ and with the software ECG Auto (version v3.3.0.25, EMKA Inc). Periods containing 1500 beats for day time (6 AM to 6 PM) and night time (6 PM to 6 AM) were analyzed. Data were analyzed to extract the time domain parameters RR interval and pNN(6), the latter representing the percentage of RR intervals exceeding preceding ones by 6 ms or more and reflects parasympathetic nervous system activity.¹⁷

Body Weight Measurement and Feed Efficiency

Body weight was measured every week from the week of infection with AAV8-*Pcsk9^{D377Y}* and for a total of 16 weeks. Feed efficiency, the ratio of the weight gain to the caloric intake (g/100kcal), was calculated for a total of 8 weeks during the atherogenic diet.

Statistical Analysis

Descriptive statistics for continuous variables were presented using the mean and standard error of the mean. For continuous variables assessed at a single time point, groups of mice were compared using Student t-tests, analysis of variance (ANOVA) models or Kruskal-Wallis non parametric tests depending on the distribution of the variables. Categorical variables were compared across groups using Fisher exact tests. For variables assessed at different time points or under various conditions within mice, two-way or three-way repeated

measures ANOVA models were used. These models included within and between factors, as well as the corresponding interaction terms. Basic assumptions were always checked prior to analysis. All tests were conducted at the 0.05 significance level with SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3. Results

Adcy9 Inactivation Protects Against Atherosclerosis

First, we characterized the effect of the *Adcy9*^{Gt} modified target locus on *Adcy9* expression in *Adcy9*^{Gt/Gt} mice. Using RT-qPCR, we demonstrated that *Adcy9* mRNA expression in the heart was decreased by 50% in *Adcy9*^{WT/Gt} mice and by at least 90% in *Adcy9*^{Gt/Gt} mice compared to WT (Suppl. Figure 1A). In the skeletal muscle, where the ADCY9 gene has been reported to be highly expressed,^{18,19} we observed that protein expression was abolished in *Adcy9*^{Gt/Gt} mice compared to WT (Suppl. Figure 1A). Then, we infected WT and *Adcy9*^{Gt/Gt} mice with AAV8-*Pcsk9*^{D377Y} to induce hypercholesterolemia. One week after infection and before the start of the atherogenic diet, plasma PCSK9 concentration was markedly increased from 0.1 µg/mL to 17.9±3.5 µg/mL in WT and 26.6±7.5 µg/mL in *Adcy9*^{Gt/Gt} mice. PCSK9 concentrations increased to 71.0±19.1 µg/mL in WT and 90.8±20.1 µg/mL in *Adcy9*^{Gt/Gt} mice after 8 weeks of atherogenic diet, where they stayed almost stable at 12 weeks (Suppl. Figure 1B). PCSK9^{D377Y} induced a reduction of 90% in hepatic LDL receptor expression that was similar in WT and *Adcy9*^{Gt/Gt} (Suppl. Figure 1C). Plasma cholesterol levels rose from 3.8±0.3 mM in WT and 4.9±0.2 mM in *Adcy9*^{Gt/Gt} to 44.5±6.7 mM and 42.4±5.1 mM ($P=NS$) at 16 weeks (Suppl. Figure 1D). Visualization of lipoprotein profile by chromatography showed that WT and *Adcy9*^{Gt/Gt} mice had a similar profile rich in HDL at baseline. PCSK9^{D377Y} and the hypercholesterolemic diet induced an atherogenic redistribution of cholesterol out of HDL particles and into VLDL and LDL particles in both types of mice (Suppl. Figure 2).

At sacrifice, aortas showed 11.3±2.1% of the surface of the intima covered with atherosclerotic lesions in WT mice compared to 3.8±0.6% in *Adcy9*^{Gt/Gt} mice ($P<0.01$, Figure 1A), a reduction of 65%. Cross-sectional quantification showed a numerical reduction of plaque area all along the aortic root by *Adcy9* inactivation ($P=0.07$ at 500 µm, Figure 1B). Brachiocephalic arteries are the site in mice where plaques are more complex and prone to rupture,²⁰ Figure 1C shows that all WT animals had plaques in the brachiocephalic arteries in contrast to *Adcy9*^{Gt/Gt} mice (100%, versus 50%, $P<0.05$). The plaques in WT mice also

presented more frequently fibrin deposits at their surface ($P=0.06$) and cap ruptures compared to *Adcy9^{Gt/Gt}* mice (Figure 1C).

***Adcy9* Inactivation Reduces CD68-Positive Macrophage (foam cell) Accumulation and their Proliferation in Atherosclerotic Lesions**

CD68-positive foam cells, a key constituent of atherosclerotic plaques, represented $19.0\pm 1.9\%$ and $11.4\pm 2.1\%$ of the lesion area in WT and *Adcy9^{Gt/Gt}* mice, respectively ($P<0.05$, Figure 2A). In addition, *in situ* hybridization showed *Adcy9* expression in atherosclerotic lesions at sites of foam cell accumulation (Figure 2B). Immunofluorescence detection of Ki67 revealed that proliferation of CD68-positive foam cells was significantly decreased in *Adcy9^{Gt/Gt}* compared to WT ($P<0.05$, Figure 2C).

***Adcy9* Inactivation Potentiates Endothelial Function**

Endothelial-dependent vasodilatation to ACh in untreated animals (no AAV8-*Pcsk9^{D377Y}* and no atherogenic diet) was potentiated in the femoral arteries of *Adcy9^{Gt/Gt}* mice compared to WT ($P<0.01$, Figure 3A); in contrast, endothelial-independent vasodilatation to the nitric oxide donor SNP was similar in both groups (Figure 3A). *Adcy9* inactivation also potentiated endothelial-dependent vasodilatation in response to increased shear stress (10 dynes/cm^2) compared to WT ($42.3\pm 7.1\%$ versus $28.2\pm 6.3\%$, $P=0.13$, Figure 3B). There was no difference detected between untreated mice (no AAV8-*Pcsk9^{D377Y}* and no atherogenic diet) when the aorta was evaluated (data not shown). In femoral arteries from atherosclerotic animals (AAV8-*Pcsk9^{D377Y}* and atherogenic diet), both endothelial-dependent (ACh-induced) and endothelial-independent vasodilatation were increased in *Adcy9^{Gt/Gt}* mice compared to WT ($P<0.05$, Figure 3C). Similar numerical benefits were observed in the aorta of animals treated with the AAV8-*Pcsk9^{D377Y}* and atherogenic diet when comparing *Adcy9^{Gt/Gt}* to WT mice ($P=NS$, Figure 3D).

Selective pharmacological blockade of the signaling pathways responsible for endothelial-dependent vasodilatation²¹ was then used to identify the mechanism responsible for the improvement observed in *Adcy9^{Gt/Gt}* mice. The nitric oxide synthase blocker L-NNA

inhibited significantly ACh-induced vasodilatation both in WT and *Adcy9^{Gt/Gt}* mice ($P<0.01$), but flow-mediated vasodilatation was numerically reduced only in *Adcy9^{Gt/Gt}* mice (Figure 3E). In contrast, the cyclooxygenase (responsible for production of prostacyclin) blocker meclofenamate or the cocktail of endothelial-dependent hyperpolarization blockers (TRAM-34 and apamin), inhibited ACh-induced endothelial-dependent vasodilatation in *Adcy9^{Gt/Gt}* mice ($P<0.01$ for both pathways, Figure 3F) but not in WT mice.

Adcy9^{Gt/Gt} mice are systemically inactivated for *Adcy9* making it difficult to identify a direct role in vascular tissue that could be associated with the observed potentiated endothelial function. Therefore, *Adcy9* mRNA expression was studied by *in situ* hybridization on histological sections and was demonstrated in the femoral artery wall. Specificity of the *Adcy9* mRNA signal was confirmed by absence of dots with the negative control probe (Figure 3G).

***Adcy9* Inactivation Increases Body Weight and Adipose Tissue Volume**

Adcy9^{Gt/Gt} mice gained more weight than WT animals from weeks 3 to 16 of atherogenic diet, to reach weights of 45.1 ± 2.4 g and 33.5 ± 1.2 g respectively ($P<0.01$, Figure 4A). MRI performed at week 14 showed that *Adcy9^{Gt/Gt}* mice presented more adipose tissue than WT (Figure 4B), with a doubling of total body adipose tissue volume in *Adcy9^{Gt/Gt}* mice (9.5 ± 1.2 cm³) compared to WT (4.3 ± 0.4 cm³, $P<0.01$, Figure 4C). This increase was confirmed by the larger inguinal, perirenal, epididymal and interscapular fat depots (Figure 4D). Histological sections showed that *Adcy9* inactivation resulted in hypertrophic adipocytes in epididymal white adipose tissue and larger lipid droplets in interscapular brown adipose tissue (Figure 4E). No significant change in blood glucose or insulin concentrations was observed in response to the atherogenic diet and increased fat deposits (data not shown).

***Adcy9* Inactivation Modulates Autonomic Nervous System Activity**

Given the differences in weight gain between *Adcy9^{Gt/Gt}* and WT mice, feed efficiency defined as the ratio of weight gain over energy intake was evaluated over the same period of time. With the atherogenic diet, *Adcy9^{Gt/Gt}* mice showed a significant increase in feed

efficiency (1.2 ± 0.1 g/100 kCal) compared to WT (0.6 ± 0.1 g/100 kCal, $P < 0.01$, Figure 5A). This indicates that the control of energetic balance, which is dependent on the autonomic nervous system, is modified by *Adcy9* inactivation. Therefore, we evaluated autonomic nervous system activity by measuring heart rate variability by telemetry in WT and *Adcy9*^{Gt/Gt} mice. The RR interval was increased in *Adcy9*^{Gt/Gt} mice (135 ± 3 ms) compared to WT mice (125 ± 2 ms, $P = 0.05$, Figure 5B). Nocturnal heart rate was lower in *Adcy9*^{Gt/Gt} mice (449 ± 10 bpm) compared to WT mice (484 ± 10 bpm, $P = 0.06$). Increased parasympathetic activity was also demonstrated by pNN(6), representing the percentage of RR intervals exceeding preceding ones by 6 ms or more,¹⁷ which was higher during the night period in *Adcy9*^{Gt/Gt} mice ($21.6 \pm 2.4\%$) compared to WT ($14.5 \pm 2.2\%$, $P < 0.05$, Figure 5C).

***Adcy9* Inactivation-Induced Atheroprotection is Lost in Mice Expressing CETP.**

In order to study the interactions between *Adcy9* and CETP expression, we repeated the experiments in the presence of CETP by crossing transgenic mice for the human CETP minigene (CETP^{WT}) with *Adcy9*^{Gt/Gt} mice to obtain animals with CETP and inactivated for *Adcy9* (CETP^{Gt}). We then submitted both types of mice (CETP^{WT} and CETP^{Gt}) to the previously described atherogenic protocol (involving AAV8-*Pcsk9*^{D377Y} injection and atherogenic diet). CETP^{WT} and CETP^{Gt} mice developed similar atherosclerotic lesions that covered $11.8 \pm 1.8\%$ and $8.6 \pm 1.9\%$ of the intima area, respectively ($P = \text{NS}$, Figure 6A). Figure 6B compares percentage of lesion area in the whole aorta in WT, *Adcy9*^{Gt/Gt}, CETP^{WT} and CETP^{Gt} to emphasize the absence of atheroprotection in CETP^{Gt} mice compared to *Adcy9*^{Gt/Gt} mice ($P < 0.05$). These results indicate that *Adcy9* does not significantly affect atherosclerosis development in presence of CETP.

***Adcy9* Inactivation-Induced Endothelial Function Protection is Lost in Mice Expressing CETP**

Given the loss of *Adcy9* inactivation-induced atheroprotection when the CETP gene is introduced, we studied vasodilatation to ACh and SNP in femoral arteries from atherosclerotic CETP^{WT} and CETP^{Gt} (Figure 7). *Adcy9* inactivation no longer modified endothelial-

dependent vasodilatation in response to ACh when CETP was present (Figure 7). However, SNP-induced vasodilatation remained potentiated by *Adcy9* inactivation in mice with CETP ($P<0.01$ for CETP^{Gt} versus CETP^{WT}, Figure 7). These results suggest that the atheroprotective effect of *Adcy9* inactivation in the absence of CETP is associated with their role in the regulation of endothelial function.

***Adcy9* Inactivation-Induced Gains in Body Weight and Adipose Tissue Volume are Lost in Mice Expressing CETP.**

To further study the interactions between *Adcy9* and CETP, we investigated the effect of *Adcy9* inactivation on body weight change in mice expressing CETP during the atherogenic treatment. CETP^{WT} and CETP^{Gt} mice had similar progression of body weight upon atherogenic treatment (Figure 8A). At sacrifice, their weights (CETP^{WT}: 34.1±1.1 g; CETP^{Gt}: 35.3±1.5 g) were similar to that of WT animals (33.5±1.2 g) and significantly lower than the weight of *Adcy9*^{Gt/Gt} mice (45.1±2.4 g, $P<0.01$, Figure 8). At week 14, adipose tissue volumes on MRI were similar in CETP^{WT} (4.1±0.5 cm³) and CETP^{Gt} mice (5.4±0.7 cm³, Figure 8B). These results demonstrate that *Adcy9* and CETP also interact in the regulation of weight and adiposity.

4. Discussion

The results of this study show that, in mice that naturally lack CETP activity, ADCY9 inactivation protects against atherosclerosis, reduces macrophage accumulation and proliferation in the arterial wall, improves endothelial function, increases feed efficiency, and modulates autonomic nervous system activity. These effects of ADCY9 inactivation are not seen in the presence of CETP, and the results therefore demonstrate interactions between ADCY9 and CETP.

Our findings support the results from the dal-Outcomes and dal-Plaque-2 clinical trials,^{7, 22} in which a pharmacogenomic interaction was observed between ADCY9 and CETP. Indeed, the genotype at rs1967309 in the *ADCY9* gene determined responses to the CETP inhibitor dalcetrapib but not to placebo. These responses included clinical events (coronary heart disease death, myocardial infarction, stroke, hospitalization for unstable angina, and coronary revascularization) and carotid atherosclerosis changes on imaging.

Our results offer insights into the underlying mechanisms for the interactions between ADCY9 and CETP. The reduction in atherosclerosis caused by ADCY9 inactivation in the absence of CETP was related to the reduced accumulation of CD68-positive macrophages in the arterial wall, which in turn was due in part to their decreased proliferation. The reduced accumulation and proliferation of macrophages are concordant with the *ADCY9* genotype-dependent changes in the inflammatory biomarker C-reactive protein that were previously reported with dalcetrapib.⁷ Of note, *Adcy9* expression has previously been associated with regulation of inflammatory processes such as chemoattraction.^{23, 24} In addition, inhibition of macrophage *Adcy9* expression was previously shown to decrease IL-6 expression.²⁵ Because changes in endothelial cell activation and functions may be responsible for these observations and endothelial dysfunction is one of the earliest event in atherosclerosis initiation,²⁶ we evaluated endothelium-dependent vasoreactivity in two arterial beds.

Both endothelial-dependent and endothelial-independent vasodilatations of the femoral artery and aorta were improved in mice inactivated for *Adcy9* in the absence of CETP when

submitted to the atherogenic protocol. This suggests that the protection offered by *Adcy9* inactivation extends to vascular smooth muscle cells. To show that effects on endothelial function precede atherosclerosis development in *Adcy9^{Gt/Gt}* mice, we evaluated animals not exposed to the AAV8-*Pcsk9^{D377Y}* injection/atherogenic diet protocol and demonstrated enhanced endothelial-dependent vasodilatation of femoral arteries. In order to determine the endothelial signaling pathways responsible for this increased vasorelaxation, selective pharmacological blockade was used. Blockers of the nitric oxide, cyclooxygenase (responsible for the production of prostacyclin) and endothelial-dependent hyperpolarization pathways administered separately all caused greater inhibition of vasodilatation in *Adcy9^{Gt/Gt}* mice compared to WT animals. These pharmacological results demonstrate that all three of these activated endothelial cell signalling pathways are involved in the benefits of *Adcy9* inactivation on endothelial function in the absence of CETP activity.

Adcy9^{Gt/Gt} mice (without CETP) weighed approximately 12 g more than WT animals at the end of follow-up, and this was caused mostly by increased adipose tissue volume. There was no associated change in blood glucose or insulin concentrations, suggesting that the weight gain in response to *Adcy9* inactivation does not modify insulin sensitivity. This is concordant with the ADCY9 rs1967309 genotype-dependent changes in weight that were in the opposite direction to atherosclerosis-related outcomes in dalcetrapib-treated patients of the dal-Outcomes trial.⁶ Other ADCY9 polymorphisms have also been associated with obesity phenotypes in another large clinical study.²⁷ Feed efficiency was significantly increased in *Adcy9^{Gt/Gt}* mice, suggesting that changes in autonomic nervous system activity (which controls energetic balance^{28,29}) might be involved. Indeed, the cardiac RR interval was longer (hence the lower heart rate) in *Adcy9^{Gt/Gt}* than in WT mice. To confirm this change in autonomic nervous system activity, we evaluated the pNN(6) time-domain parameter of heart rate variability.¹⁷ In accordance with cardiac RR and heart rate results, the increase in pNN(6) suggests increased (beneficial) parasympathetic activity in *Adcy9^{Gt/Gt}* mice compared to WT animals.

Given that ADCY9 activity is regulated by G-protein coupled receptors including the

beta-adrenergic receptor, additional work (including with pharmacological blockers) will be necessary to determine whether sympathetic tone is also modified in *Adcy9*^{Gt/Gt} mice. Changes in autonomic nervous system activity could be highly relevant to our study findings: Increased parasympathetic tone may have contributed to reduced macrophage accumulation and proliferation through the well-known cholinergic anti-inflammatory pathway.³⁰ Furthermore, altered sympathetic drive could explain the apparent paradox of opposite changes in weight and in cardiovascular responses.

The loss of the above-mentioned effects of ADCY9 inactivation on atherosclerosis, endothelial function and weight when the CETP gene was introduced in mice is a key finding of the current study, which is concordant with the absence of *ADCY9* genotype-dependent differences in the placebo group of the dal-Outcomes and dal-Plaque-2 trials.^{6, 7} Furthermore, the modulation of autonomic nervous system activity by ADCY9 inactivation, in the absence of CETP, raises the intriguing possibility of central nervous system effects of CETP-induced changes in lipoprotein metabolism. Accordingly, we have recently observed that plasma-borne fluorescently-labelled HDL crosses the blood-brain barrier to reach the mouse brain (see Supplementary Figure 3).

In conclusion, our study demonstrates that *Adcy9* inactivation protects against atherosclerosis, but only in the absence of CETP activity. This atheroprotection may be explained by decreased macrophage accumulation and proliferation in the arterial wall, improved endothelial function and altered autonomic nervous system activity. The ongoing Dal-GenE pharmacogenomics-guided clinical trial is testing whether patients with coronary disease and the favourable *ADCY9* genotype will benefit from CETP inhibition with dalcetrapib in terms of improved clinical cardiovascular outcomes.

5. Funding

J-C.T. holds the Canada Research Chair in translational and personalized medicine and the University of Montreal endowed research chair in atherosclerosis. Research was funded by DalCor.

6. Disclosures

J.-C. T. has received research support from Amarin, AstraZeneca, DalCor, Esperion, Ionis, Merck, Pfizer, Sanofi and Servier; honoraria from DalCor, Pfizer, Sanofi and Servier, and holds minor equity interest in DalCor. He is mentioned as an author of a pending patent on pharmacogenomics-guided CETP inhibition.

7. References

1. Kontush A. HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2014;103:341-349.
2. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, Lopez-Sendon J, Mosca L, Tardif JC, Waters DD, Shear CL, Revkin JH, Buhr KA, Fisher MR, Tall AR, Brewer B, ILLUMINATE Investigators. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med.* 2007;357:2109-2122.
3. Lincoff AM, Nicholls SJ, Riesmeyer JS, Barter PJ, Brewer HB, Fox KAA, Gibson CM, Granger C, Menon V, Montalescot G, Rader D, Tall AR, McErlean E, Wolski K, Ruotolo G, Vangerow B, Weerakkody G, Goodman SG, Conde D, McGuire DK, Nicolau JC, Leiva-Pons JL, Pesant Y, Li W, Kandath D, Kouz S, Tahirkheli N, Mason D, Nissen SE, ACCELERATE Investigators. Evacetrapib and cardiovascular outcomes in high-risk vascular disease. *N Engl J Med.* 2017;376:1933-1942.
4. MERCK, (2017) Merck Provides Update on REVEAL Outcomes Study of Anacetrapib [Press release]. Retrieved from <http://investors.merck.com/news/press-release-details/2017/Merck-Provides-Update-on-REVEAL-Outcomes-Study-of-Anacetrapib/default.aspx>.
5. Schwartz GG, Olsson AG, Abt M, Ballantyne CM, Barter PJ, Brumm J, Chaitman BR, Holme IM, Kallend D, Leiter LA, Leitersdorf E, McMurray JJ, Mundl H, Nicholls SJ, Shah PK, Tardif JC, Wright RS, dal-Outcomes Investigators. Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med.* 2012;367:2089-2099.
6. Tardif JC, Rheume E, Lemieux Perreault LP, Gregoire JC, Feroz Zada Y, Asselin G, Provost S, Barhdadi A, Rhainds D, L'Allier PL, Ibrahim R, Upmanyu R, Niesor EJ, Benghozi R, Suchankova G, Laghrissi-Thode F, Guertin MC, Olsson AG, Mongrain I, Schwartz GG, Dube MP. Pharmacogenomic determinants of the cardiovascular effects of dalcetrapib. *Circ Cardiovasc Genet.* 2015;8:372-382.
7. Tardif JC, Rhainds D, Brodeur M, Feroz Zada Y, Fouodjio R, Provost S, Boule M, Alem S, Gregoire JC, L'Allier PL, Ibrahim R, Guertin MC, Mongrain I, Olsson AG, Schwartz GG, Rheume E, Dube MP. Genotype-dependent effects of dalcetrapib on cholesterol efflux and

- inflammation: Concordance with clinical outcomes. *Circ Cardiovasc Genet*. 2016;9:340-348.
8. Cumbay MG, Watts VJ. Novel regulatory properties of human type 9 adenylate cyclase. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;310:108-115.
 9. Zambrowicz BP, Abuin A, Ramirez-Solis R, Richter LJ, Piggott J, BeltrandelRio H, Buxton EC, Edwards J, Finch RA, Friddle CJ, Gupta A, Hansen G, Hu Y, Huang W, Jaing C, Key BW, Jr., Kipp P, Kohlhauff B, Ma ZQ, Markesich D, Payne R, Potter DG, Qian N, Shaw J, Schrick J, Shi ZZ, Sparks MJ, Van Sligtenhorst I, Vogel P, Walke W, Xu N, Zhu Q, Person C, Sands AT. Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: a gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:14109-14114.
 10. Jiang XC, Agellon LB, Walsh A, Breslow JL, Tall A. Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice. Dependence on natural flanking sequences. *J Clin Invest*. 1992;90:1290-1295.
 11. Roche-Molina M, Sanz-Rosa D, Cruz FM, Garcia-Prieto J, Lopez S, Abia R, Muriana FJ, Fuster V, Ibanez B, Bernal JA. Induction of sustained hypercholesterolemia by single adeno-associated virus-mediated gene transfer of mutant hPCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35:50-59.
 12. Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2006;116:59-69.
 13. Drouin A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Belanger E, Fernandes P, Baraghis E, Lesage F, Gillis MA, Villeneuve L, Hamel E, Ferland G, Thorin E. Catechin treatment improves cerebrovascular flow-mediated dilation and learning abilities in atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;300:H1032-H1043.
 14. Bowen CV, Gati JS, Menon RS. Robust prescan calibration for multiple spin-echo sequences: application to FSE and b-SSFP. *Magn Reson Imaging*. 2006;24:857-867.
 15. Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, Smith RG, Ho S, Gee JC, Gerig G. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage*. 2006;31:1116-1128.
 16. Brouillette J, Grandy SA, Jolicoeur P, Fiset C. Cardiac repolarization is prolonged in CD4C/HIV transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43:159-167.

17. Thireau J, Zhang BL, Poisson D, Babuty D. Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. *Exp Physiol*. 2008;93:83-94.
18. Hacker BM, Tomlinson JE, Wayman GA, Sultana R, Chan G, Villacres E, Disteché C, Storm DR. Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9). *Genomics*. 1998;50:97-104.
19. Paterson JM, Smith SM, Simpson J, Grace OC, Sosunov AA, Bell JE, Antoni FA. Characterisation of human adenylyl cyclase IX reveals inhibition by Ca(2+)/Calcineurin and differential mRNA polyadenylation. *J Neurochem*. 2000;75:1358-1367.
20. Rosenfeld ME, Polinsky P, Virmani R, Kauser K, Rubanyi G, Schwartz SM. Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:2587-2592.
21. Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, Tang EH. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219:22-96.
22. Tardif JC, Rhoads D, Rheume E, Dube MP. CETP: Pharmacogenomics-based response to the CETP inhibitor dalcetrapib. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:396-400.
23. Liu L, Das S, Losert W, Parent CA. mTORC2 regulates neutrophil chemotaxis in a cAMP- and RhoA-dependent fashion. *Dev Cell*. 2010;19:845-857.
24. Liu L, Gritz D, Parent CA. PKCbetaII acts downstream of chemoattractant receptors and mTORC2 to regulate cAMP production and myosin II activity in neutrophils. *Mol Biol Cell*. 2014;25:1446-1457.
25. Alper S, Laws R, Lackford B, Boyd WA, Dunlap P, Freedman JH, Schwartz DA. Identification of innate immunity genes and pathways using a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:7016-7021.
26. Gimbrone MA Jr., Garcia-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118:620-636.
27. Berndt SI, Gustafsson S, Magi R, Ganna A, Wheeler E, Feitosa MF, Justice AE, Monda KL, Croteau-Chonka DC, Day FR, Esko T, Fall T, Ferreira T, Gentilini D, Jackson AU, Luan J, Randall JC, Vedantam S, Willer CJ, Winkler TW, Wood AR, Workalemahu T, Hu YJ, Lee SH, Liang L, Lin DY, Min JL, Neale BM, Thorleifsson G, Yang J, Albrecht E, Amin N, Bragg-Gresham JL, Cadby G, den Heijer M, Eklund N, Fischer K, Goel A, Hottenga JJ,

Huffman JE, Jarick I, Johansson A, Johnson T, Kanoni S, Kleber ME, Konig IR, Kristiansson K, Kutalik Z, Lamina C, Lecoeur C, Li G, Mangino M, McArdle WL, Medina-Gomez C, Muller-Nurasyid M, Ngwa JS, Nolte IM, Paternoster L, Pechlivanis S, Perola M, Peters MJ, Preuss M, Rose LM, Shi J, Shungin D, Smith AV, Strawbridge RJ, Surakka I, Teumer A, Trip MD, Tyrer J, Van Vliet-Ostaptchouk JV, Vandenput L, Waite LL, Zhao JH, Absher D, Asselbergs FW, Atalay M, Attwood AP, Balmforth AJ, Basart H, Beilby J, Bonnycastle LL, Brambilla P, Bruinenberg M, Campbell H, Chasman DI, Chines PS, Collins FS, Connell JM, Cookson WO, de Faire U, de Vegt F, Dei M, Dimitriou M, Edkins S, Estrada K, Evans DM, Farrall M, Ferrario MM, Ferrieres J, Franke L, Frau F, Gejman PV, Grallert H, Gronberg H, Gudnason V, Hall AS, Hall P, Hartikainen AL, Hayward C, Heard-Costa NL, Heath AC, Hebebrand J, Homuth G, Hu FB, Hunt SE, Hypponen E, Iribarren C, Jacobs KB, Jansson JO, Jula A, Kahonen M, Kathiresan S, Kee F, Khaw KT, Kivimaki M, Koenig W, Kraja AT, Kumari M, Kuulasmaa K, Kuusisto J, Laitinen JH, Lakka TA, Langenberg C, Launer LJ, Lind L, Lindstrom J, Liu J, Liuzzi A, Lokki ML, Lorentzon M, Madden PA, Magnusson PK, Manunta P, Marek D, Marz W, Mateo Leach I, McKnight B, Medland SE, Mihailov E, Milani L, Montgomery GW, Mooser V, Muhleisen TW, Munroe PB, Musk AW, Narisu N, Navis G, Nicholson G, Nohr EA, Ong KK, Oostra BA, Palmer CN, Palotie A, Peden JF, Pedersen N, Peters A, Polasek O, Pouta A, Pramstaller PP, Prokopenko I, Putter C, Radhakrishnan A, Raitakari O, Rendon A, Rivadeneira F, Rudan I, Saaristo TE, Sambrook JG, Sanders AR, Sanna S, Saramies J, Schipf S, Schreiber S, Schunkert H, Shin SY, Signorini S, Sinisalo J, Skrobek B, Soranzo N, Stancakova A, Stark K, Stephens JC, Stirrups K, Stolk RP, Stumvoll M, Swift AJ, Theodoraki EV, Thorand B, Tregouet DA, Tremoli E, Van der Klauw MM, van Meurs JB, Vermeulen SH, Viikari J, Virtamo J, Vitart V, Waeber G, Wang Z, Widen E, Wild SH, Willemsen G, Winkelmann BR, Witteman JC, Wolffenbuttel BH, Wong A, Wright AF, Zillikens MC, Amouyel P, Boehm BO, Boerwinkle E, Boomsma DI, Caulfield MJ, Chanock SJ, Cupples LA, Cusi D, Dedoussis GV, Erdmann J, Eriksson JG, Franks PW, Froguel P, Gieger C, Gyllensten U, Hamsten A, Harris TB, Hengstenberg C, Hicks AA, Hingorani A, Hinney A, Hofman A, Hovingh KG, Hveem K, Illig T, Jarvelin MR, Jockel KH, Keinanen-Kiukaanniemi SM, Kiemeny LA, Kuh D, Laakso M, Lehtimaki T, Levinson DF, Martin NG, Metspalu A, Morris AD, Nieminen MS, Njolstad I, Ohlsson C, Oldehinkel AJ, Ouwehand

WH, Palmer LJ, Penninx B, Power C, Province MA, Psaty BM, Qi L, Rauramaa R, Ridker PM, Ripatti S, Salomaa V, Samani NJ, Snieder H, Sorensen TI, Spector TD, Stefansson K, Tonjes A, Tuomilehto J, Uitterlinden AG, Uusitupa M, van der Harst P, Vollenweider P, Wallaschofski H, Wareham NJ, Watkins H, Wichmann HE, Wilson JF, Abecasis GR, Assimes TL, Barroso I, Boehnke M, Borecki IB, Deloukas P, Fox CS, Frayling T, Groop LC, Haritunian T, Heid IM, Hunter D, Kaplan RC, Karpe F, Moffatt MF, Mohlke KL, O'Connell JR, Pawitan Y, Schadt EE, Schlessinger D, Steinthorsdottir V, Strachan DP, Thorsteinsdottir U, van Duijn CM, Visscher PM, Di Blasio AM, Hirschhorn JN, Lindgren CM, Morris AP, Meyre D, Scherag A, McCarthy MI, Speliotes EK, North KE, Loos RJ, Ingelsson E. Genome-wide meta-analysis identifies 11 new loci for anthropometric traits and provides insights into genetic architecture. *Nat Genet.* 2013;45:501-512.

28. Messina G, De Luca V, Viggiano A, Ascione A, Iannaccone T, Chieffi S, Monda M. Autonomic nervous system in the control of energy balance and body weight: personal contributions. *Neurol Res Int.* 2013;2013:639280.

29. Gautron L, Elmquist JK, Williams KW. Neural control of energy balance: translating circuits to therapies. *Cell.* 2015;161:133-145.

30. Chavan SS, Pavlov VA, Tracey KJ. Mechanisms and therapeutic relevance of neuro-immune communication. *Immunity.* 2017;46:927-942.

8. Figures

FIG. 1

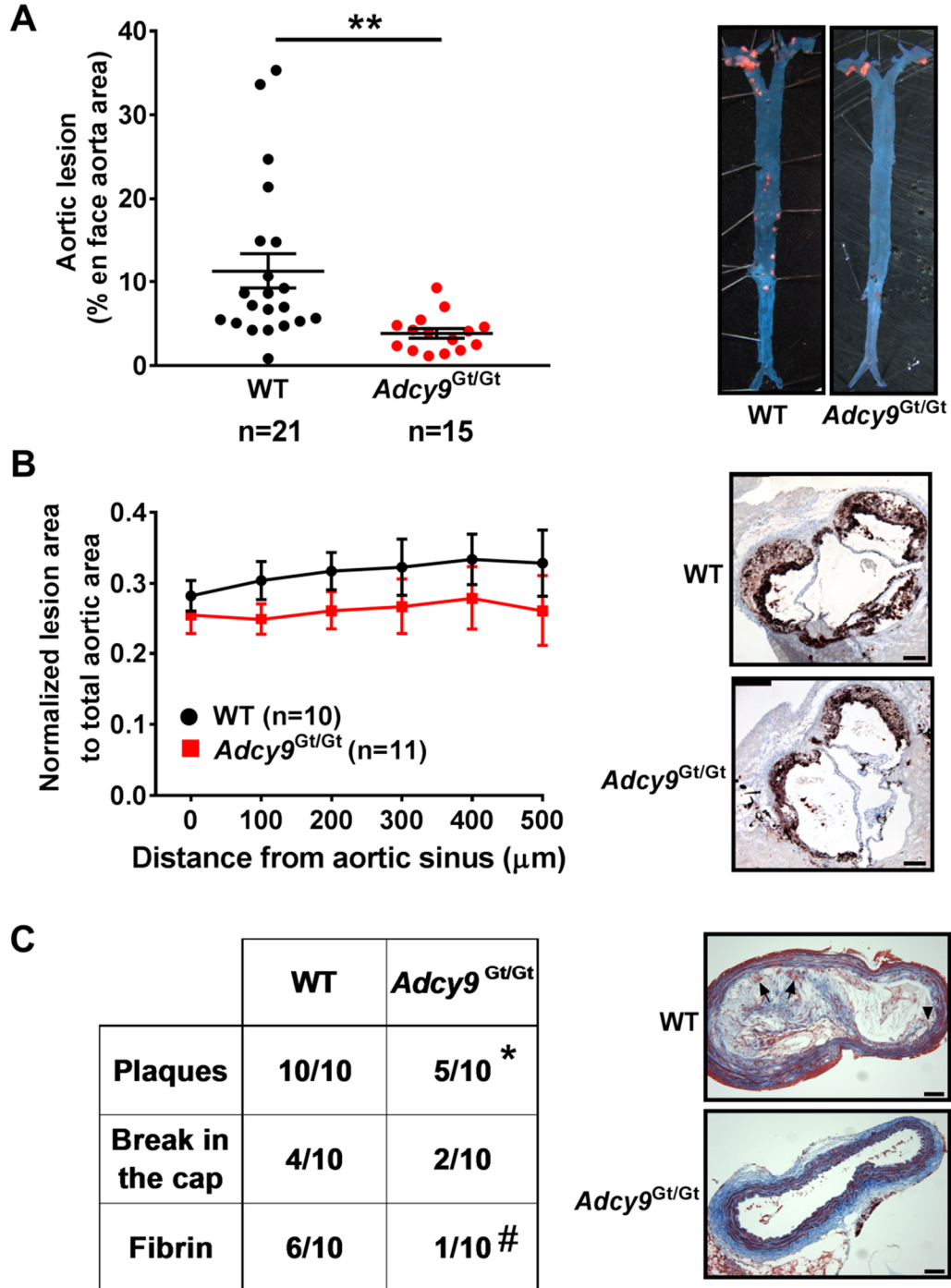


Figure 1. *Adcy9* inactivation protects from atherosclerosis. **(A)** Aortas were mounted *en face* and lesions containing lipids were stained with Oil Red O before imaging. Percent atherosclerotic lesion area was expressed as the percentage of the intima area positive for Oil Red O staining. Images on the right show representative Oil Red O stained aortas from WT and *Adcy9^{Gt/Gt}* mice. **, $P < 0.01$ **(B)** Aortic roots from WT and *Adcy9^{Gt/Gt}* mice were sectioned and stained with Oil Red O. Oil Red O-stained lesion area was quantified from the base of aortic valve sinus to 500 μm more distally in the aortic root. Images are representative sections 100 μm down from the base of the sinus. Scale bar: 200 μm . **(C)** Brachiocephalic arteries were sectioned and stained using the Carstairs' method.[181] Images on the right show representative sections for WT and *Adcy9^{Gt/Gt}* mice. Arrows indicate presence of fibrin and arrowhead indicates presence of break in the plaque cap. *, $P < 0.05$, #, $P = 0.06$. Scale bar: 60 μm .

FIG. 2

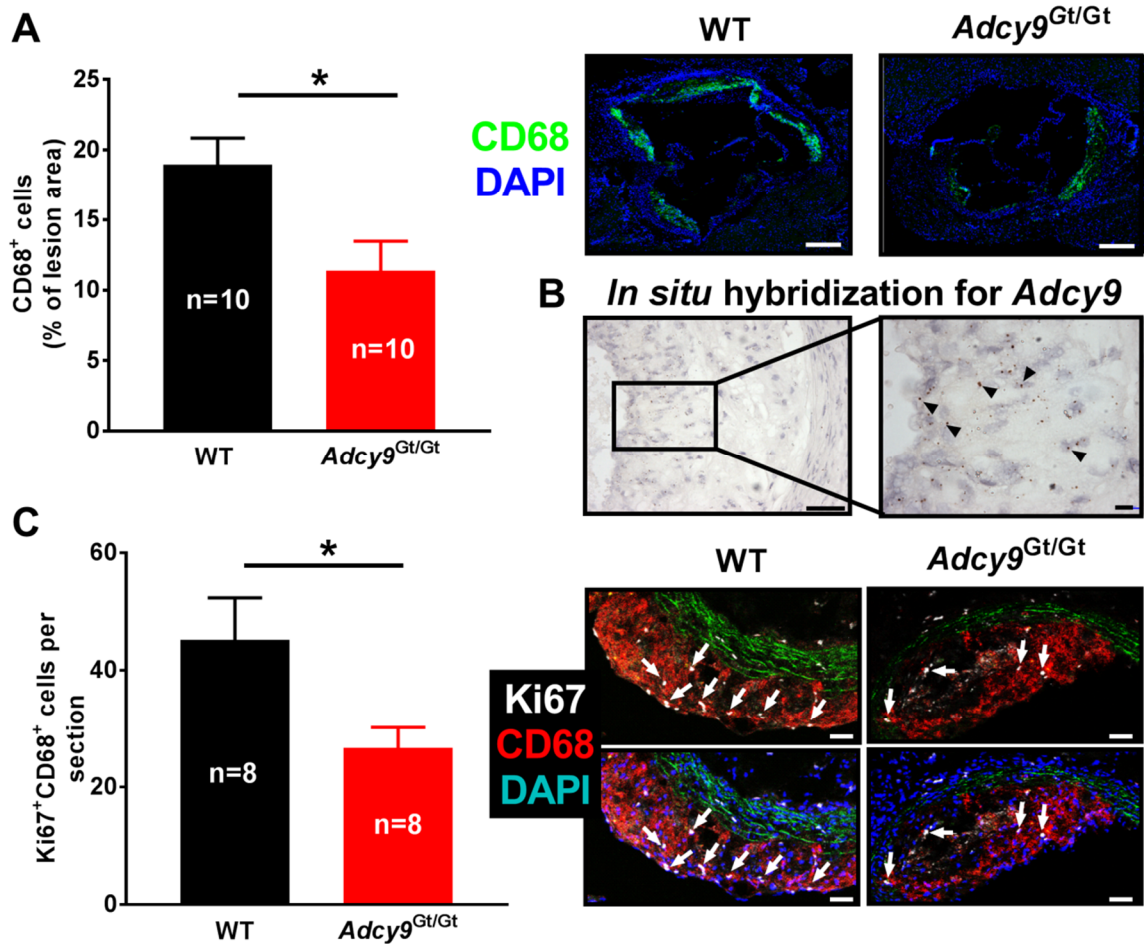


Figure 2. Atheroprotection induced by *Adcy9* inactivation is associated with decreased CD68-positive macrophage (foam cell) content and proliferation in atherosclerotic lesions. (A) Immunostaining for CD68 in aortic root sections from WT and *Adcy9*^{Gt/Gt} mice. Images on the **top right** show representative detection of CD68 labeling in green for WT and *Adcy9*^{Gt/Gt} mice. DAPI detection of the nuclei is represented in blue. *, $P < 0.05$, Scale bar: 200 μm . (B) Detection of *Adcy9* mRNA expression by *in situ* hybridization in aortic root plaque where CD68-positive foam cells are present. A section of the left image is magnified on the right image. Arrowheads point to dots for *Adcy9* expression that mostly colocalize with hematoxylin-stained nucleus. Scale bar is 50 μm for image on the left and 10 μm for image on the right. Images are representative experiments performed in three mice. (C) Quantification

of double-immunostained cells (arrows) with CD68 and Ki67 markers in aortic root section. Images on the right are representative of immunostaining for CD68 (red) and Ki67 (white). DAPI detection of nuclei is represented in blue, and green represents elastin autofluorescence. Arrows point to proliferating macrophages (foam cells); *, $P < 0.05$. Scale bar: 50 μm .

FIG. 3

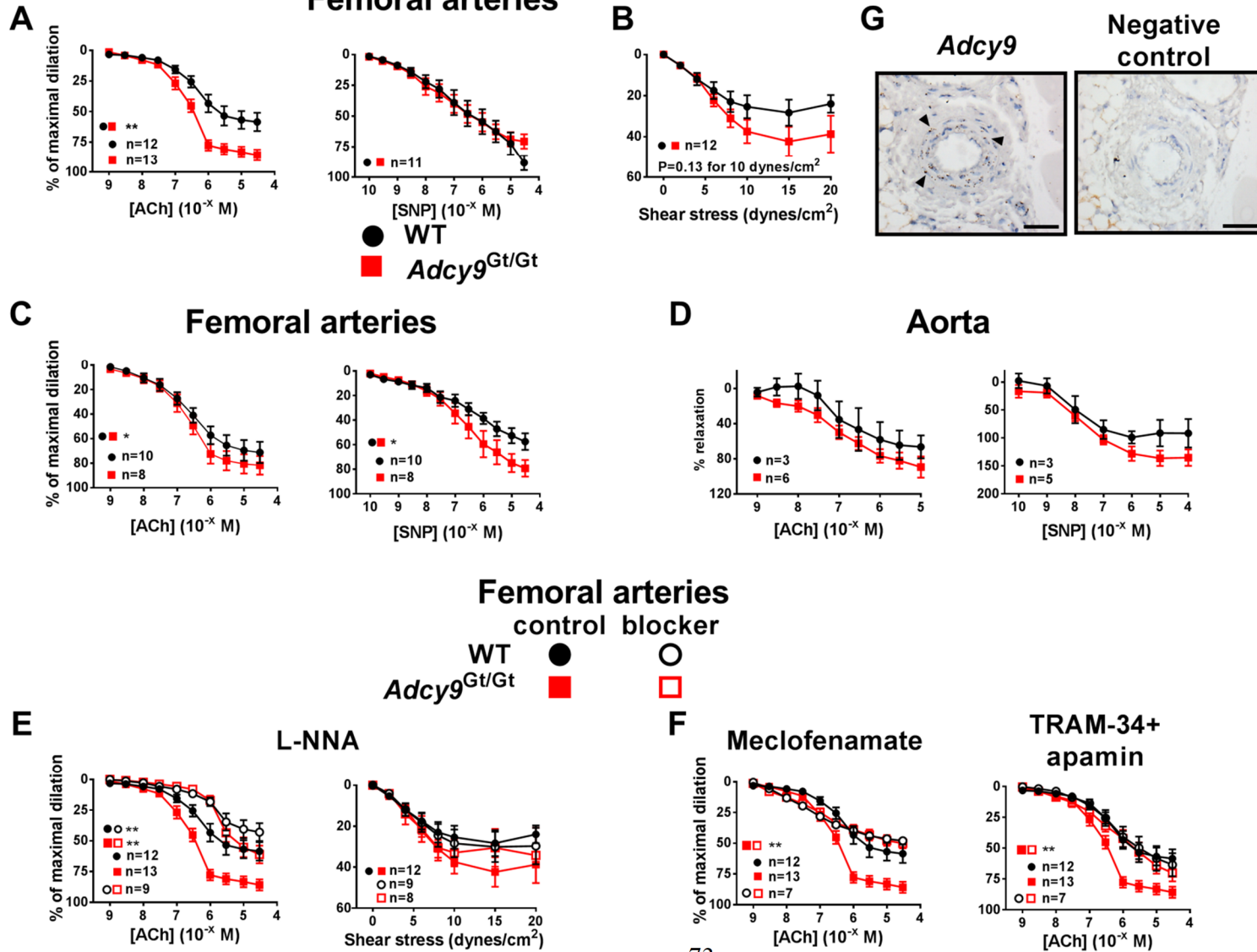


Figure 3. *Adcy9* inactivation potentiates endothelial function. (A) Endothelial-dependent vasodilatation to ACh and endothelial-independent vasodilation to SNP in femoral arteries from untreated (no AAV8-*Pcsk9*^{D377Y} and no atherogenic diet) WT and *Adcy9*^{Gt/Gt} mice (**, $P<0.01$). (B) Flow-mediated vasodilatation in femoral arteries of untreated mice. (C) and (D) Vasodilatory responses to ACh and SNP in pressurized femoral arteries and in aorta rings from WT and *Adcy9*^{Gt/Gt} mice treated with the atherogenic protocol (*, $P<0.05$). (E) Vasodilatation to ACh or flow in absence or presence of NO synthase inhibitor L-NNA in pressurized femoral arteries from untreated WT and *Adcy9*^{Gt/Gt} mice (**, $P<0.01$). (F) Vasodilatation to ACh in absence or presence of cyclooxygenase inhibitor meclofenamate or endothelial-dependent hyperpolarization pathway blockers TRAM34 and apamin (**, $P<0.01$). (G) *In situ* hybridization for detection of *Adcy9* mRNA, performed on sections of femoral arteries, shows the presence of dots (arrowheads) that are absent when sections were incubated with the negative control probe. Images are representative experiments performed in four mice. Scale bar 50 μm .

FIG. 4

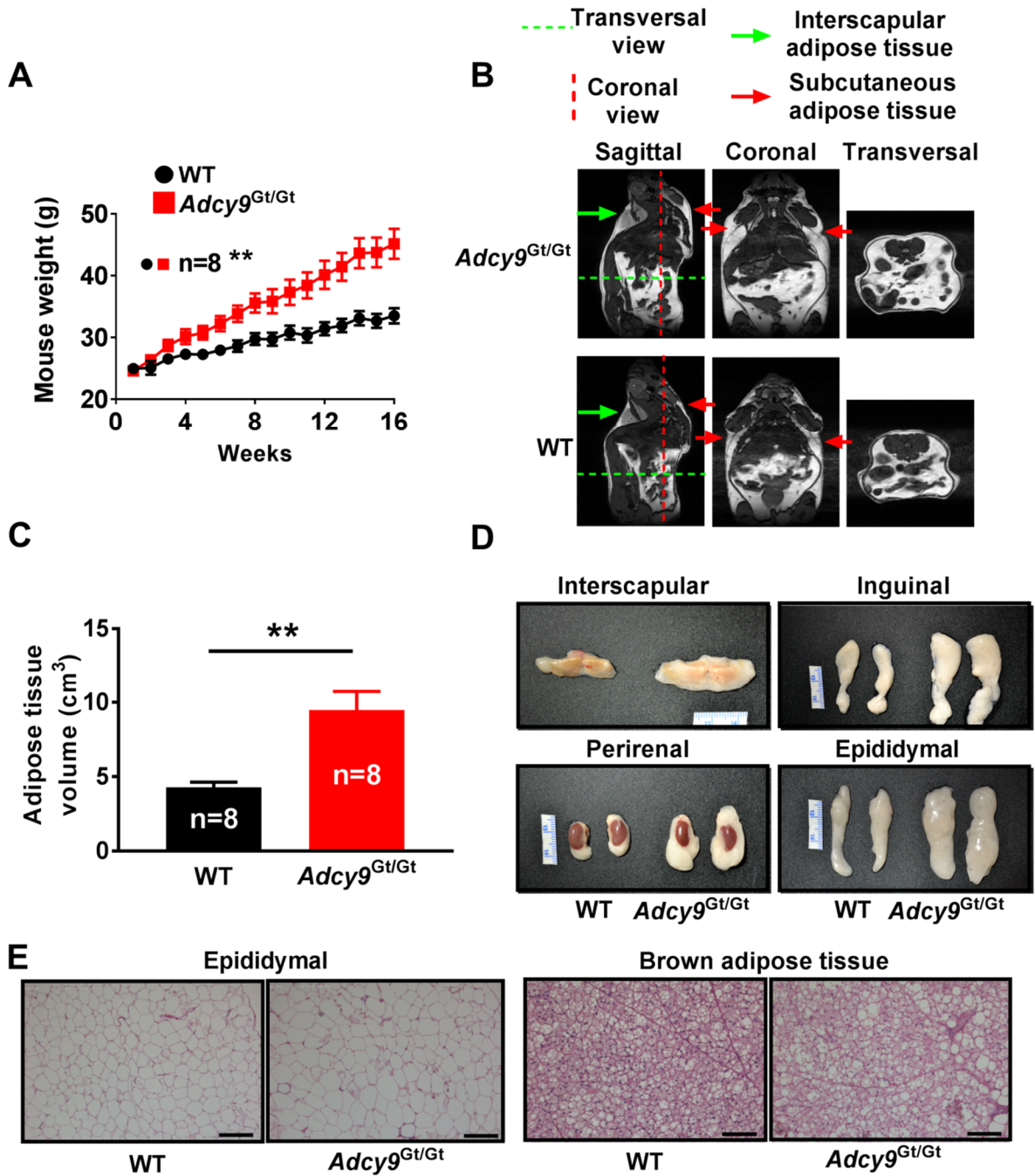


Figure 4. *Adcy9* inactivation increases weight gain and adipose tissue volume upon treatment with an atherogenic diet. (A) Body weight progression of WT and *Adcy9*^{Gt/Gt} mice over 16 weeks (**, $P < 0.05$ starting at week 3). (B) Representative pictures from whole body MRI of

WT and *Adcy9^{Gt/Gt}* mice acquired during the 14th week of exposure to the atherogenic diet. The bright white signal represents adipose tissue. (C) Volume of adipose tissue measured by segmentation of MRI images (**, $P < 0.01$). (D) Representative images of fat tissue from WT and *Adcy9^{Gt/Gt}* mice that were collected at the interscapular, inguinal, perirenal and epididymal sites. Gauge is a centimeter scale. (E) Hematoxylin and eosin staining of adipose tissue sections show increased epididymal adipocyte size and larger lipid droplets in interscapular brown fat in *Adcy9^{Gt/Gt}* mice compared to WT animals (scale bars: **left**: 200 μm , **right** 100 μm).

FIG. 5

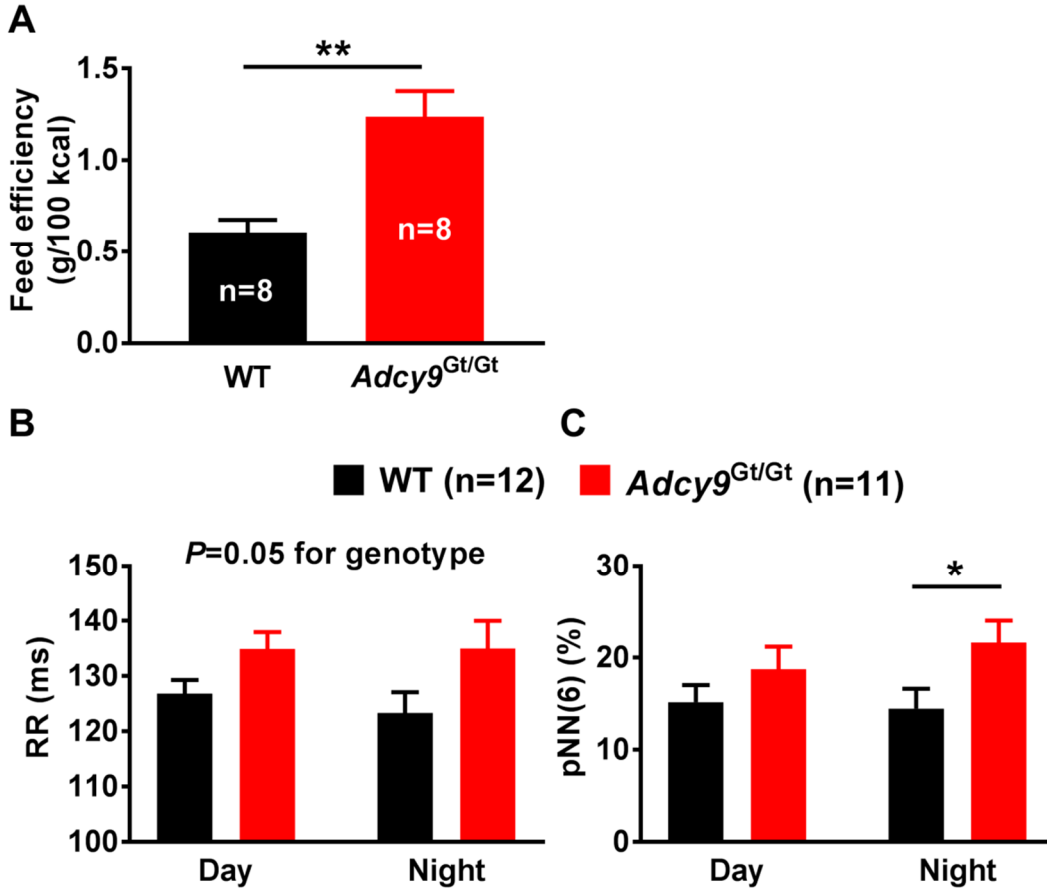
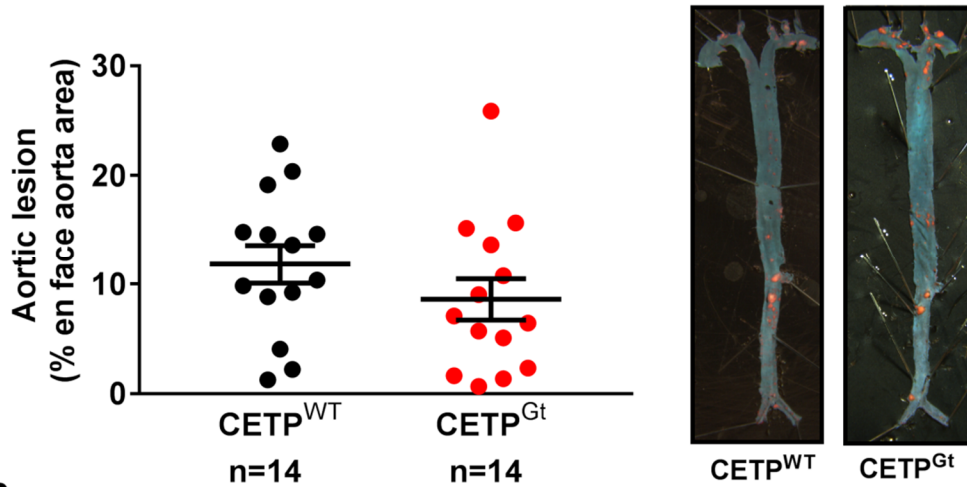


Figure 5: *Adcy9* inactivation modifies autonomic nervous system activity. (A) Feed efficiency in WT and *Adcy9^{Gt/Gt}* mice treated with the atherogenic protocol (**, $P < 0.01$). (B)

ECG were recorded by telemetry in WT and *Adcy9*^{Gt/Gt} mice. Heart rate was measured for 12-hour periods during the day and night-time. (C) Heart rate variability analysis in the time domain. pNN(6) is the percentage of RR intervals exceeding preceding ones by 6 ms or more and reflects parasympathetic nervous system activity (*, $P < 0.05$).

FIG. 6

A



B

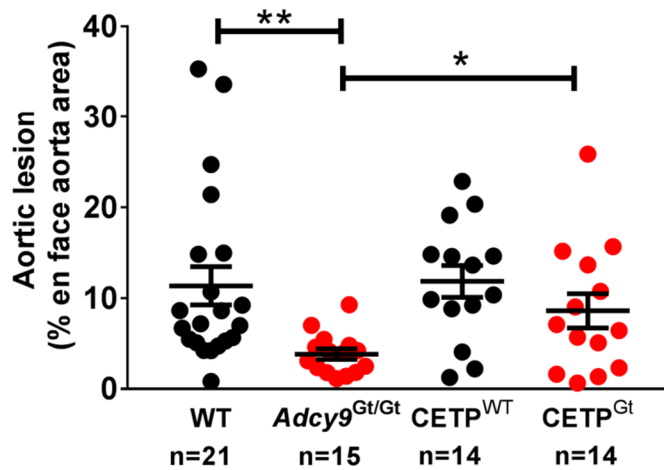


Figure 6. Atheroprotection induced by *Adcy9* inactivation is lost in mice expressing CETP. (A) Atherosclerosis development was measured in CETP^{WT} and CETP^{Gt} treated with the atherogenic protocol. Aortas were mounted *en face* and stained with Oil Red O before imaging. Percent atherosclerotic lesion area was expressed as the percentage of the intima

area positive for Oil Red O staining. Images on the right show representative aortas, with lesions containing lipids revealed by Oil Red O staining. (B) Percent atherosclerotic lesion area in *en face* aorta in WT, *Adcy9*^{Gt/Gt}, CETP^{WT} and CETP^{Gt} mice (**, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$). Figure 6B was constructed with results from 1A and 6A.

FIG. 7

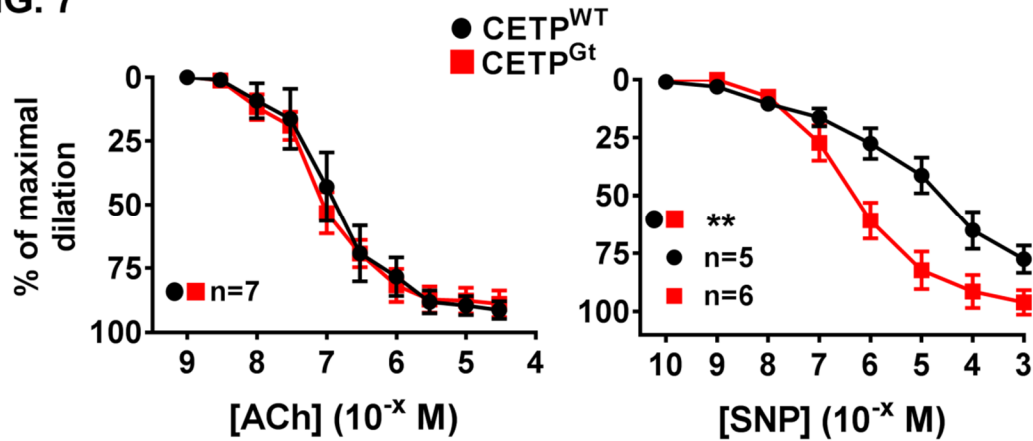


Figure 7. *Adcy9* inactivation-induced endothelial function protection is lost in mice expressing CETP. Endothelial-dependent vasodilation to ACh is not modified by *Adcy9* inactivation in atherosclerotic mice transgenic for CETP. Vasodilatation to ACh (**left**) and SNP (**right**) of pressurized femoral arteries from CETP^{WT} and CETP^{Gt} mice treated with the atherogenic protocol (right **, $P < 0.05$).

FIG. 8

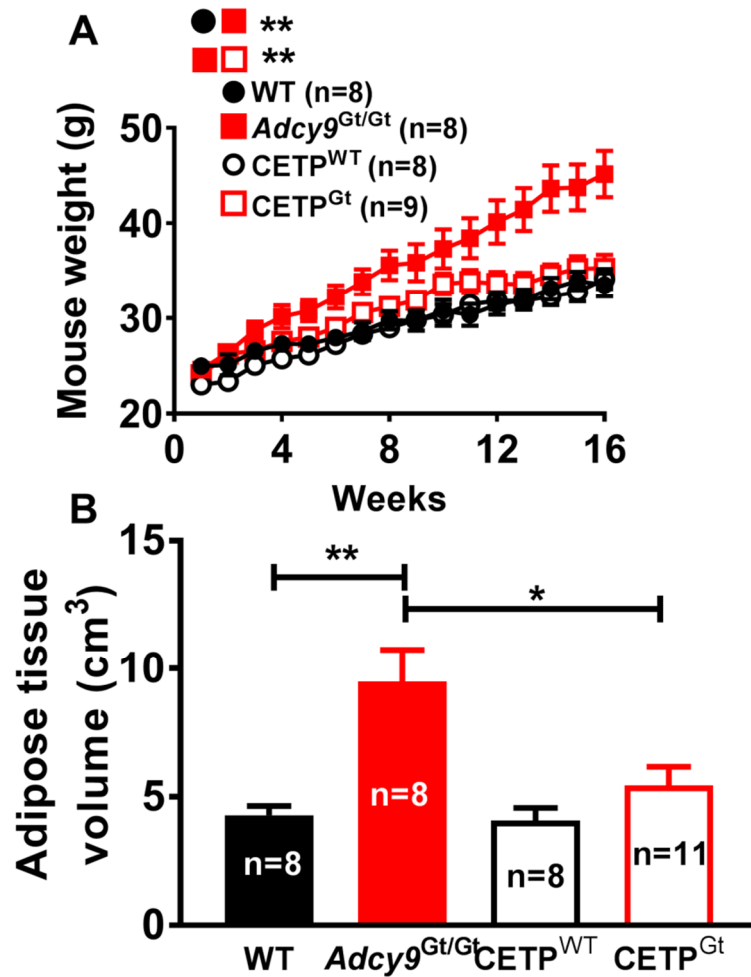
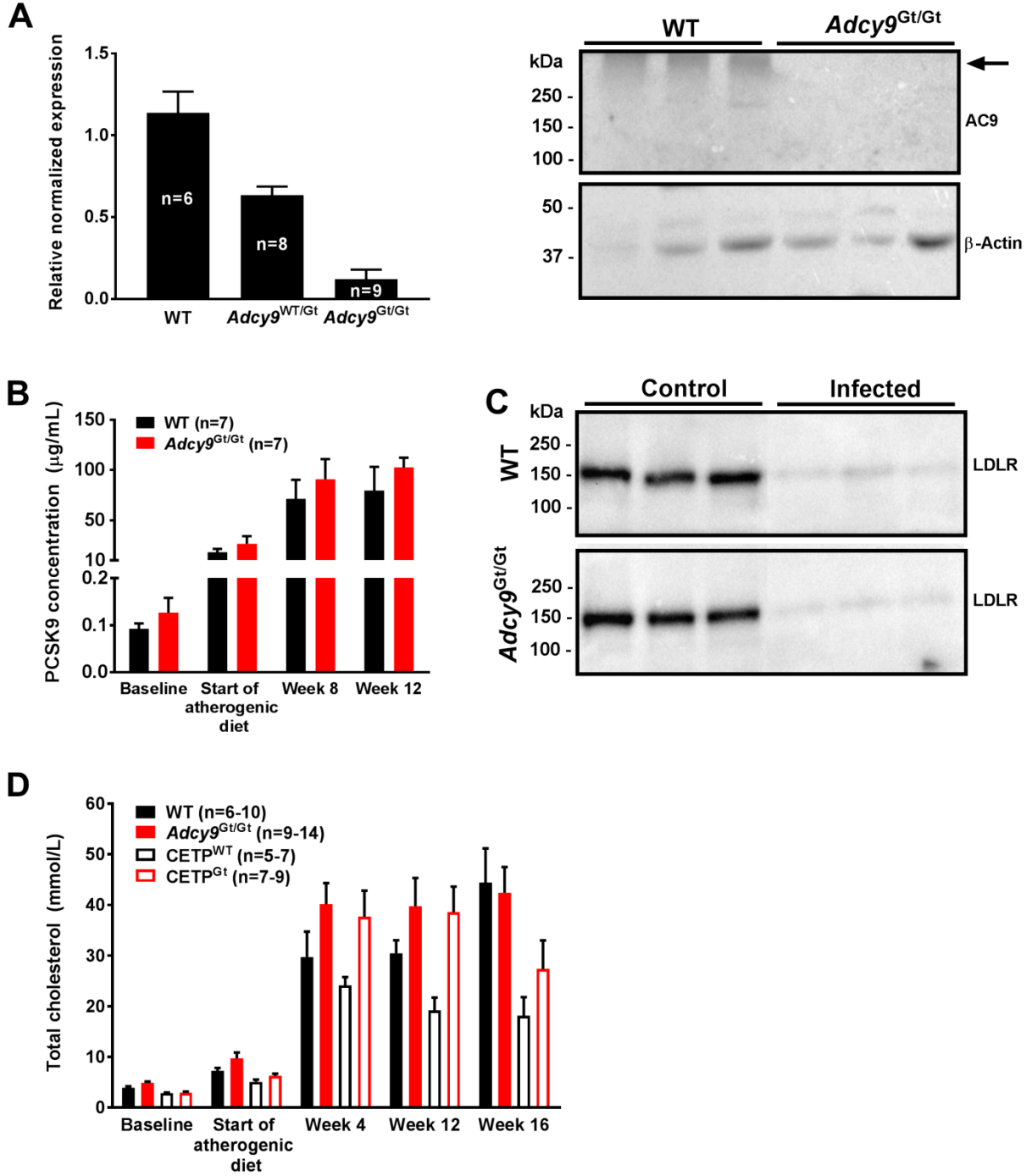


Figure 8. *Adcy9* inactivation-induced gains in body weight and adipose tissue volume are lost in mice expressing CETP. **(A)** Evolution of body weight in WT, *Adcy9*^{Gt/Gt}, CETP^{WT} and CETP^{Gt} mice treated with the atherogenic protocol. *Adcy9* inactivation does not modify weight gain in atherosclerotic mice transgenic for CETP (**, $P < 0.05$ from week 3 and after for WT versus *Adcy9*^{Gt/Gt} and for *Adcy9*^{Gt/Gt} versus CETP^{Gt}). **(B)** Volume of adipose tissue measured by segmentation of MRI images in WT, *Adcy9*^{Gt/Gt}, CETP^{WT} and CETP^{Gt} mice (**, $P < 0.01$; *, $P < 0.05$).

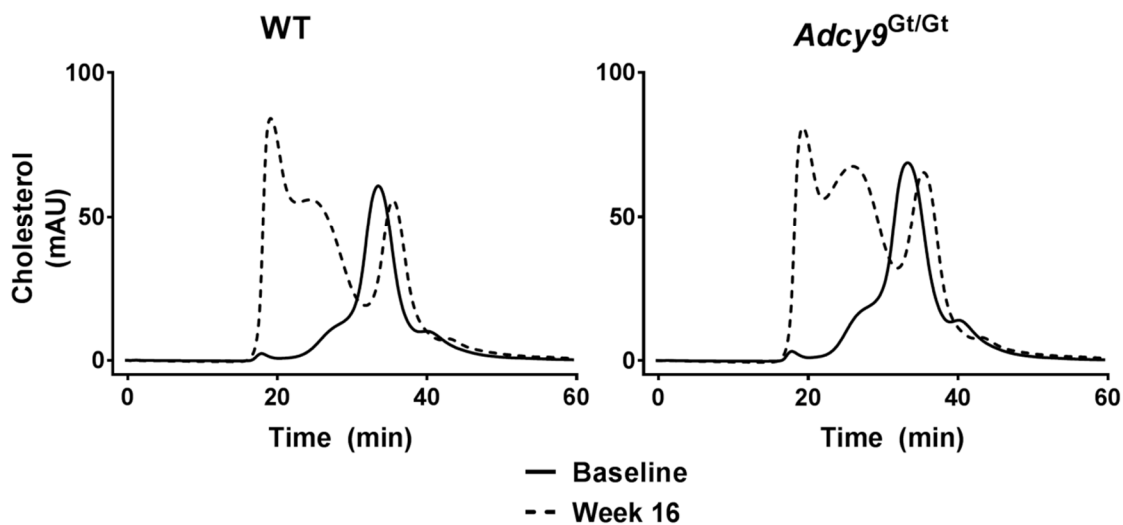
9. Supplementary data

Suppl. FIG. 1



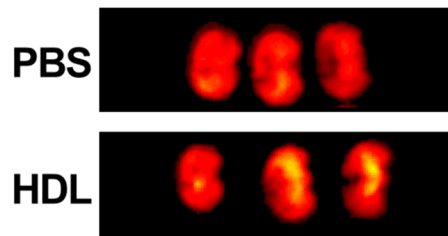
Suppl. Figure.1 (A) Expression of *Adcy9* is inactivated in *Adcy9^{Gt/Gt}* mice. **(Left)** Quantification by RT-qPCR of *Adcy9* mRNA expression in the mouse heart in untreated WT, *Adcy9^{WT/Gt}* and *Adcy9^{Gt/Gt}* mice. **(Right)** Inactivation of adenylate cyclase type 9 (AC9) protein expression in the dorsal muscle of untreated *Adcy9^{Gt/Gt}* compared to WT. Protein loading was controlled by blotting for β -actin. Each lane of the blot is for one mouse. This blot is representative of two independent experiments. **(B)** Plasma PCSK9 concentration in WT and *Adcy9^{Gt/Gt}* mice infected with AAV8-*Pcsk9^{D377Y}* and treated with an atherogenic diet. Baseline is for plasma PCSK9 concentration before infection with AAV8-*Pcsk9^{D377Y}*. “Start of atherogenic diet” is for plasma PCSK9 concentration in mice infected with AAV8-*Pcsk9^{D377Y}* one week before and prior to the start of treatment with the atherogenic diet. Week 8 and Week 12 are for plasma of mice infected with AAV8-*Pcsk9^{D377Y}* and fed an atherogenic diet for 8 and 12 weeks. **(C)** Effect of AAV8-*Pcsk9^{D377Y}* infection on liver LDLR expression studied by Western-blot in WT and *Adcy9^{Gt/Gt}* mice fed an atherogenic diet for 16 weeks. Control mice were injected with saline. Each lane of the blot is for one mouse. **(D)** Plasma total cholesterol in WT *Adcy9^{Gt/Gt}*, CETP^{WT} and CETP^{Gt} mice infected with AAV8-*Pcsk9^{D377Y}* and fed an atherogenic diet. Baseline is for the total plasma cholesterol concentration before infection with AAV8-*Pcsk9^{D377Y}*. Start of atherogenic diet occurred one week after infection.

Suppl. FIG. 2



Suppl. Figure 2: AAV8-*Pcsk9*^{D377Y} infection and atherogenic diet generate similar atherogenic lipoprotein profiles in WT and *Adcy9*^{Gt/Gt} mice. Lipoprotein profiles for WT (**left**) and *Adcy9*^{Gt/Gt} (**right**) at baseline and at sacrifice after 16 weeks of atherogenic diet. Isolated mouse plasma from a pool of five mice was directly injected into an Agilent 1200 HPLC with a Superose 6 gel filtration FPLC column. Cholesterol was visualized using in-line detector at 500 nm.

Suppl. FIG.3



Suppl. Figure 3: Detection of tail-vein-injected fluorescently-labeled HDL in the mouse brain. HDL were purified from mouse blood by ultracentrifugation and apolipoproteins were labeled with Alexa Fluor 546. Mice were injected (iv) with PBS or 1.5 mg of fluorescently-labelled mouse HDL 2 hours before sacrifice. At sacrifice, mice were extensively perfused to clear the tissue from Alexa 546 stained-HDL present in blood. One mm-thick brain sections were obtained using a mouse brain matrix (KOPF instruments, Tujunga, CA) and imaged for fluorescence with a Caliper IVIS Lumina II multispectral imaging system (Perkin Elmer, Waltham, MA). Yellow color indicates higher intensity of fluorescence.

Discussion

Le syndrome coronarien, l'infarctus, les anévrismes et autres maladies cardiovasculaires sont majoritairement la conséquence du développement et de la progression de l'athérosclérose [1]. L'athérosclérose est l'une des premières causes de décès dans les pays industrialisés [1]. On estime, aux États-Unis seulement, que près de 16 millions d'individus sont atteints d'une maladie faisant suite à son développement [2]. La recherche ciblant les mécanismes contribuant à la formation et à la progression de l'athérosclérose demeure donc primordiale. Parmi ces cibles potentielles, de nombreuses études cliniques se penchent sur le rôle des HDL et leurs rôles protecteurs dans l'inflammation, sur la fonction endothéliale et le transport inverse du cholestérol [109, 110]. Un ratio HDL/LDL élevé a été démontré pour être bénéfique dans le traitement des lésions athérosclérotiques [109]. Les molécules ciblant l'inhibition de la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP), qui est responsable de l'échange de cholestérol entre les HDL et les lipoprotéines de type apoB, font parties des thérapies étudiées. Le dalcetrapib est un inhibiteur de la CETP [117, 184]. Précédemment, l'étude Dal-OUTCOMES a permis de déterminer qu'une augmentation de 30% du contenu en cholestérol dans les HDL était observable chez les patients traités au dalcetrapib [184]. Cette augmentation n'apportait cependant aucun bénéfice significatif [184]. Ces observations étaient similaires aux résultats négatifs obtenus par de nombreuses autres études cliniques sur les thérapies HDL [117, 181]. De tels résultats pourraient s'expliquer par la variabilité génétique des patients et de l'effet de celle-ci sur la réponse thérapeutique [184].

Une étude d'association pangénomique (GWAS) a permis d'identifier des polymorphismes associés aux réponses cliniques des patients au traitement avec le dalcetrapib. Il a ainsi été montré une diminution de près de 39% des événements cardiovasculaires chez les patients possédant le variant A à l'état homozygote pour rs1967309 situé dans l'intron 2 du gène ADCY9, lorsque comparé à un traitement placebo. Au contraire, les patients possédant le variant G à l'état homozygote pour rs1967309 présentaient une augmentation des événements cardiovasculaires, lorsque traités au dalcetrapib. L'analyse biochimique chez ces patients a également révélé une augmentation de 18% des concentrations CRP chez le groupe GG, alors

qu'une diminution se démarquait plutôt chez les AA. De plus, l'efflux de cholestérol chez les patients dont le génotype était AA était augmenté, correspondant à une réponse positive au traitement, alors qu'aucune différence n'était notable chez les GG. La présence du variant AA pourrait donc être associé à une réponse athéroprotectrice. Or, le lien entre ADCY9 et la CETP, qui est la cible du dalcetrapib, n'a pas encore été élucidé. La découverte d'un variant du gène ADCY9 impliqué dans la réponse au dalcetrapib nous a conduit à nous interroger sur la fonction d'*Adcy9*. Un modèle de souris inactivé pour *Adcy9* a été développé afin de permettre cette étude. Nous avons ainsi étudié l'effet de l'inactivation d'*Adcy9* sur le développement de l'athérosclérose et de son association avec l'expression de la CETP. L'utilisation de souris inactivées pour *Adcy9* a permis d'identifier d'importantes fonctions du gène. L'utilisation ultérieure de souris transgéniques humanisées pour exprimer le gène de la CETP a par la suite permis de reproduire les observations biologiques qui avaient été soulevées dans l'étude Dal-OUTCOMES et d'ainsi conclure à une interaction entre ADCY9 et la CETP, en présence de dalcetrapib.

L'inactivation de l'expression du gène est rendue possible par l'insertion d'un vecteur d'inactivation dans le gène cible. L'inactivation utilise le principe du *gene-trapping*. La première partie de la cassette comprend un site d'épissage, de même qu'un site de polyadénylation, afin de permettre l'obtention d'un ARNm tronqué et non-fonctionnel [189]. Cette première partie remplit le rôle de l'inactivation [189]. La seconde partie de la cassette consiste à permettre la transcription d'une séquence d'acquisition, afin de permettre la localisation de l'insertion dans le gène [189]. L'insertion du vecteur d'inactivation s'est effectuée au niveau du 2^e intron du gène. Afin de valider l'inactivation de notre modèle, nous avons quantifié l'expression d'*Adcy9* par RT-qPCR. Dans le cœur, l'expression diminuait de 50% chez les animaux ayant un seul allèle d'inactivé, alors que chez les animaux homozygotes, l'inactivation était d'au moins 90% par rapport aux souris WT. Nous avons également validé l'inactivation de la protéine au niveau du muscle squelettique, considérant qu'*Adcy9* y est hautement exprimée chez l'homme [171, 172]. La quantification protéique a ainsi démontré que la mutation *Adcy9*^{Gt} entraînait la perte de l'expression de la protéine, celle-ci n'étant pas observable chez les souris *Adcy9*^{Gt/Gt} par rapport aux WT. L'inactivation par

gene-trapping était donc bien efficace. L'obtention de résultats quant à l'expression protéique d'*Adcy9* a été limitée par les quantités restreintes de sérum de rats immunisés et utilisé à titre d'anticorps.

Le développement de l'athérosclérose du modèle inactivé pour *Adcy9* s'est fait sans modification de la lignée germinale. Les souris WT ou inactivées pour *Adcy9* ont été injectées avec un vecteur viral exprimant la protéine PCSK9 avec une mutation de gain de fonction. PCSK9 entraîne la dégradation lysosomale des rLDL [190]. PCSK9 est connu pour réguler l'homéostasie lipidique [190]. L'utilisation de ce vecteur viral exprimant PCSK9 pour la dégradation des rLDL et l'induction d'une hypercholestérolémie a déjà été éprouvée [190]. Dans cet article, une première étape de validation avait été effectuée afin de s'assurer que le vecteur viral affectait uniquement l'homéostasie lipidique. L'expression de PCSK9 avait ainsi été remplacée par l'expression de la luciférase (AAV-*Luc*) [190]. L'analyse par FPLC des animaux injectés avec ce vecteur viral démontrait ainsi un profil lipoprotéique riche en HDL, caractéristique de la souris [190]. Les animaux injectés avec AAV-*PCSK9^{DY}*, quant à eux, présentaient un profil typique d'une hypercholestérolémie, avec d'importants pics correspondant aux VLDL et aux LDL et une diminution de leurs HDL [190]. Nous avons opté pour cette technique, l'utilisation d'un vecteur viral permettant notamment d'éviter de nombreux croisements de lignées de souris. Nous avons dans un premier temps analysé les niveaux plasmatiques de PCSK9 chez nos animaux. Nos analyses nous ont permis de déterminer que les niveaux plasmatiques de PCSK9 chez nos deux groupes de souris, 8 semaines après l'infection. Les valeurs sont supérieures à ce qui a été précédemment répertorié dans d'autres études, les animaux exprimant des niveaux de PCSK9 plasmatique variant entre 40 à 50 µg/mL, soit des valeurs en cholestérol moitié moins concentrées [139]. Ces différences peuvent s'expliquer par la dose virale injectée qui était inférieure à la dose que nous avons administrée à nos animaux (5.0×10^{11} particules virales vs 6.5×10^{11} particules virales respectivement) [139]. De plus, la diète sur laquelle les animaux ont été traités était également différente. Il est donc possible que la diète de type Western influence les niveaux d'expression de PCSK9, par rapport à une diète de type Paigen. Nous avons observé, par exemple, que nos animaux infectés et traités avec une diète de type Western développaient de

façon similaire des lésions athérosclérotique, et ce, peu importe le génotype. Les lésions étaient également moins importantes que sur la diète de type Paigen (données non présentées). Aucune plaque n'a été observée chez les animaux non infectés (données non présentées).

Nous avons validé l'effet de la surexpression de la protéine PCSK9 en quantifiant les niveaux de rLDL hépatiques par immunobuvardage. La quantification a permis de déterminer une dégradation de près de 90% des rLDL présents au niveau du foie. Cette réduction correspond également à ce qui a été précédemment répertorié [139, 190]. Toujours dans l'optique de valider notre modèle pour l'étude de l'athérosclérose, nous avons également contrôlé les niveaux de cholestérol totaux, la dégradation des rLDL induisant une hypercholestérolémie, qui est un facteur déterminant dans le développement de l'athérosclérose. Nous avons ainsi pu observer que les concentrations en cholestérol total étaient significativement plus élevées entre la semaine de traitement initial et la 16^e semaine. De plus, les résultats étaient similaires entre les génotypes. Ces concentrations sont également similaires à ce qui est retrouvé dans la littérature, chez des souris rLDL^{-/-} traitées sur une diète HC, moyennant les 40 mM [191, 192]. Enfin, nous avons également étudié le profil lipoprotéique de ces animaux, le dosage en cholestérol permettant d'obtenir les concentrations totales en cholestérol et non pas sa distribution dans les fractions lipoprotéiques. Dans un premier temps, l'analyse de ces fractions a ainsi permis d'observer que le profil FPLC des souris non infectées n'était pas modifié. Les souris WT et *Adcy9*^{Gt/Gt} démontrent un profil similaire en conditions basales, soit riche en HDL. L'hypercholestérolémie qui a été induite a par la suite entraîné une modification de ce profil chez les deux génotypes de souris, se dessinant sous la forme d'une redistribution typiquement athérogénique, avec d'importants pics en VLDL, LDL et une légère diminution des HDL [193]. Cette redistribution concorde avec ce qui avait été observé par différents groupes, en réponse à l'infection de leurs animaux avec AAV-PCSK9^{DY} [139, 190].

Dans des aortes entières montées en face, une diminution des lésions dans l'intima a été observée chez les souris *Adcy9*^{Gt/Gt} en comparaison aux WT, pour une diminution de près de 65% (Figure 1A de l'article). La mesure de la surface des lésions de la racine aortique,

normalisée sur sa surface totale ne démontrait pas de différence significative entre les deux groupes de souris. Une tendance à la baisse a cependant été observée chez les *Adcy9^{Gt/Gt}* en comparaison aux WT tout au long de la racine aortique. Ces résultats peuvent s'expliquer par l'avancement du développement des lésions chez nos animaux. Après 16 semaines de traitement, l'athérosclérose observée est importante. Il est possible que la protection due à l'inactivation d'*Adcy9* soit moins effective passée un certain stade de l'affection. Néanmoins, la quantification des lésions athérosclérotiques a ainsi permis de déterminer à une athéroprotection dépendante de l'inactivation d'*Adcy9*.

Nous avons également étudié les lésions dans les brachiocéphaliques, ces dernières étant plus susceptibles à une rupture de plaque [194]. Cette mesure permet de déterminer l'effet de l'expression d'un gène pour des stades plus avancés de l'athérosclérose [194]. Nous avons ainsi pu observer qu'une plaque athérosclérotique était présente chez l'ensemble des souris WT. Près de la moitié de ces animaux démontraient une rupture de lésion, visible par la présence de fibrine. Ces observations traduisent l'avancement important du développement des lésions. Chez les *Adcy9^{Gt/Gt}*, la présence de lésions au sein des brachiocéphaliques étaient diminuée de près de 50%. Chez les animaux atteints, peu de fibrine et de rupture de plaque ont été observées. Ces derniers résultats renforcent nos conclusions quant à l'effet athéroprotecteur résultant de l'inactivation d'*Adcy9*. Les souris inactivées *Adcy9* présentent moins de plaques, et les plaques présentes ont des stades de développement moindres.

Nous avons recherché les mécanismes impliqués dans les effets pro-athérosclérotiques d'*Adcy9*. Nous savons que le développement des lésions athérosclérotiques est dépendant de l'accumulation de cellules spumeuses [32, 69]. Cette accumulation pourrait être fonction de plusieurs mécanismes cellulaires : le recrutement de monocytes, qui se différencient en macrophages et se transforment en cellules spumeuses suite à l'internalisation des oxLDL [41], une différenciation des cellules musculaires lisses [70], ou encore une prolifération au sein de la plaque, suite à leur intégration dans celle-ci [69]. Nous avons analysé les plaques athérosclérotiques présentes dans la racine aortique au moyen de différents marqueurs histologiques. Nous avons quantifié la présence de cellules spumeuses en détectant par

immunofluorescence CD68, un marqueur spécifique des macrophages. L'analyse a révélé une diminution de 60% de la présence de cellules spumeuses, en réponse à l'inactivation d'*Adcy9*.

En l'absence d'anticorps validé pour la détection d'*Adcy9*, nous avons recherché l'expression d'*Adcy9* dans les plaques de la racine aortique, au moyen d'une hybridation *in situ*. Nous avons observé une expression du gène dans les régions où les lésions se développent suite à l'accumulation des cellules spumeuses. Cette détection suggère que l'expression d'*Adcy9* dans les cellules de la plaque pourrait être impliquée dans le développement des lésions.

Par la suite, nous avons recherché un mécanisme impliqué dans la diminution de l'accumulation des cellules spumeuses dans les lésions aortiques. Nous avons émis l'hypothèse que la diminution de l'accumulation de cellules spumeuses pourrait être associée à une diminution de leur prolifération [69]. Nous avons analysé les lésions athérosclérotiques au moyen d'un co-marquage de CD68 et de Ki67, qui est un marqueur de prolifération cellulaire [195]. Nous avons observé une diminution significative des marqueurs de prolifération sur les cellules spumeuses, chez les *Adcy9^{Gt/Gt}*. Ces derniers résultats nous ont permis de déterminer que l'athéroprotection en réponse à l'inactivation d'*Adcy9* était associée à une diminution de la prolifération des cellules spumeuses, diminuant leur accumulation.

La dysfonction endothéliale joue un rôle clé dans l'initiation du développement des lésions athérosclérotiques [15, 196]. Afin d'évaluer la fonction endothéliale, nous avons étudié la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Nous avons donc étudié la fonction endothéliale en réponse à l'inactivation d'*Adcy9*, afin de déterminer son implication dans l'initiation de l'athérosclérose. Nous avons étudié la fonction endothéliale de l'aorte et des artères fémorales en sachant que les voies de signalisation régulant la vasodilatation dépendante de l'endothélium sont différentes dans les deux types de vaisseaux. Dans l'aorte, le NO est le principal médiateur libéré par les cellules endothéliales provoquant la vasodilatation, alors que dans les aortes fémorales, l'EDH a un rôle plus important [21]. Or, une telle différence au niveau de la régulation de la vasodilatation pourrait être affectée différemment par l'inactivation d'*Adcy9*.

Nous avons tout d'abord étudié la fonction endothéliale dans l'aorte de nos animaux, l'athérosclérose s'y développant principalement chez la souris. La fonction endothéliale a été évaluée en réponse à une vasodilatation induite par l'acétylcholine (ACh). L'ACh est un agent vasodilatateur qui stimule les récepteurs muscariniques présents à la surface des cellules endothéliales et qui entraîne une réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium [197, 198]. Aucune différence dans la vasodilatation des souris WT et *Adcy9^{Gt/Gt}* en conditions basales n'a été détectée. L'aorte est une artère de conduction responsable de la conduction du sang du cœur vers les artères périphériques [199]. Les artères fémorales sont pour leur part caractérisées comme étant des artères de résistance et ont pour rôle [199] de réguler la perfusion des tissus en particulier en diminuant la pression de perfusion afin d'éviter des dommages tissulaires. [200]. Considérant sa différence notable avec l'aorte, nous avons également choisi d'étudier la fonction endothéliale de ce lit vasculaire, en réponse à l'inactivation d'*Adcy9*. Ainsi, une potentialisation de la vasodilatation a été observée dans les artères fémorales de nos animaux non traités, en réponse à l'inactivation d'*Adcy9*. Les vasodilatations observées chez les souris WT et les souris *Adcy9^{Gt/Gt}* étaient similaires, en présence d'un donneur de NO, le SNP [181]. La potentialisation observée chez les souris *Adcy9^{Gt/Gt}* était donc dépendante de la fonction endothéliale, et non pas de la sensibilité des cellules musculaires lisses au NO. Nous avons également étudié la réponse vasodilatatrice des souris *Adcy9^{Gt/Gt}* et WT en réponse au cisaillement, puisqu'en conditions homéostatiques, la réponse vasodilatatrice dépendante de l'endothélium est principalement induite par le flux sanguin [201]. Nous avons observé une tendance à une potentialisation de la vasodilatation chez les souris *Adcy9^{Gt/Gt}* en réponse au stimulus. L'inactivation d'*Adcy9* potentialise donc la fonction endothéliale.

La réponse vasodilatatrice a également été évaluée chez des animaux athérosclérotiques, afin d'étudier son évolution dans un contexte de développement de la maladie. La vasodilatation observée en réponse à l'ACh, dans les artères fémorales, était plus importante chez les animaux *Adcy9^{Gt/Gt}* que chez les WT. Cette potentialisation était également observée chez ces mêmes animaux, en présence de SNP. Ces résultats suggèrent que l'inactivation d'*Adcy9* modifierait la sensibilité des cellules musculaires vasculaires au

NO. L'étude de l'aorte de ces animaux, effectuée dans les mêmes conditions, a également rapporté des résultats similaires. Ces résultats nous ont ainsi permis de déterminer que les effets athéroprotecteurs de l'inactivation d'*Adcy9* sont également liés à une meilleure réponse vasodilatatrice.

Trois voies sont principalement caractérisées pour leur implication dans la vasodilatation dépendante de l'endothélium : la voie du NO, la voie des prostacyclines (PGI₂) et la voie de l'hyperpolarisation dépendante de l'endothélium (EDH) [27, 202]. Ainsi, nous avons utilisé des bloqueurs spécifiques de chacune de ces voies pour déterminer les voies de signalisation endothéliale impliquées dans les effets de l'inactivation d'*Adcy9* sur la vasodilatation dépendante de l'endothélium.

Le NO est l'une des molécules régulatrices du tonus vasculaire, et plus spécifiquement de la relaxation des cellules musculaires vasculaires, la plus étudiée [202]. Le L-NNA est un inhibiteur de la NO synthase [203]. En comparant avec et sans L-NNA, nous avons constaté une potentialisation des voies de signalisation endothéliale chez les *Adcy9*^{Gt/Gt} en comparaison aux WT. Cependant, en présence d'un stress dû au cisaillement d'un apport accru du flot sanguin, la diminution de la réponse vasodilatatrice n'était observable que chez les *Adcy9*^{Gt/Gt}.

Les prostacyclines, mais plus particulièrement PGI₂, qui sont un métabolite dérivé des cyclooxygénase (COX), sont une autre voie possible de vasorelaxation [27, 202]. Les PGI₂ sont relâchés en réponse à de nombreux stimuli, dont un stress de cisaillement [202]. Elles sont impliquées dans l'activation des AC, par l'activation des PKA suite à leur liaison sur des récepteurs des cellules musculaires lisses [202]. Nous avons ainsi évalué la réponse vasodilatatrice chez nos animaux en présence d'un bloqueur spécifique des COX, le meclofenamate [204]. Tout comme en présence de L-NNA, la réponse vasodilatatrice était diminuée chez les *Adcy9*^{Gt/Gt} seulement.

L'hyperpolarisation dépendante de l'endothélium (EDH) est un processus, indépendant du NO et de la PGI₂, rassemblant plusieurs voies de signalisation endothéliale et aboutissant à l'augmentation du potentiel de membrane des cellules musculaires lisses et responsables de la

vasodilatation dépendante de l'endothélium. On connaît leur existence sous la forme d'un facteur qui pourrait être un signal électrique ou encore une substance sécrétée par l'endothélium et qui provoquerait l'hyperpolarisation des cellules musculaires vasculaires lisses et ainsi une vasorelaxation [202, 205]. Ils sont également caractérisés pour permettre le relâchement de tiers médiateurs de régulation du tonus vasculaire [27]. Cette voie serait la principale voie sollicitée en réponse à une dysfonction de la voie de synthèse du NO [27, 202]. L'étude de l'expression d'*Adcy9* et la fonction endothéliale avec cette voie a été réalisée avec un cocktail de molécules pharmacologiques permettant de bloquer celle-ci (TRAM-34 et apamine) [206]. L'apamine et le TRAM-34 permettent d'inhiber les canaux potassium sensibles au calcium, qui sont responsables de l'hyperpolarisation potassium nécessaire à l'hyperpolarisation [207, 208]. À l'image de la réponse obtenue en présence de meclofenamate, seule la réponse vasodilatatrice des souris *Adcy9*^{Gt/Gt} était inhibée.

Nous avons recherché l'expression d'*Adcy9* dans les artères fémorales par *hybridation in situ*. Les effets athéroprotecteurs liés à l'inactivation d'*Adcy9* entraînent une augmentation de la fonction endothéliale. Ces résultats quant à l'effet de l'inactivation d'*Adcy9* sont appuyés par la confirmation de la localisation de l'expression de l'ARNm d'*Adcy9* dans les artères fémorales par la même méthodologie *in situ* précédemment utilisée. Les effets de l'inactivation d'*Adcy9* sur la régulation du tonus vasculaire sont associés.

Au cours de l'étude Dal-OUTCOMES, une variation du poids avait été observée chez les patients traités au dalcetrapib. Cette variation était dépendante du génotype d'ADCY9 exprimé par ces patients [181]. Ainsi, au cours de la caractérisation de notre modèle de souris, de nombreux paramètres physiologiques ont été mesurés. Nous avons observé que les animaux inactivés pour *Adcy9* prenaient davantage de poids que les animaux WT au cours du traitement athérogène. Ces différences représentaient une augmentation de près de 35%. Au stade initial de l'étude, soit avant l'introduction des conditions athérogènes, les valeurs basales du poids des animaux étaient similaires entre les deux groupes. Dans un premier temps, nous avons mesuré, le volume du tissu adipeux corporel total au moyen de la résonance magnétique (IRM), afin d'identifier la cause des différents poids chez nos animaux. Ces premières

mesures nous ont permis de déterminer que les souris *Adcy9^{Gt/Gt}* présentaient le double de volume de tissus adipeux que les souris WT.

Nous savons que les maladies cardiovasculaires sont associées à une adiposité viscérale plutôt que sous-cutanée. Il s'avérait donc important de caractériser les dépôts de tissus adipeux chez nos animaux. Nous avons émis une hypothèse quant à une hypertrophie des cellules adipeuses. L'ensemble des tissus a été subdivisé en quatre catégories, où il a été visuellement possible d'observer une augmentation dans leur volume. Nous avons mesuré la masse des différents dépôts de tissus adipeux en considérant tout d'abord que tous les tissus adipeux n'ont pas la même fonction. Les tissus interscapulaires contenant les tissus adipeux bruns et les tissus adipeux blancs se distinguent par leur rôle thermogénique et leur rôle de stockage lipidique, respectivement. Ainsi, nous avons pu observer une augmentation des tissus interscapulaire, inguinal, périrénal et épидидymal. Considérant l'augmentation des dépôts adipeux, nous avons procédé à une étude de la taille des cellules adipeuses du tissu épидидymal et du tissu interscapulaire au moyen de coupes histologiques. La quantification du marquage obtenu auprès des coupes effectuées nous a permis de déterminer qu'il y avait bien une hypertrophie des adipocytes chez les *Adcy9^{Gt/Gt}* par rapport aux WT. De plus, l'étude du tissu adipeux brun (interscapulaire) a démontré une augmentation également dans la taille des gouttelettes lipidiques. Ainsi, l'augmentation du poids des animaux est dépendante de l'augmentation des tissus adipeux, quel qu'il soit, de même que du volume des adipocytes. L'augmentation dans le volume du tissu adipeux peut être associée à une diminution de la sensibilité à l'insuline, entraînant ce qui est connu comme une résistance à l'insuline [209, 210]. Nous avons donc considéré le métabolisme du glucose chez nos animaux et nous avons dosé le glucose et les concentrations d'insuline plasmatiques, afin de déterminer si l'augmentation de la masse lipidique des animaux provoquait une diminution de leur sensibilité à l'insuline. Les données obtenues (non présentées) n'ont pas permis de distinguer une différence entre les animaux athérogéniques et les animaux contrôles. Les effets de l'inactivation d'*Adcy9* ne semblent donc pas associés à une augmentation d'une résistance à l'insuline, malgré une augmentation de la masse lipidique des souris *Adcy9^{Gt/Gt}*. Nous avons conclu que l'expression *Adcy9* était impliquée dans la régulation du poids et métabolisme du

tissu adipeux,

Nous avons tenté d'expliquer l'augmentation de la masse corporelle de nos souris *Adcy9^{Gt/Gt}* en mesurant leur consommation calorique quotidienne. Nous avons donc mesuré l'indice de consommation de nos animaux au cours du protocole athérogénique. L'indice de consommation représente un ratio d'un gain de masse corporelle sur l'apport calorique (g/100kcal) [211]. Nous avons observé une augmentation significative de cet indice de consommation chez les souris *Adcy9^{Gt/Gt}* et les WT respectivement. La régulation de la masse corporelle est assurée d'une part par la génétique, et d'une autre par des mécanismes endocrines [212]. Différentes hypothèses ont été émises sur le sujet, suggérant notamment une suractivité du système sympathique, qui serait influencée par l'expression d'adipokines comme la leptine, des cytokines sécrétées par les tissus adipeux [213-215]. Des hypothèses sur une thermorégulation déficiente nécessitant une consommation calorique accrue ont également été avancées [216]. Une suractivité du système sympathique est néanmoins peu susceptible d'être à l'origine de la variation du poids entre nos animaux *Adcy9^{Gt/Gt}* et WT. En effet, cette hypothèse est généralement associée avec une hypertension, mais également une résistance à l'insuline qui, tel que démontré, n'est pas présente chez nos animaux [217]. Nous savons néanmoins que la balance métabolique, qui assure le maintien du ratio de l'indice de consommation, est régulée par le système nerveux autonome [217]. Afin de déterminer l'influence de l'inactivation d'*Adcy9* sur la régulation de cette balance métabolique, nous avons tout d'abord mesuré le rythme cardiaque de nos deux groupes d'étude au moyen d'un ECG. Nos observations ont démontré une augmentation de la distance entre deux intervalles RR, qui se traduit par une diminution du rythme cardiaque chez les *Adcy9^{Gt/Gt}*. Ces résultats sont le reflet de ce qui a été rapporté récemment par l'équipe de Dessauer et al., où la perte d'expression d'*Adcy9* a entraîné une diminution du rythme cardiaque chez les animaux *AC9^{-/-}* [180]. Cette diminution du rythme cardiaque suggère une augmentation de l'action du système parasympathique, ce dernier étant impliqué dans la sécrétion de l'acétylcholine et induisant une diminution du rythme cardiaque [218].

La variabilité de la fréquence cardiaque (HRV) est une mesure donnant un indice sur

l'activité du système nerveux autonome (SNA), dont le système parasympathique fait partie [219]. Nous avons donc effectué une analyse de HRV, mais plus précisément de pNN(6), qui reflète plus particulièrement l'activité du système nerveux parasympathique [220-222]. Le pNN(6) est le pourcentage d'intervalle RR dont la durée est supérieure de 6 ms à la durée de l'intervalle RR normal [222]. La mesure de pNN(6) est basée sur la mesure de pNN(50) (50 millisecondes (ms)) utilisée chez l'homme. L'intervalle de 6 ms chez la souris a été précédemment mise au point par l'équipe de Babuty et al [222]. Cette mise au point est nécessaire considérant le rythme cardiaque nettement plus élevé retrouvé chez la souris, que chez l'homme, où un pNN de 50 ms est utilisé [222]. Cette mesure est représentée en pourcentage [222]. Or, nous avons observé une tendance à la hausse chez les *Adcy9^{Gt/Gt}* en comparaison aux WT, et ce, peu importe le moment de la journée. Cette tendance était cependant accentuée au cours de la nuit, où le pNN(6) était significativement plus élevé chez les *Adcy9^{Gt/Gt}* que chez les WT. Cette variation confirme une possible implication du système parasympathique dans la modulation de la fréquence cardiaque, en réponse à l'inactivation d'*Adcy9*.

Cette première étude a été réalisée avec des souris. En effet, les souris n'expriment pas la CETP et sont un modèle pour les patients traités au dalcetrapib, considérant l'effet inhibiteur de ce dernier sur l'activité de la CETP. Dans cette optique, nous avons introduit la CETP humaine chez nos animaux, afin de voir à l'interaction entre l'expression d'ADCY9 et la CETP. Les souris *Adcy9^{Gt/Gt}* ont été humanisées avec l'insertion du mini-gène de la CETP humaine. Nous avons soumis nos animaux doubles-mutants au même protocole athérogénique. Les analyses de concentration en PCSK9 et en cholestérol totaux que nous avons obtenue étaient similaires à ce qui avait été précédemment observé chez les souris WT et *Adcy9^{Gt/Gt}* (données non présentées). L'inhibition de l'expression des rLDL était également similaire à ce qui avait été précédemment rapporté avec les souris WT et *Adcy9^{Gt/Gt}* (données non présentées). Aux termes du protocole, nous avons quantifié les lésions athérosclérotiques chez les souris CETP (CETP^{WT}) et les CETP inactivées pour *Adcy9* (CETP^{GT}). La quantification des lésions athérosclérotiques nous a permis d'observer une similitude entre les deux génotypes de souris. Les souris CETP^{WT} avaient un pourcentage de surface de lésions

supérieur aux souris CETP^{GT}. En comparant ces données aux résultats précédemment obtenus chez les WT et les *Adcy9*^{Gt/Gt}, l'on dénotait des valeurs similaires entre les CETP^{WT}, les CETP^{GT} et les WT. Ainsi, ces données démontrent que les effets bénéfiques dus à l'inactivation d'*Adcy9* ne sont pas retrouvés en présence de l'expression de la CETP. Ces résultats suggèrent donc qu'*Adcy9* n'influence pas le développement de l'athérosclérose en présence de la CETP.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'absence d'effet de l'inactivation d'*Adcy9* sur le développement de l'athérosclérose, nous avons étudié la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans les artères fémorales des souris CETP^{WT} et CETP^{GT} suite au protocole athérogénique. La vasodilatation en réponse à l'ACh était similaire chez les CETP^{WT} et les CETP^{GT}. Nous avons cependant observé que la vasodilatation en présence de SNP demeurait similaire à ce qui avait été précédemment observé entre les WT et les *Adcy9*^{Gt/Gt}, où l'inactivation d'*Adcy9* potentialisait la vasorelaxation. Nous concluons que l'absence d'effet athéroprotecteur en présence de l'inactivation d'*Adcy9* est associée à l'absence de potentialisation de la fonction endothéliale. De plus l'augmentation de la vasodilatation au SNP chez les souris *Adcy9*^{Gt/Gt} en absence ou en présence de CETP est dissociée des effets de l'inactivation d'*Adcy9* sur l'athérosclérose.

Comme chez les souris *Adcy9*^{Gt/Gt} et les souris WT, nous avons également étudié la variation du poids chez les CETP^{WT} et CETP^{GT}. Cette analyse était motivée par la variation du poids qui avait été observée chez les patients traités au dalcetrapib et dépendant d'ADCY9. En absence de traitement, et donc en présence d'une activité CETP, les patients de l'étude Dal-OUTCOMES ne démontraient aucune différence significative. Nous avons observé que l'augmentation de la masse corporelle chez nos deux génotypes de souris était similaire tout au long du protocole athérogénique. Au sacrifice, la masse des souris CETP^{WT} et des CETP^{GT} était similaire. Ces masses représentaient une diminution significative à ce qui avait été auparavant observé chez les souris *Adcy9*^{Gt/Gt}. En concordance avec le poids des animaux, nous n'avons également observé aucune différence significative du volume de tissu adipeux corporel entre CETP^{WT} et CETP^{GT}. L'augmentation du poids des souris et du volume de tissu

adipeux corporel en réponse à l'inactivation d'*Adcy9* est absente chez des souris exprimant la CETP.

L'ensemble de résultats nous a ainsi permis de conclure dans un premier temps à une association entre l'inactivation du gène *Adcy9* et des effets athéroprotecteurs, régulant notamment la fonction endothéliale. De plus, nous avons également été en mesure de confirmer l'interaction qui avait été proposée suite au GWAS de l'étude Dal-OUTCOMES, entre ADCY9 et la CETP. En effet, les effets protecteurs d'*Adcy9* n'étant observables qu'en absence de la CETP, la corrélation est rendue possible avec les patients alors traités au dalcetrapib, leur CETP étant inhibée. De plus, la modulation du système nerveux autonome observée en réponse à l'inactivation d'*Adcy9* suggère un effet de la CETP sur le métabolisme lipoprotéique, en relation avec le système nerveux central (SNC). Des études préliminaires chez des souris WT, quant à l'interaction avec des lipoprotéines et le SNC ont été réalisées et ont permis d'observer un transport de HDL fluorescent, injecté par voie intraveineuse, au-delà de la barrière hématoencéphalique. Ces HDL ont par la suite été localisées au niveau du cerveau des souris. Ces premières données laissent ainsi à penser qu'une telle association existe. Davantage d'études en ce sens devront être réalisées.

Conclusion

Sommes toutes, notre étude a démontré qu'*Adcy9* jouait un rôle crucial dans le développement de l'athérosclérose. L'inactivation d'*Adcy9* est athéroprotectrice. Ces effets athéroprotecteurs ne sont observables qu'en absence de l'activité CETP. Les effets athéroprotecteurs en réponse à l'inactivation d'*Adcy9* sont associés à une potentialisation de la fonction endothéliale, à une diminution de la prolifération des cellules spumeuses et de leur accumulation dans la paroi vasculaire. Nous avons également observé une modulation bénéfique de l'activité du système nerveux autonome. Enfin, *Adcy9* est impliqué dans le contrôle du poids associé à une augmentation des tissus adipeux.

L'ensemble de ces résultats permet ainsi de soutenir que l'expression d'ADCY9 joue un rôle crucial dans le développement de l'athérosclérose. La compréhension de l'interaction entre ADCY9 et la CETP est une nécessité dans le cheminement d'une amélioration du traitement de l'athérosclérose par les inhibiteurs de la CETP. Ainsi, la recherche fondamentale portant sur les souris *Adcy9^{Gt/Gt}* et exprimant la CETP doit se poursuivre. Afin de mieux déceler les subtilités entourant l'interaction entre les deux protéines, des analyses plus poussées quant à la régulation du métabolisme lipidique et la modulation du SNA deviennent nécessaires.

Ainsi, l'étude des mécanismes biochimiques impliqués dans la potentialisation endothéliale se poursuivra. De plus, l'impact du métabolisme des HDL sur l'activité de SNA sera également investigué. Enfin, l'implication d'*Adcy9* sur l'adhésion cellulaire sera également étudiée, afin de déterminer son rôle dans l'infiltration des cellules immunitaires à l'endothélium.

Perspectives

Le SNP rs1967309 en est un non codant au sein du génome. L'avancement des travaux ne nous ont pas permis de comprendre l'interaction entre *Adcy9* et la CETP. Davantage de travaux sont ainsi nécessaires. Ainsi, des transferts de moelle osseuse, des essais d'adhésion cellulaire et des essais de migration avec des macrophages vont être réalisés sur notre modèle murin unificateur exprimant la CETP et étant inactivé pour *Adcy9* (CETP^{GT}). Ces travaux visent notamment à identifier des pistes moléculaires visant à vérifier le lien qui existe entre AC9 et la CETP et possiblement à identifier un type cellulaire où l'expression de la variance du SNP aurait un effet.

Des travaux initiaux ont été réalisés sur notre modèle murin traité au dalcetrapib. Il nous a été impossible de mimer chez la souris les effets sur les HDL qui avaient été observés chez l'homme, en présence du dalcetrapib. Considérant ces résultats, nos travaux se poursuivront donc dans un modèle de lapin, afin de tenter d'étudier l'effet du dalcetrapib, en relation avec l'expression d'*Adcy9*. Le lapin est un modèle intéressant dans l'étude de l'athérosclérose, son utilisation étant grandement décrite dans la littérature. Il s'agit d'un modèle également utilisé dans d'autres études sur différents inhibiteurs de la CETP. Enfin, dans un objectif de reproduire ce qui est observé chez l'homme, ces animaux seront également traités avec des statines, tout comme chez les sujets humains.

De plus, nos prochains travaux visent à mieux comprendre le rôle d'*Adcy9* dans la production d'AMPC. Cet aspect en est un important, considérant que le cholestérol membranaire modifie l'activité des protéines membranaires [223]. Nous avons posé l'hypothèse que la CETP pourrait modifier le contenu en cholestérol des membranes. Ainsi, la présence d'un inhibiteur de la CETP pourrait changer le contenu en protéine. Cet aspect sera étudié plus en détail dans divers tissus d'intérêts, tels que l'aorte, les tissus adipeux et le cerveau.

Enfin, le rôle du système nerveux autonome sera étudié plus attentivement, afin de voir à son rôle dans le contrôle de la balance énergétique, notamment au niveau de l'hypothalamus.

Cette étude chez les souris CETP^{GT} nous permettra de déterminer si l'expression de la CETP change l'effet de l'inactivation d'*Adcy9* sur l'activité du SNA.

Bibliographie

1. Faxon, D.P., V. Fuster, P. Libby, J.A. Beckman, W.R. Hiatt, R.W. Thompson, . . . J. Loscalzo. (2004). Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group III: pathophysiology. *Circulation*, 109(21), p. 2617-25.
2. Ballantyne, C.M., J.H. O'Keefe, et A.M. Gotto. (2009). *Dyslipidemia & Atherosclerosis Essentials 2009*. Jones & Bartlett Learning.
3. Insull, W. (2009). The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *The American Journal of Medicine*, 122(1), p. S3-S14.
4. Hansson, G.K. (2005). Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*, 352(16), p. 1685-95.
5. Konukoglu, D. et H. Uzun. (2016). Endothelial Dysfunction and Hypertension. *Adv Exp Med Biol*.
6. Sacchi, G., E. Weber, et L. Comparini. (1990). Histological framework of lymphatic vasa vasorum of major arteries: an experimental study. *Lymphology*, 23(3), p. 135-9.
7. Drozd, K., D. Janczak, P. Dziegiel, M. Podhorska, D. Patrzalek, P. Ziolkowski, . . . A. Szuba. (2008). Adventitial lymphatics of internal carotid artery in healthy and atherosclerotic vessels. *Folia Histochem Cytobiol*, 46(4), p. 433-6.
8. Majesky, M.W., X.R. Dong, V. Hognlund, W.M. Mahoney, Jr., et G. Daum. (2011). The adventitia: a dynamic interface containing resident progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(7), p. 1530-9.
9. Tonar, Z., P. Tomasek, P. Loskot, J. Janacek, M. Kralickova, et K. Witter. (2016). Vasa vasorum in the tunica media and tunica adventitia of the porcine aorta. *Ann Anat*, 205, p. 22-36.
10. Mulligan-Kehoe, M.J. et M. Simons. (2014). Vasa Vasorum in Normal and Diseased Arteries. *Circulation*, 129(24), p. 2557.
11. Stary, H.C., D.H. Blankenhorn, A.B. Chandler, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. Richardson, . . . et al. (1992). A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb*, 12(1), p. 120-34.
12. Davignon, J. et P. Ganz. (2004). Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, 109(23 Suppl 1), p. III27-32.
13. Hadi, H.A.R., C.S. Carr, et J. Al Suwaidi. (2005). Endothelial Dysfunction: Cardiovascular Risk Factors, Therapy, and Outcome. *Vasc Health Risk Manag*, 1(3), p. 183-98.
14. Davies, P.F. (2009). Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nature clinical practice. Cardiovascular medicine*, 6(1), p. 16-26.
15. Tousoulis, D., C. Simopoulou, N. Papageorgiou, E. Oikonomou, G. Hatzis, G. Siasos, . . . C. Stefanadis. (2014). Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacol Ther*, 144(3), p. 253-67.
16. Vanhoutte, P.M., Y. Zhao, A. Xu, et S.W.S. Leung. (2016). Thirty Years of Saying

- NO. *Circulation Research*, 119(2), p. 375.
17. Murad, F. (2011). Nitric Oxide: The Coming of the Second Messenger. *Rambam Maimonides Medical Journal*, 2(2), p. e0038.
 18. Feil, R., S.M. Lohmann, H. de Jonge, U. Walter, et F. Hofmann. (2003). Cyclic GMP-Dependent Protein Kinases and the Cardiovascular System. *Circulation Research*, 93(10), p. 907.
 19. Zhang, Y., S.-J. Wang, Z.-H. Han, Y.-Q. Li, J.-H. Xue, D.-F. Gao, . . . C.-X. Wang. (2014). PI3K/AKT signaling pathway plays a role in enhancement of eNOS activity by recombinant human angiotensin converting enzyme 2 in human umbilical vein endothelial cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(11), p. 8112-8117.
 20. Li, R., K. Cui, K. Liu, H. Li, Y. Zhang, X. Liu, . . . K. Rao. (2017). Metabolic syndrome in rats is associated with erectile dysfunction by impairing PI3K/Akt/eNOS activity. *Scientific Reports*, 7(1), p. 13464.
 21. Nicholson, K.M. et N.G. Anderson. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*, 14(5), p. 381-395.
 22. Roviezzo, F., S. Cuzzocrea, A. Di Lorenzo, V. Brancaleone, E. Mazzon, R. Di Paola, . . . G. Cirino. (2007). Protective role of PI3-kinase-Akt-eNOS signalling pathway in intestinal injury associated with splanchnic artery occlusion shock. *British Journal of Pharmacology*, 151(3), p. 377-383.
 23. Li, M.W., M.O. Mian, T. Barhoumi, A. Rehman, K. Mann, P. Paradis, et E.L. Schiffrin. (2013). Endothelin-1 overexpression exacerbates atherosclerosis and induces aortic aneurysms in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(10), p. 2306-15.
 24. Loscalzo, J. (2000). What we know and don't know about L-arginine and NO. *Circulation*, 101(18), p. 2126-9.
 25. Li, H. et U. Forstermann. (2013). Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol*, 13(2), p. 161-7.
 26. Wilcox, C.S. (2012). Asymmetric Dimethylarginine and Reactive Oxygen Species. *Hypertension*, 59(2), p. 375.
 27. Vanhoutte, P.M., H. Shimokawa, M. Feletou, et E.H.C. Tang. (2017). Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. *Acta Physiologica*, 219(1), p. 22-96.
 28. Heiss, E.H. et V.M. Dirsch. (2014). Regulation of eNOS enzyme activity by posttranslational modification. *Curr Pharm Des*, 20(22), p. 3503-13.
 29. Dulce, R.A., I.H. Schulman, et J.M. Hare. (2011). S-glutathionylation: a redox-sensitive switch participating in nitroso-redox balance. *Circ Res*, 108(5), p. 531-3.
 30. Servier. (2017). Banque d'images PowerPoint. Repéré à <http://servier.fr/smart/banque-dimages-powerpoint>.
 31. Stapleton, P.A., A.G. Goodwill, M.E. James, R.W. Brock, et J.C. Frisbee. (2010). Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. *J Inflamm (Lond)*, 7, p. 54.
 32. Braunwald, E., D.L. Mann, D.P. Zipes, et P. Libby. (2015). *Braunwald's heart disease : a textbook of cardiovascular medicine*. Philadelphia: Elsevier Saunders.

33. Furnkranz, A., A. Schober, V.N. Bochkov, P. Bashtrykov, G. Kronke, A. Kadl, . . . N. Leitinger. (2005). Oxidized phospholipids trigger atherogenic inflammation in murine arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(3), p. 633-8.
34. Lawrence, M.B. et T.A. Springer. (1993). Neutrophils roll on E-selectin. *The Journal of Immunology*, 151(11), p. 6338-6346.
35. Ley, K. (2003). The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med*, 9(6), p. 263-8.
36. Rozenberg, I., S.H. Sluka, P. Mocharla, A. Hallenberg, P. Rotzius, J. Boren, . . . F.C. Tanner. (2011). Deletion of L-selectin increases atherosclerosis development in ApoE^{-/-} mice. *PLoS One*, 6(7).
37. van Leeuwen, M., M.J. Gijbels, A. Duijvestijn, M. Smook, M.J. van de Gaar, P. Heeringa, . . . J.W. Tervaert. (2008). Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(1), p. 84-9.
38. Libby, P. et M. Aikawa. (2001). Evolution and stabilization of vulnerable atherosclerotic plaques. *Jpn Circ J*, 65(6), p. 473-9.
39. Moore, K.J. et I. Tabas. (2011). Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*, 145(3), p. 341-55.
40. Gerhardt, T. et K. Ley. (2015). Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovascular Research*, 107(3), p. 321-330.
41. Ley, K., Y.I. Miller, et C.C. Hedrick. (2011). Monocyte and Macrophage Dynamics during Atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(7), p. 1506-1516.
42. Chistiakov, D.A., Y.V. Bobryshev, et A.N. Orekhov. (2015). Neutrophil's weapons in atherosclerosis. *Exp Mol Pathol*, 99(3), p. 663-71.
43. Ionita, M.G., P. van den Borne, L.M. Catanzariti, F.L. Moll, J.-P.P.M. de Vries, G. Pasterkamp, . . . D.P.V. de Kleijn. (2010). High Neutrophil Numbers in Human Carotid Atherosclerotic Plaques Are Associated With Characteristics of Rupture-Prone Lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(9), p. 1842.
44. Taleb, S. (2016). Inflammation in atherosclerosis. *Archives of Cardiovascular Diseases*, 109(12), p. 708-715.
45. Mallat, Z., S. Taleb, H. Ait-Oufella, et A. Tedgui. (2009). The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *J Lipid Res*, 50 Suppl, p. S364-9.
46. King, V.L., L.A. Cassis, et A. Daugherty. (2007). Interleukin-4 Does Not Influence Development of Hypercholesterolemia or Angiotensin II-Induced Atherosclerotic Lesions in Mice. *The American Journal of Pathology*, 171(6), p. 2040-2047.
47. King, V.L., S.J. Szilvassy, et A. Daugherty. (2002). Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(3), p. 456-61.
48. Lewis, M.J., T.H. Malik, M.R. Ehrenstein, J.J. Boyle, M. Botto, et D.O. Haskard. (2009). Immunoglobulin M is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation*, 120(5), p. 417-26.
49. Inoue, T., H. Komoda, M. Nonaka, M. Kameda, T. Uchida, et K. Node. (2008). Interleukin-8 as an independent predictor of long-term clinical outcome in patients

- with coronary artery disease. *Int J Cardiol*, 124(3), p. 319-25.
50. Taleb, S., M. Romain, B. Ramkhelawon, C. Uyttenhove, G. Pasterkamp, O. Herbin, . . . Z. Mallat. (2009). Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(10), p. 2067.
 51. Sage, A.P. et Z. Mallat. (2014). Multiple potential roles for B cells in atherosclerosis. *Annals of Medicine*, 46(5), p. 297-303.
 52. Ait-Oufella, H., O. Herbin, J.-D. Bouaziz, C.J. Binder, C. Uyttenhove, L. Laurans, . . . Z. Mallat. (2010). B cell depletion reduces the development of atherosclerosis in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(8), p. 1579.
 53. Tsiantoulas, D., C.J. Diehl, J.L. Witztum, et C.J. Binder. (2014). B Cells and Humoral Immunity in Atherosclerosis. *Circ Res*, 114(11), p. 1743-56.
 54. Perry, H.M., T.P. Bender, et C.A. McNamara. (2012). B cell subsets in atherosclerosis. *Front Immunol*, 3, p. 373.
 55. Hu, D., S.K. Mohanta, C. Yin, L. Peng, Z. Ma, P. Srikakulapu, . . . A.J. Habenicht. (2015). Artery Tertiary Lymphoid Organs Control Aorta Immunity and Protect against Atherosclerosis via Vascular Smooth Muscle Cell Lymphotoxin beta Receptors. *Immunity*, 42(6), p. 1100-15.
 56. Mandl, M., S. Schmitz, C. Weber, et M. Hristov. (2014). Characterization of the CD14⁺⁺CD16⁺ Monocyte Population in Human Bone Marrow. *PLOS ONE*, 9(11), p. e112140.
 57. Ginhoux, F. et S. Jung. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14(6), p. 392-404.
 58. Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D.N. Hart, . . . M.B. Lutz. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116(16), p. e74.
 59. Wong, K.L., J.J.-Y. Tai, W.-C. Wong, H. Han, X. Sem, W.-H. Yeap, . . . S.-C. Wong. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, 118(5), p. e16.
 60. Mukherjee, R., P. Kanti Barman, P. Kumar Thatoi, R. Tripathy, B. Kumar Das, et B. Ravindran. (2015). Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. 5, p. 13886.
 61. Idzkowska, E., A. Eljaszewicz, P. Miklasz, W.J. Musial, A.M. Tycinska, et M. Moniuszko. (2015). The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 82(3), p. 163-173.
 62. Chimen, M., C.M. Yates, H.M. McGettrick, L.S.C. Ward, M.J. Harrison, B. Apta, . . . G.E. Rainger. (2017). Monocyte subsets co-regulate inflammatory responses by integrated signalling through TNF and IL-6 at the endothelial cell interface. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 198(7), p. 2834-2843.
 63. Gabay, C. (2006). Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy*, 8(Suppl 2), p. S3-S3.
 64. Italiani, P. et D. Boraschi. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers in Immunology*, 5, p. 514.

65. Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, et M. Locati. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, 25(12), p. 677-86.
66. Porcheray, F., S. Viaud, A.C. Rimaniol, C. Leone, B. Samah, N. Dereuddre-Bosquet, . . . G. Gras. (2005). Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol*, 142(3), p. 481-9.
67. Wang, N., H. Liang, et K. Zen. (2014). Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance. *Frontiers in Immunology*, 5, p. 614.
68. Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801), p. 233-41.
69. Robbins, C.S., I. Hilgendorf, G.F. Weber, I. Theurl, Y. Iwamoto, J.L. Figueiredo, . . . F.K. Swirski. (2013). Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med*, 19(9), p. 1166-72.
70. Allahverdian, S., A.C. Chehroudi, B.M. McManus, T. Abraham, et G.A. Francis. (2014). Contribution of Intimal Smooth Muscle Cells to Cholesterol Accumulation and Macrophage-Like Cells in Human Atherosclerosis. *Circulation*, 129(15), p. 1551.
71. Bennett, M.R., S. Sinha, et G.K. Owens. (2016). Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circulation Research*, 118(4), p. 692.
72. Rudijanto, A. (2007). The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones*, 39(2), p. 86-93.
73. Chang, S., S. Song, J. Lee, J. Yoon, J. Park, S. Choi, . . . C. Choi. (2014). Phenotypic Modulation of Primary Vascular Smooth Muscle Cells by Short-Term Culture on Micropatterned Substrate. *PLOS ONE*, 9(2), p. e88089.
74. Lu, P., K. Takai, V.M. Weaver, et Z. Werb. (2011). Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12), p. 10.1101/cshperspect.a005058 a005058.
75. Beamish, J.A., P. He, K. Kottke-Marchant, et R.E. Marchant. (2010). Molecular Regulation of Contractile Smooth Muscle Cell Phenotype: Implications for Vascular Tissue Engineering. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 16(5), p. 467-491.
76. Libby, P., P.M. Ridker, et G.K. Hansson. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473(7347), p. 317-325.
77. Childs, B.G., D.J. Baker, T. Wijshake, C.A. Conover, J. Campisi, et J.M. van Deursen. (2016). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science*, 354(6311), p. 472.
78. Marieb, E.N., K. Hoehn, et K.N. Hoehn. (2014). *Human Anatomy and Physiology*. 10th ed. Boston: Pearson Education.
79. van Deursen, J.M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509(7501), p. 439-446.
80. Gonzalez, L. et B.L. Trigatti. (2017). Macrophage Apoptosis and Necrotic Core Development in Atherosclerosis: A Rapidly Advancing Field with Clinical Relevance to Imaging and Therapy. *Canadian Journal of Cardiology*, 33(3), p. 303-312.
81. Fisher, E.A. (2016). Regression of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 36(2), p. 226.
82. Nathan, C. et A. Ding. (2010). Nonresolving Inflammation. *Cell*, 140(6), p. 871-882.
83. Moore, K., F. Sheedy, et E. Fisher. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic

- balance. *Nature reviews. Immunology*, 13(10), p. 709-721.
84. Feig, J.E. (2014). Regression of Atherosclerosis: Insights from Animal and Clinical Studies. *Annals of global health*, 80(1), p. 13-23.
 85. Llodra, J., V. Angeli, J. Liu, E. Trogan, E.A. Fisher, et G.J. Randolph. (2004). Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(32), p. 11779-84.
 86. Rong, J.X., J. Li, E.D. Reis, R.P. Choudhury, H.M. Dansky, V.I. Elmalem, . . . E.A. Fisher. (2001). Elevating High-Density Lipoprotein Cholesterol in Apolipoprotein E-Deficient Mice Remodels Advanced Atherosclerotic Lesions by Decreasing Macrophage and Increasing Smooth Muscle Cell Content. *Circulation*, 104(20), p. 2447.
 87. Rayner, K.J., F.J. Sheedy, C.C. Esau, F.N. Hussain, R.E. Temel, S. Parathath, . . . K.J. Moore. (2011). Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest*, 121(7), p. 2921-31.
 88. Adorni, M.P., F. Zimetti, J.T. Billheimer, N. Wang, D.J. Rader, M.C. Phillips, et G.H. Rothblat. (2007). The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J Lipid Res*, 48(11), p. 2453-62.
 89. Wang, X., H.L. Collins, M. Ranalletta, I.V. Fuki, J.T. Billheimer, G.H. Rothblat, . . . D.J. Rader. (2007). Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest*, 117(8), p. 2216-24.
 90. Shah, P.K., J. Yano, O. Reyes, K.Y. Chyu, S. Kaul, C.L. Bisgaier, . . . B. Cercek. (2001). High-dose recombinant apolipoprotein A-I(milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein e-deficient mice. Potential implications for acute plaque stabilization. *Circulation*, 103(25), p. 3047-50.
 91. Nissen, S.E., T. Tsunoda, E.M. Tuzcu, P. Schoenhagen, C.J. Cooper, M. Yasin, . . . R. Kerensky. (2003). Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA*, 290(17), p. 2292-300.
 92. Ballantyne, C.M. (2014). *Clinical Lipidology: A Companion to Braunwald's Heart Disease E-Book*. 1st ed. Philadelphia: Elsevier Health Sciences.
 93. Havel, R.J. (1975). Lipoproteins and lipid transport. *Adv Exp Med Biol*, 63, p. 37-59.
 94. Cooper, A.D. (1997). Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res*, 38(11), p. 2173-92.
 95. Ginsberg, H.N. (1998). Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 27(3), p. 503-19.
 96. Superko, H.R., L. Pendyala, P.T. Williams, K.M. Momary, S.B. King Iii, et B.C. Garrett. (2012). High-density lipoprotein subclasses and their relationship to cardiovascular disease. *Journal of Clinical Lipidology*, 6(6), p. 496-523.
 97. Arts, E., J. Fransen, H. Lemmers, A. Stalenhoef, L. Joosten, P. van Riel, et C.D. Popa. (2012). High-density lipoprotein cholesterol subfractions HDL2 and HDL3 are reduced in women with rheumatoid arthritis and may augment the cardiovascular risk of women with RA: a cross-sectional study. *Arthritis Research & Therapy*, 14(3), p.

- R116-R116.
98. Duong, P.T., G.L. Weibel, S. Lund-Katz, G.H. Rothblat, et M.C. Phillips. (2008). Characterization and properties of pre β -HDL particles formed by ABCA1-mediated cellular lipid efflux to apoA-I. *Journal of Lipid Research*, 49(5), p. 1006-1014.
 99. Kontush, A. et M.J. Chapman. (2011). *High-Density Lipoproteins: Structure, Metabolism, Function and Therapeutics*. Wiley.
 100. Brundert, M., A. Ewert, J. Heeren, B. Behrendt, R. Ramakrishnan, H. Greten, . . . F. Rinninger. (2005). Scavenger Receptor Class B Type I Mediates the Selective Uptake of High-Density Lipoprotein-Associated Cholesteryl Ester by the Liver in Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 25(1), p. 143-148.
 101. Kaur, S.C. (2006). *Biochemistry of Atherosclerosis*. Springer US.
 102. Yancey, P.G., A.E. Bortnick, G. Kellner-Weibel, M. de la Llera-Moya, M.C. Phillips, et G.H. Rothblat. (2003). Importance of Different Pathways of Cellular Cholesterol Efflux. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(5), p. 712.
 103. Phillips, M.C. (2014). Molecular Mechanisms of Cellular Cholesterol Efflux. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(35), p. 24020-24029.
 104. Yvan-Charvet, L., N. Wang, et A.R. Tall. (2010). The role of HDL, ABCA1 and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 30(2), p. 139-143.
 105. Sandhofer, A., S. Kaser, A. Ritsch, M. Laimer, J. Engl, B. Paulweber, . . . C.F. Ebenbichler. (2006). Cholesteryl Ester Transfer Protein in Metabolic Syndrome. *Obesity*, 14(5), p. 812-818.
 106. Davignon, J. et R. Dufour. (2007). *Primary Hyperlipidemias: An Atlas of Investigation and Diagnosis*. Clinical Publishing.
 107. Linton, M.F., H. Tao, E.F. Linton, et P.G. Yancey. (2017). SR-BI: A Multifunctional Receptor in Cholesterol Homeostasis and Atherosclerosis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(6), p. 461-472.
 108. Heinecke, J.W. (2012). The not-so-simple HDL story: A new era for quantifying HDL and cardiovascular risk? *Nat Med*, 18(9), p. 1346-1347.
 109. Tall, A.R. et L. Yvan-Charvet. (2015). Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 15(2), p. 104-116.
 110. Feig, J.E., B. Hewing, J.D. Smith, S.L. Hazen, et E.A. Fisher. (2014). High-Density Lipoprotein and Atherosclerosis Regression. *Circulation Research*, 114(1), p. 205.
 111. Fisher, E.A., J.E. Feig, B. Hewing, S.L. Hazen, et J.D. Smith. (2012). HDL Function, Dysfunction, and Reverse Cholesterol Transport. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(12), p. 2813-2820.
 112. Badimon, J.J., L. Badimon, et V. Fuster. (1990). Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *Journal of Clinical Investigation*, 85(4), p. 1234-1241.
 113. Parolini, C., M. Marchesi, P. Lorenzon, M. Castano, E. Balconi, L. Miragoli, . . . G. Chiesa. (2008). Dose-related effects of repeated ETC-216 (recombinant apolipoprotein A-I Milano/1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine complexes) administrations on rabbit lipid-rich soft plaques: in vivo assessment by intravascular ultrasound and magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*, 51(11), p. 1098-103.

114. Feig, J.E., J.X. Rong, R. Shamir, M. Sanson, Y. Vengrenyuk, J. Liu, . . . E.A. Fisher. (2011). HDL promotes rapid atherosclerosis regression in mice and alters inflammatory properties of plaque monocyte-derived cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(17), p. 7166-71.
115. Khera, A.V., M. Cuchel, M. de la Llera-Moya, A. Rodrigues, M.F. Burke, K. Jafri, . . . D.J. Rader. (2011). Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*, 364(2), p. 127-135.
116. Kingwell, B.A., M.J. Chapman, A. Kontush, et N.E. Miller. (2014). HDL-targeted therapies: progress, failures and future. *Nat Rev Drug Discov*, 13(6), p. 445-464.
117. Schwartz, G.G., A.G. Olsson, M. Abt, C.M. Ballantyne, P.J. Barter, J. Brumm, . . . O.I. dal. (2012). Effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary syndrome. *N Engl J Med*, 367(22), p. 2089-99.
118. Rohatgi, A., A. Khera, J.D. Berry, E.G. Givens, C.R. Ayers, K.E. Wedin, . . . P.W. Shaul. (2014). HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *N Engl J Med*, 371(25), p. 2383-93.
119. Lee, Y.T., H.Y. Lin, Y.W.F. Chan, K.H.C. Li, O.T.L. To, B.P. Yan, . . . G. Tse. (2017). Mouse models of atherosclerosis: a historical perspective and recent advances. *Lipids in Health and Disease*, 16, p. 12.
120. Daugherty, A., A.R. Tall, M.J.A.P. Daemen, E. Falk, E.A. Fisher, G. García-Cardena, . . . R. Virmani. (2017). Recommendation on Design, Execution, and Reporting of Animal Atherosclerosis Studies: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation Research*.
121. Getz, G.S. et C.A. Reardon. (2012). Animal Models of Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(5), p. 1104-1115.
122. Hall, B., A. Limaye, et A.B. Kulkarni. (2009). Overview: Generation of Gene Knockout Mice. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*, CHAPTER, p. Unit-19.1217.
123. Ishibashi, S., M.S. Brown, J.L. Goldstein, R.D. Gerard, R.E. Hammer, et J. Herz. (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*, 92(2), p. 883-93.
124. Gordon, S.M., H. Li, X. Zhu, A.S. Shah, L.J. Lu, et W.S. Davidson. (2015). A Comparison of the Mouse and Human Lipoproteome: Suitability of the Mouse Model for Studies of Human Lipoproteins. *Journal of proteome research*, 14(6), p. 2686-2695.
125. Lo Sasso, G., W.K. Schlage, S. Boué, E. Veljkovic, M.C. Peitsch, et J. Hoeng. (2016). The Apoe(-/-) mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *Journal of Translational Medicine*, 14, p. 146.
126. van den Maagdenberg, A.M., M.H. Hofker, P.J. Krimpenfort, I. de Bruijn, B. van Vlijmen, H. van der Boom, . . . R.R. Frants. (1993). Transgenic mice carrying the apolipoprotein E3-Leiden gene exhibit hyperlipoproteinemia. *J Biol Chem*, 268(14), p. 10540-5.
127. Zadelaar, S., R. Kleemann, L. Verschuren, J. de Vries-Van der Weij, J. van der Hoorn, H.M. Princen, et T. Kooistra. (2007). Mouse Models for Atherosclerosis and

- Pharmaceutical Modifiers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(8), p. 1706.
128. van Vlijmen, B.J., A.M. van den Maagdenberg, M.J. Gijbels, H. van der Boom, H. HogenEsch, R.R. Frants, . . . L.M. Havekes. (1994). Diet-induced hyperlipoproteinemia and atherosclerosis in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice. *Journal of Clinical Investigation*, 93(4), p. 1403-1410.
 129. de Vries-van der Weij, J., S. Zadelaar, K. Toet, L.M. Havekes, T. Kooistra, et P.C. Rensen. (2009). Human CETP aggravates atherosclerosis by increasing VLDL-cholesterol rather than by decreasing HDL-cholesterol in APOE*3-Leiden mice. *Atherosclerosis*, 206(1), p. 153-8.
 130. Tanigawa, H., J.T. Billheimer, J.-i. Tohyama, Y. Zhang, G. Rothblat, et D.J. Rader. (2007). Expression of Cholesteryl Ester Transfer Protein in Mice Promotes Macrophage Reverse Cholesterol Transport. *Circulation*, 116(11), p. 1267.
 131. Jiang, X.C., L.B. Agellon, A. Walsh, J.L. Breslow, et A. Tall. (1992). Dietary cholesterol increases transcription of the human cholesteryl ester transfer protein gene in transgenic mice. Dependence on natural flanking sequences. *Journal of Clinical Investigation*, 90(4), p. 1290-1295.
 132. Barter, P.J., S.J. Nicholls, J.J.P. Kastelein, et K.-A. Rye. (2015). Is Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition an Effective Strategy to Reduce Cardiovascular Risk? *Circulation*, 132(5), p. 423.
 133. Plump, A.S., L. Masucci-Magoulas, C. Bruce, C.L. Bisgaier, J.L. Breslow, et A.R. Tall. (1999). Increased atherosclerosis in ApoE and LDL receptor gene knock-out mice as a result of human cholesteryl ester transfer protein transgene expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19(4), p. 1105-10.
 134. Marotti, K.R., C.K. Castle, T.P. Boyle, A.H. Lin, R.W. Murray, et G.W. Melchior. (1993). Severe atherosclerosis in transgenic mice expressing simian cholesteryl ester transfer protein. *Nature*, 364(6432), p. 73-5.
 135. Hildebrand, R.B., B. Lammers, I. Meurs, S.J.A. Korporaal, W. De Haan, Y. Zhao, . . . M. Van Eck. (2010). Restoration of High-Density Lipoprotein Levels by Cholesteryl Ester Transfer Protein Expression in Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) Knockout Mice Does Not Normalize Pathologies Associated With SR-BI Deficiency. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(7), p. 1439.
 136. MacLean, P.S., J.F. Bower, S. Vadlamudi, J.N. Osborne, J.F. Bradfield, H.W. Burden, . . . H.A. Barakat. (2003). Cholesteryl Ester Transfer Protein Expression Prevents Diet-Induced Atherosclerotic Lesions in Male db/db Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(8), p. 1412.
 137. Föger, B., M. Chase, M.J. Amar, B.L. Vaisman, R.D. Shamburek, B. Paigen, . . . R.F. Hoyt. (1999). Cholesteryl ester transfer protein corrects dysfunctional high density lipoproteins and reduces aortic atherosclerosis in lecithin cholesterol acyltransferase transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, 274(52), p. 36912-36920.
 138. Masucci-Magoulas, L., I.J. Goldberg, C.L. Bisgaier, H. Serajuddin, O.L. Francone, J.L. Breslow, et A.R. Tall. (1997). A Mouse Model with Features of Familial Combined Hyperlipidemia. *Science*, 275(5298), p. 391.
 139. Bjørklund, M.M., A.K. Hollensen, M.K. Hagensen, F. Dagnæs-Hansen, C.

- Christoffersen, J.G. Mikkelsen, et J.F. Bentzon. (2014). Induction of Atherosclerosis in Mice and Hamsters Without Germline Genetic Engineering. *Circulation Research*, 114(11), p. 1684.
140. Roche-Molina, M., D. Sanz-Rosa, F.M. Cruz, J. García-Prieto, S. López, R. Abia, . . . J.A. Bernal. (2014). Induction of Sustained Hypercholesterolemia by Single Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Transfer of Mutant hPCSK9. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(1), p. 50.
141. Goldstein, J.L. et M.S. Brown. (1987). Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation*, 76(3), p. 504-7.
142. Goldstein, J.L. et M.S. Brown. (2009). History of Discovery: The LDL Receptor. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(4), p. 431-438.
143. Getz, G.S. et C.A. Reardon. (2009). Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *J Lipid Res*, 50 Suppl, p. S156-61.
144. Kresge, N., R.D. Simoni, et R.L. Hill. (2005). Earl W. Sutherland's Discovery of Cyclic Adenine Monophosphate and the Second Messenger System. *Journal of Biological Chemistry*, 280(42), p. e39-e39.
145. Rall, T.W. et E.W. Sutherland. (1958). Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. *J Biol Chem*, 232(2), p. 1065-76.
146. Siegel, G.J. et B.W. Agranoff. (1999). *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*. Lippincott Williams & Wilkins.
147. Teixeira, H.M., N.M. Alcantara-Neves, M. Barreto, C.A. Figueiredo, et R.S. Costa. (2017). Adenylyl cyclase type 9 gene polymorphisms are associated with asthma and allergy in Brazilian children. *Mol Immunol*, 82, p. 137-145.
148. Halls, M.L. et D.M.F. Cooper. (2011). Regulation by Ca(2+)-Signaling Pathways of Adenylyl Cyclases. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(1), p. a004143.
149. Linder, J.U. et J.E. Schultz. (2003). The class III adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell Signal*, 15(12), p. 1081-9.
150. Steegborn, C. (2014). Structure, mechanism, and regulation of soluble adenylyl cyclases — similarities and differences to transmembrane adenylyl cyclases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(12), p. 2535-2547.
151. Duan, B., R. Davis, E.L. Sadat, J. Collins, P.C. Sternweis, D. Yuan, et L.I. Jiang. (2010). Distinct roles of adenylyl cyclase VII in regulating the immune responses in mice. *J Immunol*, 185(1), p. 335-44.
152. Dessauer, C.W., V.J. Watts, R.S. Ostrom, M. Conti, S. Dove, et R. Seifert. (2017). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CI. Structures and Small Molecule Modulators of Mammalian Adenylyl Cyclases. *Pharmacological Reviews*, 69(2), p. 93.
153. Willoughby, D. et D.M. Cooper. (2007). Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev*, 87(3), p. 965-1010.
154. Sadana, R. et C.W. Dessauer. (2009). Physiological roles for G protein-regulated

- adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neurosignals*, 17(1), p. 5-22.
155. Efendiev, R. et C.W. Dessauer. (2011). AKAPs and Adenylyl Cyclase in Cardiovascular Physiology and Pathology. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 58(4), p. 339-344.
 156. Iwatsubo, K., S. Minamisawa, T. Tsunematsu, M. Nakagome, Y. Toya, J.E. Tomlinson, . . . Y. Ishikawa. (2004). Direct inhibition of type 5 adenylyl cyclase prevents myocardial apoptosis without functional deterioration. *J Biol Chem*, 279(39), p. 40938-45.
 157. Okumura, S., J. Kawabe, A. Yatani, G. Takagi, M.C. Lee, C. Hong, . . . Y. Ishikawa. (2003). Type 5 adenylyl cyclase disruption alters not only sympathetic but also parasympathetic and calcium-mediated cardiac regulation. *Circ Res*, 93(4), p. 364-71.
 158. Bogard, A.S., C. Xu, et R.S. Ostrom. (2011). Human bronchial smooth muscle cells express adenylyl cyclase isoforms 2, 4, and 6 in distinct membrane microdomains. *J Pharmacol Exp Ther*, 337(1), p. 209-17.
 159. Chen, X., H. Cao, A. Saraf, L.S. Zweifel, et D.R. Storm. (2015). Overexpression of the type 1 adenylyl cyclase in the forebrain leads to deficits of behavioral inhibition. *J Neurosci*, 35(1), p. 339-51.
 160. Wolf, E.J., A.M. Rasmusson, K.S. Mitchell, M.W. Logue, C.T. Baldwin, et M.W. Miller. (2014). A genome-wide association study of clinical symptoms of dissociation in a trauma-exposed sample. *Depress Anxiety*, 31(4), p. 352-60.
 161. Joeyen-Waldorf, J., Y.S. Nikolova, N. Edgar, C. Walsh, R. Kota, D.A. Lewis, . . . E. Sibille. (2012). Adenylate cyclase 7 is implicated in the biology of depression and modulation of affective neural circuitry. *Biol Psychiatry*, 71(7), p. 627-32.
 162. Suzuki, Y., T. Shen, M. Poyard, M. Best-Belpomme, J. Hanoune, et N. Defer. (1998). Expression of adenylyl cyclase mRNAs in the denervated and in the developing mouse skeletal muscle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 274(6), p. C1674.
 163. Sabbatini, M.E., F. Gorelick, et S. Glaser. (2014). Adenylyl cyclases in the digestive system. *Cellular signalling*, 26(6), p. 1173-1181.
 164. Wang, Z., A. Nudelman, et D.R. Storm. (2007). Are pheromones detected through the main olfactory epithelium? *Mol Neurobiol*, 35(3), p. 317-23.
 165. Xie, F., M.A. Garcia, A.E. Carlson, S.M. Schuh, D.F. Babcock, B.S. Jaiswal, . . . M. Conti. (2006). Soluble adenylyl cyclase (sAC) is indispensable for sperm function and fertilization. *Dev Biol*, 296(2), p. 353-62.
 166. Esposito, G., B.S. Jaiswal, F. Xie, M.A.M. Krajnc-Franken, T.J.A.A. Robben, A.M. Strik, . . . J.A. Gossen. (2004). Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), p. 2993-2998.
 167. Cheng, X., Z. Ji, T. Tsalkova, et F. Mei. (2008). Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 40(7), p. 651-662.
 168. Lezoualc'h, F., L. Fazal, M. Laudette, et C. Conte. (2016). Cyclic AMP Sensor EPAC Proteins and Their Role in Cardiovascular Function and Disease. *Circulation Research*, 118(5), p. 881.
 169. Paterson, J.M., S.M. Smith, A.J. Harmor, et F.A. Antoni. (1995). Control of a Novel

- Adenylyl Cyclase by Calcineurin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 214(3), p. 1000-1008.
170. Premont, R.T., I. Matsuoka, M.G. Mattei, Y. Pouille, N. Defer, et J. Hanoune. (1996). Identification and characterization of a widely expressed form of adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, 271(23), p. 13900-7.
 171. Hacker, B.M., J.E. Tomlinson, G.A. Wayman, R. Sultana, G. Chan, E. Villacres, . . . D.R. Storm. (1998). Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9). *Genomics*, 50(1), p. 97-104.
 172. Paterson, J.M., S.M. Smith, J. Simpson, O.C. Grace, A.A. Sosunov, J.E. Bell, et F.A. Antoni. (2000). Characterisation of human adenylyl cyclase IX reveals inhibition by Ca(2+)/Calcineurin and differential mRNA polyadenylation. *J Neurochem*, 75(4), p. 1358-67.
 173. Cumbay, M.G. et V.J. Watts. (2004). Novel Regulatory Properties of Human Type 9 Adenylate Cyclase. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 310(1), p. 108.
 174. Ejendal, K.F.K., J.A. Przybyla, et V.J. Watts. (2010) *Adenylyl cyclase isoform-specific signaling of GPCRs*, in *G Protein-Coupled Receptors: Structure, Signaling, and Physiology*, G. Milligan and S. Siehler, Editors. Cambridge University Press: Cambridge. p. 189-216.
 175. Tantisira, K.G., K.M. Small, A.A. Litonjua, S.T. Weiss, et S.B. Liggett. (2005). Molecular properties and pharmacogenetics of a polymorphism of adenylyl cyclase type 9 in asthma: interaction between β -agonist and corticosteroid pathways. *Human Molecular Genetics*, 14(12), p. 1671-1677.
 176. Bai, Y. et M.J. Sanderson. (2006). Airway smooth muscle relaxation results from a reduction in the frequency of Ca(2+) oscillations induced by a cAMP-mediated inhibition of the IP(3) receptor. *Respiratory Research*, 7(1), p. 34-34.
 177. Liu, L., S. Das, W. Losert, et C.A. Parent. (2010). Mtorc2 Regulates Neutrophil Chemotaxis In A Camp- And Rhoa-Dependent Fashion. *Developmental cell*, 19(6), p. 845-857.
 178. Wilson, C.A., M.A. Tsuchida, G.M. Allen, E.L. Barnhart, K.T. Applegate, P.T. Yam, . . . J.A. Theriot. (2010). Myosin II contributes to cell-scale actin network treadmilling through network disassembly. *Nature*, 465(7296), p. 373-377.
 179. Li, Y., L. Chen, R.S. Kass, et C.W. Dessauer. (2012). The A-kinase anchoring protein Yotiao facilitates complex formation between adenylyl cyclase type 9 and the IKs potassium channel in heart. *J Biol Chem*, 287(35), p. 29815-24.
 180. Li, Y., T.A. Baldwin, Y. Wang, J. Subramaniam, A.G. Carbajal, C.S. Brand, . . . C.W. Dessauer. (2017). Loss of type 9 adenylyl cyclase triggers reduced phosphorylation of Hsp20 and diastolic dysfunction. *Scientific Reports*, 7(1), p. 5522.
 181. Lincoff, A.M., S.J. Nicholls, J.S. Riesmeyer, P.J. Barter, H.B. Brewer, K.A.A. Fox, . . . A. Investigators. (2017). Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease. *N Engl J Med*, 376(20), p. 1933-1942.
 182. Edwards, H.V., J.D. Scott, et G.S. Baillie. (2012). PKA phosphorylation of the small heat-shock protein Hsp20 enhances its cardioprotective effects. *Biochem Soc Trans*, 40(1), p. 210-4.

183. Rosenson, R.S., H.B. Brewer, Jr., B.J. Ansell, P. Barter, M.J. Chapman, J.W. Heinecke, . . . N.R. Webb. (2016). Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 13(1), p. 48-60.
184. Tardif, J.C., E. Rheume, L.P. Lemieux Perreault, J.C. Gregoire, Y. Feroz Zada, G. Asselin, . . . M.P. Dube. (2015). Pharmacogenomic determinants of the cardiovascular effects of dalcetrapib. *Circ Cardiovasc Genet*, 8(2), p. 372-82.
185. Tardif, J.-C., D. Rhainds, M. Brodeur, Y. Feroz Zada, R. Fouodjio, S. Provost, . . . M.-P. Dubé. (2016). Genotype-Dependent Effects of Dalcetrapib on Cholesterol Efflux and Inflammation. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 9(4), p. 340.
186. Lincoff, A.M., S.J. Nicholls, J.S. Riesmeyer, P.J. Barter, H.B. Brewer, K.A.A. Fox, . . . S.E. Nissen. (2017). Evacetrapib and Cardiovascular Outcomes in High-Risk Vascular Disease. *New England Journal of Medicine*, 376(20), p. 1933-1942.
187. Tall, A.R., L. Yvan-Charvet, et N. Wang. (2007). The Failure of Torcetrapib. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(2), p. 257.
188. Wang, X., D. Liao, U. Bharadwaj, M. Li, Q. Yao, et C. Chen. (2008). C-reactive protein inhibits cholesterol efflux from human macrophage-derived foam cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(3), p. 519-26.
189. Zambrowicz, B.P., A. Abuin, R. Ramirez-Solis, L.J. Richter, J. Piggott, H. BeltrandelRio, . . . A.T. Sands. (2003). Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: A gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(24), p. 14109-14114.
190. Roche-Molina, M., D. Sanz-Rosa, F.M. Cruz, J. Garcia-Prieto, S. Lopez, R. Abia, . . . J.A. Bernal. (2015). Induction of sustained hypercholesterolemia by single adeno-associated virus-mediated gene transfer of mutant hPCSK9. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(1), p. 50-9.
191. Bieghs, V., P.J. Van Gorp, K. Wouters, T. Hendriks, M.J. Gijbels, M. van Bilsen, . . . R. Shiri-Sverdlov. (2012). LDL Receptor Knock-Out Mice Are a Physiological Model Particularly Vulnerable to Study the Onset of Inflammation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *PLOS ONE*, 7(1), p. e30668.
192. Laurila, A., S.P. Cole, S. Merat, M. Obonyo, W. Palinski, J. Fierer, et J.L. Witztum. (2001). High-Fat, High-Cholesterol Diet Increases the Incidence of Gastritis in LDL Receptor-Negative Mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(6), p. 991.
193. Wiesner, P., K. Leidl, A. Boettcher, G. Schmitz, et G. Liebisch. (2009). Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res*, 50(3), p. 574-85.
194. Rosenfeld, M.E., P. Polinsky, R. Virmani, K. Kauser, G. Rubanyi, et S.M. Schwartz. (2000). Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(12), p. 2587-92.
195. Sobecki, M., K. Mrouj, A. Camasses, N. Parisi, E. Nicolas, D. Lleres, . . . D. Fisher. (2016). The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife*, 5, p. e13722.
196. Gimbrone, M.A., Jr. et G. Garcia-Cardena. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*, 118(4), p. 620-36.

197. Felder, C.C. (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J*, 9(8), p. 619-25.
198. Attinà, T.M., J.J. Oliver, L.S. Malatino, et D.J. Webb. (2008). Contribution of the M(3) muscarinic receptors to the vasodilator response to acetylcholine in the human forearm vascular bed. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 66(2), p. 300-303.
199. Kierszenbaum, A.L., P. Validire-Charpy, et P. Validire. (2006). *Histologie et biologie cellulaire: Une introduction à l'anatomie pathologique*. De Boeck Supérieur.
200. Durand, M.J. et D.D. Gutterman. (2013). Diversity in mechanisms of endothelium-dependent vasodilation in health and disease. *Microcirculation*, 20(3), p. 239-47.
201. Waldron, G.J., H. Ding, F. Lovren, P. Kubes, et C.R. Triggle. (1999). Acetylcholine-induced relaxation of peripheral arteries isolated from mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*, 128(3), p. 653-8.
202. Kang, K.-T. (2014). Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension. *Toxicological Research*, 30(3), p. 141-148.
203. Woodman, O.L. et G.J. Dusting. (1991). N-nitro L-arginine causes coronary vasoconstriction and inhibits endothelium-dependent vasodilatation in anaesthetized greyhounds. *British Journal of Pharmacology*, 103(2), p. 1407-1410.
204. Kalgutkar, A.S., B.C. Crews, S.W. Rowlinson, A.B. Marnett, K.R. Kozak, R.P. Remmel, et L.J. Marnett. (2000). Biochemically based design of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: Facile conversion of nonsteroidal antiinflammatory drugs to potent and highly selective COX-2 inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), p. 925-930.
205. Luksha, L., S. Agewall, et K. Kublickiene. (2009). Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 202(2), p. 330-44.
206. Beleznai, T., H. Takano, C. Hamill, P. Yarova, G. Douglas, K. Channon, et K. Dora. (2011). Enhanced K(+)-channel-mediated endothelium-dependent local and conducted dilation of small mesenteric arteries from ApoE(-/-) mice. *Cardiovascular Research*, 92(2), p. 199-208.
207. Agarwal, J.J., Y. Zhu, Q.-Y. Zhang, A.A. Mongin, et L.B. Hough. (2013). TRAM-34, a Putatively Selective Blocker of Intermediate-Conductance, Calcium-Activated Potassium Channels, Inhibits Cytochrome P450 Activity. *PLOS ONE*, 8(5), p. e63028.
208. Messier, C., C. Mourre, B. Bontempi, J. Sif, M. Lazdunski, et C. Destradé. (1991). Effect of apamin, a toxin that inhibits Ca(2+)-dependent K⁺ channels, on learning and memory processes. *Brain Res*, 551(1-2), p. 322-6.
209. Kim, S.H. et G. Reaven. (2010). Obesity and Insulin Resistance: An Ongoing Saga. *Diabetes*, 59(9), p. 2105-2106.
210. Wang, C.Y. et J.K. Liao. (2012). A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol*, 821, p. 421-33.
211. Ellacott, K.L.J., G.J. Morton, S.C. Woods, P. Tso, et M.W. Schwartz. (2010). Assessment of feeding behavior in laboratory mice. *Cell metabolism*, 12(1), p. 10-17.
212. Kokkorus, P. et F.X. Pi-Sunyer. (2003). Obesity and endocrine disease. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 32(4), p. 895-914.
213. van Baak, M.A. (2008). Meal-induced activation of the sympathetic nervous system

- and its cardiovascular and thermogenic effects in man. *Physiology & behavior*, 94(2), p. 178-186.
214. Haynes, W.G., D.A. Morgan, A. Djalali, W.I. Sivitz, et A.L. Mark. (1999). Interactions between the melanocortin system and leptin in control of sympathetic nerve traffic. *Hypertension*, 33(1), p. 542-547.
 215. Henry, B. et I. Clarke. (2008). Adipose tissue hormones and the regulation of food intake. *Journal of neuroendocrinology*, 20(6), p. 842-849.
 216. Melnyk, A., M. Harper, et J. Himms-Hagen. (1997). Raising at thermoneutrality prevents obesity and hyperphagia in BAT-ablated transgenic mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 272(4), p. R1088-R1093.
 217. Messina, G., V. De Luca, A. Viggiano, A. Ascione, T. Iannaccone, S. Chieffi, et M. Monda. (2013). Autonomic Nervous System in the Control of Energy Balance and Body Weight: Personal Contributions. *Neurology Research International*, 2013, p. 5.
 218. Gordan, R., J.K. Gwathmey, et L.-H. Xie. (2015). Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World Journal of Cardiology*, 7(4), p. 204-214.
 219. Evans, S., L.C. Seidman, J.C.I. Tsao, K.C. Lung, L.K. Zeltzer, et B.D. Naliboff. (2013). Heart rate variability as a biomarker for autonomic nervous system response differences between children with chronic pain and healthy control children. *Journal of Pain Research*, 6, p. 449-457.
 220. Gautron, L., J.K. Elmquist, et K.W. Williams. (2015). Neural control of energy balance: translating circuits to therapies. *Cell*, 161(1), p. 133-45.
 221. Foteinou, P.T., S.E. Calvano, S.F. Lowry, et I.P. Androulakis. (2011). A Physiological Model for Autonomic Heart Rate Regulation in Human Endotoxemia. *Shock (Augusta, Ga.)*, 35(3), p. 229-239.
 222. Thireau, J., B.L. Zhang, D. Poisson, et D. Babuty. (2008). Heart rate variability in mice: a theoretical and practical guide. *Exp Physiol*, 93(1), p. 83-94.
 223. Grouleff, J., S.J. Irudayam, K.K. Skeby, et B. Schiott. (2015). The influence of cholesterol on membrane protein structure, function, and dynamics studied by molecular dynamics simulations. *Biochim Biophys Acta*, 1848(9), p. 1783-95.

ANNEXE 1

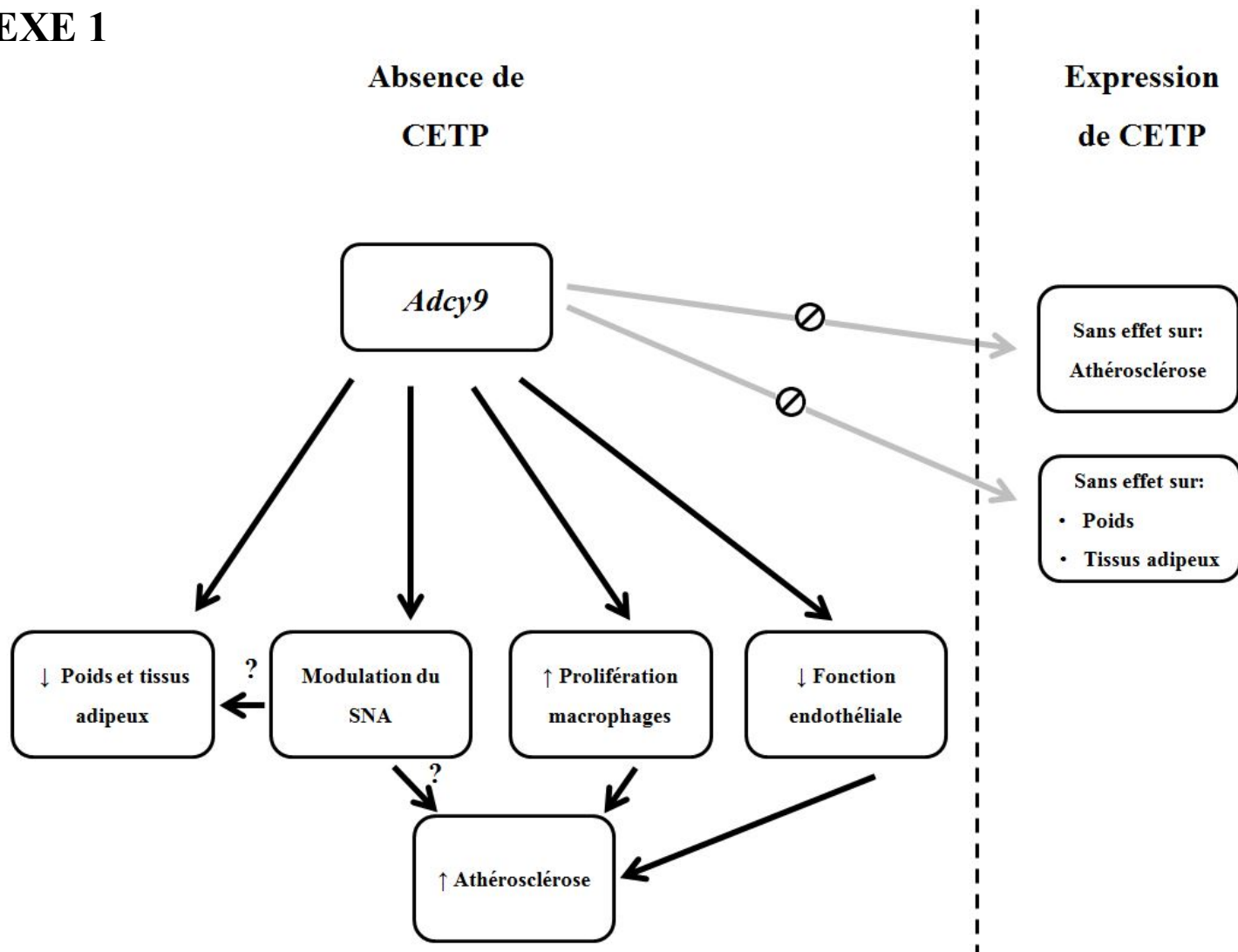


Figure 4. Résumé des effets d'*Adcy9* sur le développement de l'athérosclérose.