

Université de Montréal

**Caractérisation des fonctions de transport du
cholestérol des sous-types de macrophages M1 et M2
issus de cellules THP-1**

par Julien Renaud

Département des Sciences biomédicales
Faculté de médecine

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en Sciences Biomédicales
Option Médecine expérimentale

Juin 2018

© Julien Renaud, 2018

Université de Montréal
Faculté des Études supérieures

Ce mémoire est intitulé:

**Caractérisation des fonctions de transport du cholestérol
des sous-types de macrophages M1 et M2 issu de cellules
THP-1**

Présenté par :
Julien Renaud

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Marie Lordkipanidzé, président-rapporteur

Dr Jean-Claude Tardif, directeur de recherche

Dr Éric Rhéaume, codirecteur

Dr Tatiana Scorza, membre du jury

Résumé

L'athérosclérose est maintenant reconnue comme une maladie inflammatoire qui est caractérisée par le recrutement de macrophages dans la paroi vasculaire. La présence de différents stimulus dans la plaque entraîne la polarisation de ces macrophages en sous-types pro- et anti-inflammatoires. Bien qu'il soit établi que les macrophages participent à la formation de la plaque en devenant des cellules spumeuses suite à l'internalisation du cholestérol qui s'y accumule, peu d'informations sont connues sur la capacité de capture et d'efflux de cholestérol des sous-types de macrophages. Notre objectif principal était donc de déterminer si ces mécanismes impliqués dans la fonction de transport de cholestérol des macrophages différaient selon les sous-types pro- et anti-inflammatoires. À cet effet, nous avons polarisé des cellules THP-1, issus d'une lignée monocyttaire humaine, en sous-types pro-inflammatoires M1 en les exposant à 20 ng/ml d'interféron gamma (IFN γ), en présence d'une faible dose de lipopolysaccharides (LPS) (10 pg/mL, M1C) ou d'une forte dose de LPS (1 μ g/ml, M1A), afin d'obtenir des M1 avec un niveau inflammatoire distinct. Le sous-type anti-inflammatoire M2 a été polarisé avec 20 ng/ml d'interleukine-4 (IL-4). Puis, nous avons mesuré l'expression génique et protéique des transporteurs de cholestérol, la capacité d'efflux de cholestérol, la captation des esters de cholestérol (CE) de différentes lipoprotéines et l'accumulation de cholestérol dans chacun des sous-types de macrophages générés. Les sous-types M1C et M1A présentaient une expression d'ARNm et protéique d'ABCA1 plus élevée, mais exprimaient moins de rLDL, CD36 et SR-BI que les macrophages M2. Les M1C et M1A avaient aussi une capacité d'efflux de cholestérol vers l'apo A-I réduite par rapport au M2. Le sous-type M1C présentait aussi une baisse d'efflux de cholestérol vers les HDL comparativement aux sous-types M1A et M2. Par ailleurs, les macrophages M1C et M1A montraient une capacité de capture des CE des HDL, LDL et AcLDL plus basse que les M2, ce qui concordait avec une expression réduite des récepteurs SR-BI, rLDL et CD36 dans les M1C et M1A. Tous les sous-types présentaient une concentration de cholestérol totale similaire suite à une incubation avec des AcLDL, indiquant que tous les sous-types accumulaient le cholestérol de façon semblable. Ces résultats démontrent donc que les M2 ont une capacité de capture et d'efflux du cholestérol plus grande que les M1, ce qui suggère que

le sous-type M2 aurait une meilleure capacité de transport du cholestérol afin de prévenir ou réduire l'accumulation de cholestérol dans la plaque d'athérosclérose.

Mots-clés : Athérosclérose, THP-1, monocytes, macrophages, phorbol 12-myristate 13-acétate, cellules spumeuses, M1, M2, ABCA1, SR-AI/AII, SR-BI, CD36, rLDL, efflux, captation, lipoprotéines, HDL, Apo A-I, Apo E,

Abstract

Atherosclerosis is now known as an inflammatory disease characterized by macrophage infiltration of the vascular wall. Different stimuli present in the plaque can polarize macrophages to pro- and anti-inflammatory subtypes. Even though it has been established that macrophages are implicated in plaque formation by becoming foam cells following cholesterol accumulation, information on cholesterol uptake and efflux of macrophage subtypes remains scarce. Our main objective was to determine if the mechanisms involved in cholesterol transport functions in macrophages differ between the pro- and anti-inflammatory subtypes. Accordingly, we polarized THP-1 cells to pro-inflammatory M1 subtypes by exposing them to 20 ng/ml interferon gamma (IFN γ), along with a low dose of lipopolysaccharides (LPS) (10 pg/ml, M1C) or a higher dose of LPS (1 μ g/ml), to generate M1 subtypes with distinct inflammation levels. M2 subtype was polarized with 20 ng/ml of interleukin-4 (IL-4). We then compared mRNA and protein expression of cholesterol transport proteins, cholesterol efflux capacity, association of cholesteryl esters (CE) from lipoproteins and cholesterol accumulation susceptibility in each macrophages subtypes. M1C and M1A had higher mRNA and protein expression of ABCA1, but had reduced LDLr, CD36 and SR-BI mRNA and protein expression than M2 macrophages. M1C and M1A also show reduced cholesterol efflux to apo A-I compared to M2. M1C subtype had reduced cholesterol efflux to HDL compared with M1A and M2 subtypes. Moreover, M1C and M1A macrophages had lower CE-association from HDL, LDL and AcLDL compared to M2, matching reduced expression of SR-BI, LDLr and CD36 in M1C and M1A. All subtypes show similar cholesterol concentration following AcLDL incubation, which indicates that all subtypes accumulated cholesterol in a similar manner. These results suggest that M2 macrophages have higher cholesterol uptake and efflux capacity than M1 subtypes, which indicates that the M2 subtype has increased cholesterol transport capacity and may decrease cholesterol accumulation in the plaque.

Keywords : Atherosclerosis, THP-1, monocytes, macrophages, phorbol 12-myristate 13-acetate, foam cells, M1, M2, phenotypes, ABCA1, SR-AI/AII, SR-BI, CD36, LDLr, efflux, lipoprotein association, lipoproteins, HDL, Apo A-I, Apo E

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des sigles et abréviations.....	x
Remerciements.....	xv
Introduction.....	1
1. Maladies cardiovasculaires et athérosclérose.....	1
1.1 Épidémiologie.....	1
1.2 Catégories des maladies cardiovasculaires.....	1
1.3 Facteurs de risque.....	2
1.3.1. Facteurs de risque non modifiables.....	2
1.3.1.1 La génétique.....	3
1.3.2 Facteurs de risque modifiables.....	5
2. Athérosclérose.....	7
2.1 Les causes du développement de l'athérosclérose.....	8
2.1.1. Cholestérol et lipoprotéines.....	8
2.1.1.1. Impact des niveaux de cholestérol associés aux lipoprotéines sur la formation de l'athérosclérose.....	10
2.1.2 Inflammation.....	11
2.2 Formation de la plaque d'athérome.....	12
2.2.1 Histologie des artères.....	12
2.2.2 Dysfonction endothéliale.....	13
2.2.3 Adhésion et infiltration monocytaire.....	15
2.2.3. Cellules spumeuses et progression de la plaque.....	15
2.2.4. Rupture de la plaque.....	17
2.3 Sous-types de macrophages dans la plaque.....	19

2.3.1 Les macrophages M1	19
2.3.2. Les macrophages M2	21
2.3.3. Autres phénotypes de macrophages.....	22
2.3.4. Localisation des sous-types M1 et M2 dans la plaque.....	23
3. Implications des fonctions de transport du cholestérol des macrophages dans l'athérosclérose	24
3.1. Capture des lipoprotéines.....	28
3.1.1 Récepteur des LDL	28
3.1.2. Récepteurs <i>scavengers</i> des macrophages.....	29
3.1.2.1. Récepteurs <i>scavenger</i> de classe A (SR-A).....	30
3.1.2.2. CD36	32
3.1.2.3. Récepteur <i>scavenger</i> de classe B type I (SR-BI).....	34
3.1.2.4 Autres récepteurs des macrophages impliqués dans la capture de lipoprotéines	39
3.1.3 Macropinocytose et phagocytose des LDL.....	39
3.2. Efflux de cholestérol	40
3.2.1 <i>ATP-Binding Cassette Sub-family A, member 1</i> (ABCA1)	41
Structure, distribution cellulaire, ligands	41
Régulation de l'expression.....	41
Efflux de cholestérol	43
3.2.2. <i>ATP-Binding Cassette sub-family G, member 1</i> (ABCG1)	45
Structure, distribution cellulaire, ligands	45
Régulation de l'expression.....	46
Efflux de cholestérol	46
Impact physiologique d'ABCG1 sur la formation de la plaque	47
3.2.3. Récepteur <i>scavenger</i> de classe B type I (SR-BI).....	48
Efflux de cholestérol	48
Implication du SR-BI dans le développement de l'athérosclérose	49
3.3. Perte de l'homéostasie lipidique des macrophages de la paroi vasculaire	50
3.3.1. Infiltration et modification des lipoprotéines.....	51

3.3.2. Mécanismes cellulaires impliqués dans la formation de cellules spumeuses	52
Perte de l'homéostasie de cholestérol causé par la capture de LDL modifiées.....	52
Perte de l'homéostasie du cholestérol causée par la séquestration du cholestérol et la diminution de l'efflux	54
4. Justification du modèle d'étude du macrophage in vitro	54
4.1. La lignée THP-1 comme modèle de macrophage humain.....	55
5. Implication des différents sous-types de macrophages dans le transport du cholestérol.....	56
Objectifs du mémoire.....	59
Article	61
Contribution de l'étudiant.....	61
Matériel et méthodes supplémentaire	96
Résultats complémentaires.....	97
1. Mise au point du modèle de polarisation	97
1.1. Impact du sérum sur les marqueurs de polarisation.....	97
1.2. Impact du sérum sur l'expression des transporteurs de cholestérol et la fonction d'efflux de cholestérol des sous-types de macrophages	98
1.3. Caractérisation complémentaire du modèle.....	98
2. Expression des protéines de transport du cholestérol	98
3. Susceptibilité des sous-types M1 et M2 à former des cellules spumeuses suite à l'incubation avec des LDL modifiées	100
Résultats additionnels	102
Discussion	112
Conclusion	126
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Table I : Primer sequences for qPCR.	84
Table II : Table of changes induced by polarization relative to macrophage phenotype expression markers and cholesterol mobilization in THP-1 macrophages.	85

Liste des figures

Figure 1. Gènes associés au développement de l'athérosclérose, divisés en fonction des voies métaboliques régulées. Figure adaptée de Khera et collègues [6].	5
Figure 3. Étapes clés de la formation et de la progression de la plaque. Figure adaptée de Libby [53].	18
Figure 4. Phénotypes de macrophages répertoriés au niveau de lésions athérosclérotiques. Figure adaptée de Chinetti-Gbaguidi et collègues [65].	23
Figure 5. Principales étapes du transport inverse du cholestérol (TIC). Figure adaptée de Mahley et collègues [88].	27
Figure 6. Principales voies de liaison et d'internalisation des lipoprotéines par les macrophages. Adapté de Moore et collègues [149].	40
Figure 7. Expression of M1 and M2 representative markers.	88
Figure 8. mRNA Expression of cholesterol mobilization related genes in THP-1 macrophage.	89
Figure 9. Protein expression of cholesterol transporters ABCA1, SR-BI and CD36 in THP-1 polarized subtypes.	90
Figure 10. ApoE secretion by THP-1 subtypes.	91
Figure 11 : Cholesterol efflux to ApoA-I and HDL3 in M1 and M2 macrophages.	92
Figure 12 : Protein expression of ABCA1, SR-BI and CD36 at time of efflux.	93
Figure 13. Effect of cholesterol loading and LXR agonist on ABCA1 mRNA expression, protein expression and apoA-I mediated efflux in THP-1 subtypes.	94
Figure 14. ³ H-CE-HDL ₃ , -LDL and -AcLDL association of THP-1 subtypes.	95
Figure 15. Effets du sérum sur l'expression d'ARNm des marqueurs de différenciation des sous-types de macrophages M0, M1C, M1A et M2.	103
Figure 16. Effets du sérum sur l'expression protéique des transporteurs de cholestérol ABCA1 et SR-BI des sous-types de macrophages M0, M1C, M1A et M2.	104
Figure 17. Effets du sérum sur la capacité d'efflux des macrophages M0, M1C, M1A et M2 de lignée THP-1.	105

Figure 18. Expression d'ARNm et protéique du récepteur des LDL (rLDL) dans les sous-types de macrophages M0, M1C, M1A et M2 de lignée THP-1.	106
Figure 19. Effets de l'AMPc, de l'agoniste LXR T0901317 et de l'atorvastatine sur l'expression de l'ARNm des gènes impliqués dans le transport du cholestérol dans les sous-types de macrophages M0, M1C, M1A et M2.	108
Figure 20. Effets de l'AMPc, de l'agoniste LXR T0901317 et de l'atorvastatine sur l'expression protéique des transporteurs de cholestérol ABCA1, SR-BI, CD36, et rLDL dans les phénotypes M0, M1C, M1A et M2.....	109
Figure 21. Effets de l'AMPc, de l'agoniste LXR T0901317 et de l'atorvastatine sur l'efflux de cholestérol médié par l'apo A-I ou les HDL₃ par les sous-types de macrophages M0, M1C, M1A et M2.	110
Figure 22. Concentration cellulaire de cholestérol total des sous-types de macrophages M0, M1C, M1A et M2 en présence ou en absence de AcLDL.	111

Liste des sigles et abréviations

ABCA1 : *ATP-binding cassette A1*

ABCA8 : *ATP-binding cassette A8*

ABCA12 : *ATP-binding cassette A12*

ABCG1 : *ATP-binding cassette G1*

ABCGG5/G8 : *ATP-binding cassette G5/G8*

ACAT : *Acyl-CoA cholesterol acyltransferase*

AcLDL : LDL acétylées (*Acetylated LDL*)

AgLDL : LDL agrégées (*Aggregated LDL*)

AHA : *American Heart Association*

Apo A-I : Apolipoprotéine A-I

Apo A-II : Apolipoprotéine A-II

Apo A-IV : Apolipoprotéine A-IV

Apo C-I : Apolipoprotéine C-I

Apo C-II : Apolipoprotéine C-II

Apo C-III : Apolipoprotéine C-III

Apo B : Apolipoprotéine B

Apo E : Apolipoprotéine E

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine triphosphate

AVC : Accident vasculaire cérébral

CD36 : *Cluster of differentiation 36*

CD86 : *Cluster of differentiation 86*

CD163 : *Cluster of differentiation 163*

CETP : *Cholesteryl ester transfer protein*

CML : Cellules musculaires lisses

COX-2 : Cyclooxygénase-2

CRP : *C-reactive protein*

CXCL4 : *CXC chemokine ligand 4*

DAMP : *Danger associated molecular pattern*
DC-SIGN : *Dendritic cell specific ICAM-3 grabbing nonintegrin*
EC : Cellule endothéliale (*Endothelial cell*)
EDHF : *Endothelium-derived hyperpolarizing factor*
FBS : *Fetal bovine serum*
HDL : *High-density lipoproteins*
HDL-C : Cholestérol associé aux HDL
HMG-CoA reductase : *Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A reductase*
ICAM-1 : *Intercellular adhesion molecule 1*
IFN γ : Interféron gamma
IL-1 β : Interleukine-1 bêta
IL-4 : Interleukine-4
IL-6 : Interleukine 6
IL-8 : Interleukine 8
IL-10 : Interleukine 10
IMC : Indice de masse corporelle
HSL : *Hormone-sensitive lipase*
HO-1 : Hème oxygénase-1
iNOS : *Inducible nitric oxide synthase*
JAK2 : *Janus kinase 2*
KO : *Knock-out*
LCAT : *Lecithin:cholesterol acyltransferase*
LDL : *Low-density lipoproteins*
LDL-C : Cholestérol associé aux LDL
LOX-1 : *Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1*
Lp(a) : Lipoprotéine (a)
LPL : Lipoprotéine lipase
LPS : Lipopolysaccharides
LRP1 : *Low density lipoprotein receptor-related protein 1*
LXR : *Liver X receptor*
LXRE : Element de réponse au LXR

MARCO : *Macrophage receptor with collagenous structure*
MCP-1 : *Monocyte chemotactic protein 1*
M-CSF : *Macrophage-colony stimulating factor*
miR-33 : *micro RNA-33*
MPO : Myélopéroxydase
MR : Récepteur de mannose (*Mannose receptor*)
MRC-1 : *C-type mannose receptor*
MSR : *Macrophage scavenger receptor* (voir SR-AI/AII)
NBD : *Nucleotide binding domain*
NCEH1 : *Neutral cholesteol ester hydrolase 1*
NF- κ B : *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NO : Oxyde nitrique
OxLDL : LDL oxydées (*Oxidized LDL*)
PAMP : *Pathogen associated molecular pattern*
PCSK9 : *Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9*
PDGF : *Platelet derived growth factor*
PPAR : *Peroxisome proliferator-activated receptor*
PPAR γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
PPRE : Élément de réponse au PPAR
PRR : *Pattern recognition receptor*
TIC : Transport inverse du cholestérol (*Reverse cholesterol transport*)
rLDL : Récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDLr, *Low density lipoprotein receptor*)
ROS : *Reactive oxygen species*
RXR : *Retinoid X receptor*
SCAP : *SREBP cleavage-activating protein*
SMC : *Smooth muscle cell* (voir CML)
SR-AI/AII : Récepteur *scavenger* de classe A type I/II (voir MSR)
SR-BI : Récepteur *scavenger* de classe B type I
SR-BII : Récepteur *scavenger* de classe B type II
SRE : *Sterol regulatory element*
SREBP : *Sterol regulatory element-binding protein*

STAT1 : *Signal transducers and activators of transcription 1*

STAT6 : *Signal transducers and activators of transcription 6*

TG : Triglycérides

TGF- β : *Tumoral growth factor Beta*

TIC : Transport inverse du cholestérol

TLR : *Toll-like Receptor*

TLR4 : *Toll-like receptor 4*

TNF α : *Tumor necrosis factor alpha*

VCAM-1 : *Vascular cell adhesion molecule-1*

VLDL : *Very low density lipoproteins*

*À ma demilune,
Qui avive mes jours, et de surcroît,
Illumine mes nuits*

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier le Dr David Rhains pour ses conseils éclairés, sa passion pour la recherche et la connaissance, ainsi que sa facilité à transmettre son savoir. Son influence a grandement contribué à mon avancement professionnel et personnel. J'espère pouvoir encore longtemps bénéficier de ses judicieux conseils et poursuivre ma carrière la tête haute, sachant avoir été formé par une personne d'exception. Merci ensuite au Dr Mathieu Brodeur, qui a su me diriger et m'aider à garder mon sang froid suite aux innombrables vagues de rondes de corrections, à garder la tête au-dessus des flots tout en ayant les yeux rivés sur l'objectif. Ma réussite est due en bonne partie à sa capacité d'adaptation, passant du rôle d'étudiant sénior à mentor et correcteur en un tournemain, ce qu'il a réussi avec brio. Puisse-t-il encore transmettre ses connaissances et mettre à profit ses talents envers l'épanouissement académique de plusieurs autres étudiants!

Je voudrais aussi remercier mes deux collègues disparus (MIA), Matthieu Blanchard et Vanessa Deschambault. Notre groupe hétéroclite de « gamers/nerds/geeks » a franchi un autre niveau. Nos intérêts communs nous ont permis d'entretenir des conversations stimulantes, non seulement sur les divertissements, mais aussi sur la science à la hauteur de nos connaissances, c'est-à-dire limités puisque plus on en apprend, moins on en sait! Un gros merci à toute l'équipe du laboratoire de recherche fondamentale sur l'athérosclérose. Merci à vous tous qui avez été des piliers pour tous les nouveaux arrivants découvrant le domaine de la recherche fondamentale. Merci au Dr Jean-Claude Tardif et au Dr Éric Rhéaume qui m'ont donné la possibilité de me former dans un des meilleurs laboratoires de recherche. J'espère que mes travaux vont contribuer à la reconnaissance du travail effectué et au succès du laboratoire.

Un merci énorme à mes parents Robert et Louise, ainsi qu'à ma famille et amis qui ont cru en moi à des moments où je n'y croyais plus moi-même.

En dernier lieu, je veux remercier ma tendre moitié, qui m'a épaulée pendant mon périple académique universitaire, et qui a cru que je puisse me rendre au bout de mon parcours. Je dédie ce manuscrit à celle qui fût Mneme, Melete et Aiode, muse et architecte de mon labeur. Te amo, medialuna.

Introduction

1. Maladies cardiovasculaires et athérosclérose

1.1 Épidémiologie

Les maladies cardiovasculaires constituent un fléau des sociétés modernes. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ces maladies sont responsables de plus de 17 millions de décès par an, ce qui en fait la principale cause de mortalité mondiale [1]. Les maladies et la mortalité cardiovasculaire ont longtemps été considérées comme des problèmes touchant essentiellement les sociétés développées. Pourtant, des données récentes démontrent que ce mal afflige aussi des sociétés moins nanties; environ trois quarts des décès de maladies cardiovasculaires sont issus de pays à plus faibles revenus [1]. Étant donné la prévalence de pathologies cardiovasculaires, beaucoup d'efforts sont déployés afin de mieux comprendre ces pathologies pour ultimement les prévenir.

1.2 Catégories des maladies cardiovasculaires

L'OMS sépare les problèmes cardiovasculaires en six catégories, selon l'atteinte des différents systèmes vasculaires ou organes. On recense donc les cardiopathies coronariennes et rhumatismales, les malformations cardiaques, les maladies cérébro-vasculaires, les troubles vasculaires affectant les extrémités (bras et jambes) et l'obstruction du système sanguin par thrombose ou embolie artérielle.

Une caractéristique particulière de certains événements cardiovasculaires est la vitesse à laquelle ces derniers apparaissent. En effet, l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux (AVC), sont deux types d'incidents qui constituent des événements aigus et foudroyants. Ces événements surviennent généralement suite au développement de l'athérosclérose, une maladie coronarienne et chronique, qui est entretenue sur une longue période de temps et qui entraîne le blocage des vaisseaux et empêche le sang de parvenir au cœur.

1.3 Facteurs de risque

Il existe différents facteurs qui affectent la prédisposition d'un individu au développement de l'athérosclérose. Puisque certains de ces facteurs peuvent être modifiés en vue d'influencer le développement des maladies cardiovasculaires, les facteurs de risque ont été catégorisés en fonction de leur caractère non-modifiable ou modifiable.

1.3.1. Facteurs de risque non modifiables

Plusieurs aspects non altérables de la vie d'un individu peuvent influencer le risque cardiovasculaire. Il a été démontré que l'âge d'un individu contribuait au risque cardiovasculaire de façon indépendante des autres facteurs [2]. Certaines recherches ont suggéré que l'âge en tant que facteur de risque serait plutôt une conséquence de l'exposition continue dans le temps aux autres facteurs de risques cardiovasculaires. La modification de certains de ces facteurs (pression artérielle, taux de cholestérol, statut de fumeur) réduit de beaucoup le risque cardiovasculaire et l'impact de l'âge comme facteur indépendant [2]. Des études ont démontré que les hommes étaient plus à risque de développer une maladie coronarienne que les femmes. Lerner et Kannel [3] ont montré que les hommes étaient deux fois plus à risque de mortalité et de morbidité coronarienne que les femmes chez les sujets âgés entre 35 et 84 ans. Par contre, cette différence entre les sexes diminue fortement après 45 ans, la ménopause étant l'une des causes possibles impliquées. En effet, il a été montré que la ménopause amène un changement du profil lipidique chez les femmes ménopausées, soit une baisse du cholestérol associé aux lipoprotéines de haute densité (HDL-C) et une augmentation du cholestérol associé aux lipoprotéines de basse densité (LDL-C), ce qui correspond à un profil plus athérogène [4]. Des études ont de plus montré un lien entre l'ethnicité des individus et le risque d'évènements cardiovasculaires. Une étude faisant la revue systématique de la littérature liée aux populations nord-américaines a montré que les risques de maladies cardiovasculaires pouvaient varier en fonction de l'ascendance ethnique [5]. L'étude de Gasevic [5] cite le risque plus élevé de maladie et de mortalité cardiovasculaires chez les Noirs comparativement aux Blancs caucasiens. Comme les gens d'ethnicité noire ont une prévalence plus élevée d'hypertension, d'obésité et de diabète, tous des facteurs qui

contribuent au risque de maladie cardiovasculaire, il est possible que la prévalence de ces facteurs soit responsable des différences ethniques observées.

1.3.1.1 La génétique

En plus des facteurs épidémiologiques mentionnés précédemment, il a été montré que des polymorphismes ou mutations de différents gènes sont associés à des risques accrus de maladies cardiovasculaires [6]. Certains de ces gènes sont impliqués dans le transport et le métabolisme cellulaire du cholestérol, mais plusieurs codent pour des protéines ou des peptides de fonctions diverses dans l'inflammation, le remodelage des vaisseaux, la vasodilatation et beaucoup d'autres processus dont les voies métaboliques restent à élucider. La figure 1 ci-dessous présente une liste non exhaustive de plusieurs gènes associés à l'athérosclérose. Une des premières associations entre la fonction d'un gène et le risque cardiovasculaire a été observée par Brown et Goldstein [7] qui constatèrent que les fibroblastes des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, une maladie génétique, présentaient une capacité réduite de capture et de dégradation des lipoprotéines de basse densité (LDL). Cet effet était causé par une mutation génétique entraînant une baisse de fonction du récepteur des LDL (rLDL), une protéine membranaire participant à la capture et à l'internalisation des LDL, caractérisé par une capacité réduite à capter les LDL [8]. De plus, il a été rapporté que des patients porteurs de certaines mutations à l'état hétérozygote du rLDL associées à l'hypercholestérolémie familiale exprimaient 50% moins de ce récepteur, ce qui se traduisait par une clairance réduite et une accumulation de 2 fois plus de LDL comparativement à la normale [9] et favorisant un développement prématuré de l'athérosclérose [8]. Des mutations du gène de l'apolipoprotéine B (apo B), la protéine constituante des LDL, sont également responsables d'une autre forme d'hypercholestérolémie familiale. Les individus porteurs de certaines mutations de l'apo B, associés à l'hypercholestérolémie familiale et à des hausses des niveaux plasmatiques de cholestérol, étaient fortement plus à risque de maladies cardiaques ischémiques [10]. De plus, il a été montré que des mutations du gène *PCSK9* pouvaient influencer les taux plasmatiques de LDL-C. La protéine codée par ce gène régule l'expression du rLDL, l'interaction du récepteur avec la PCSK9 entraîne sa dégradation lors de son internalisation par la cellule plutôt qu'un recyclage vers la membrane plasmique [11]. Des mutations entraînant un gain de fonction de

cette protéine, caractérisé par une dégradation accrue du rLDL, sont associées à l'hypercholestérolémie familiale [12, 13]. À l'opposé, des mutations qui réduisent ou empêchent la liaison de PCSK9 avec le récepteur sont associés à des réductions des niveaux plasmatiques de LDL-C depuis la naissance [14, 15]. De plus, une étude de Cohen [16] et collègues a montré que des mutations de la PCSK9 qui entraînent une réduction du LDL-C étaient aussi associées à une diminution du risque de maladies coronariennes, ce qui ajoute à la démonstration du rôle joué par le LDL-C dans le développement de pathologies cardiovasculaires.

Des variantes du gène de l'apolipoprotéine E (apo E) ont été associées aux maladies cardiovasculaires. L'apo E est une protéine associée à plusieurs lipoprotéines plasmatiques et sert de ligand pour différents récepteurs permettant ainsi la capture et la clairance hépatique de ces lipoprotéines. Trois variantes alléliques du gène apo E ont été caractérisés, soit l'allèle $\epsilon 3$ présente chez environ 60% de la population ainsi que les allèles $\epsilon 2$ et $\epsilon 4$. Il a été démontré que les allèles $\epsilon 2$ et $\epsilon 4$ influençaient les niveaux de cholestérol sanguins, les patients porteurs de l'allèle apo $\epsilon 2$ présentant une réduction moyenne de 0,36 mmol/L et les patients porteurs de l'allèle apo $\epsilon 4$ ayant une hausse de cholestérol plasmatique de 0,2 mmol/L par rapport aux porteurs d'autres allèles [17]. Puisque les taux de cholestérol plasmatiques peuvent favoriser le développement de maladies cardiovasculaire, des mutations de l'apo E augmentant le cholestérol sanguin hausseraient aussi le risque de pathologies cardiaques, ce qui fût montré par des études associant le variant $\epsilon 4$ à une hausse du risque cardiovasculaire [17, 18].

Une autre sous-classe de lipoprotéines porteuses d'apo B est aussi associée aux maladies cardiovasculaires. La lipoprotéine (a) (Lp(a)) est composée d'une glycoprotéine appelée apo (a) et associée à une molécule d'apo B-100. Cette protéine est aussi caractérisée par plusieurs structures en boucles nommées domaines kringle de type IV. La Lp(a) est codée par le gène *LPA* et est sécrétée majoritairement par le foie. Plusieurs études avaient d'abord montré que la concentration plasmatique de Lp (a) était corrélée avec le risque de maladies cardiovasculaires. Par contre, des biais de sélection pour ces études n'ont pas pu confirmer si les niveaux de Lp(a) étaient une cause ou une conséquence des troubles cardiovasculaires. Plus récemment, des études de randomisation mendélienne ont montré un lien entre les allèles du gène *LPA* et les taux plasmatiques et le risque cardiovasculaire. Les variant alléliques

porteurs de moins de domaines kringle sont associés avec des niveaux circulants plus élevés de Lp(a) et un risque accru d'évènements cardiovasculaires [19].

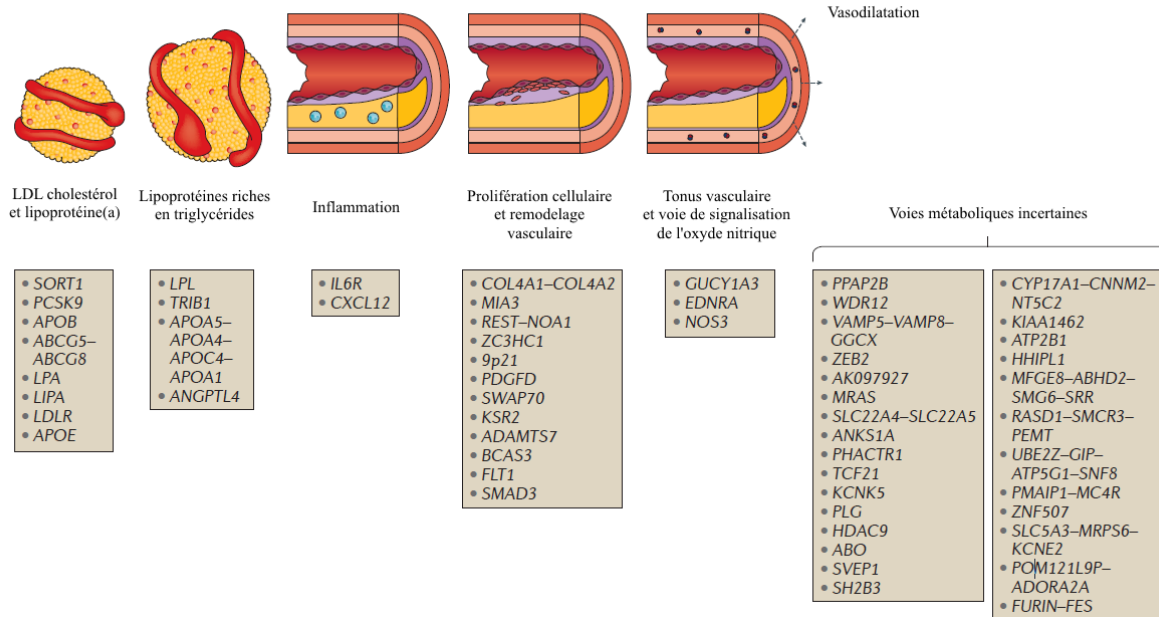


Figure 1. Gènes associés au développement de l'athérosclérose, divisés en fonction des voies métaboliques régulées. Figure adaptée de Khera et collègues [6].

Listes de différents gènes identifiés ayant des rôles présumés dans le développement de maladies cardiovasculaires. Les différents gènes sont répertoriés en fonction de leur implication dans différentes voies métaboliques. Permission de citation ©Khera, A.V. and S. Kathiresan, *Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation*. Nat Rev Genet, 2017. **18**(6): p. 331-344

1.3.2 Facteurs de risque modifiables

Les facteurs de risque modifiables sont principalement associés au style de vie des individus. Ainsi, il est possible de prévenir les maladies cardiovasculaires en modifiant certains comportements qui ont un impact important sur la tension artérielle, la glycémie, la lipidémie et le poids d'un individu. Ces derniers paramètres peuvent être évalués par le clinicien afin de déterminer le risque de maladies cardiovasculaires chez le patient. Ainsi les médecins vont notamment évaluer les niveaux de lipides sanguins, entre autres par la mesure du LDL-C.

Puisqu'une corrélation entre la concentration plasmatique du LDL-C et le risque d'évènements cardiovasculaires a été démontrée [20], des recommandations générales sur la concentration plasmatique du LDL-C ont été émises afin de prévenir les pathologies cardiovasculaires. En 2016 le *Canadian cardiovascular Society* (CCS) a présenté les mises à jour des recommandations des lignes directrices pour le traitement du cholestérol élevé chez les adultes, indiquant que des niveaux de LDL-C plasmatiques sous la barre des 2 mmol/L étaient optimaux pour les patients à risque élevé de maladies coronariennes[21]. De plus, une corrélation entre les niveaux élevés de triglycérides (TG) sanguins et le risque cardiovasculaire a également été démontrée [22]. Le CCS ne suggère pas de niveau cible de triglycérides en conditions postprandiales. Par contre, l'organisme recommande de doser les lipides et les niveaux de lipoprotéines des patients ayant plus des TG de plus de 4,5 mmol/L, puisque qu'au dessus de 1,5 mmol/L de TG, ces derniers influencent la mesure des particules LDL [21].

Par ailleurs, il a été montré que l'alimentation pouvait influencer les taux de LDL-C. En effet, une alimentation riche en gras saturés a été associée à une hausse du LDL-C. À l'opposé, la consommation régulière d'acide gras oméga-3 ou oméga-6 a été associée à une meilleure santé cardiovasculaire et une diminution du LDL-C [23]. D'autre part, la consommation d'alcool peut modifier les niveaux de triglycérides sanguins, augmenter la pression sanguine et les risques d'insuffisance cardiaque, en plus de favoriser l'obésité et le diabète, qui sont tous deux des facteurs de risque cardiovasculaires [24]. De plus, il a été montré que le niveau d'activité physique était corrélé avec une diminution du risque cardiovasculaire [25]. Enfin, le statut de fumeur est aussi un facteur de risque modifiable majeur rapporté par l'étude de Framingham [26]. Outre leur influence sur les taux de lipides sanguins, l'alimentation et les mauvaises habitudes de vie favorisent l'obésité, qui est un facteur de risque additionnel de maladies cardiovasculaires. Les lignes directrices de l'association Canadienne du diabète indiquent qu'un individu avec un indice de masse corporelle (IMC) de plus de 25 kg/m² est considéré en surpoids, et qu'une personne avec un IMC de plus de 30 kg/m² est considérée obèse [27]. Enfin, l'analyse des données de l'étude de Framingham par Kannel [28] a montré que les individus diabétiques étaient de deux à trois fois plus à risque de développer une maladie cardiovasculaire que les personnes non-diabétiques, confirmant le diabète comme facteur de risque cardiovasculaire.

Une pression sanguine élevée constitue aussi un facteur de risque de maladies cardiovasculaires. Hypertension Canada a défini une échelle de valeurs de pression sanguine afin de catégoriser le risque cardiovasculaire en fonction de ce paramètre [29]. Selon cette échelle, des valeurs de pression systolique et diastolique au-dessus de 135/85 mm Hg (mm de mercure), ou de plus de 130/80 mm Hg chez une personne diabétique, indiquent une hypertension artérielle, qui constitue un état fortement associé à l'augmentation de pathologies coronariennes, d'athérosclérose et de mortalité cardiovasculaire.

2. Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie caractérisée par un épaissement de la paroi vasculaire, ce qui entraîne une diminution de la lumière des vaisseaux sanguins, voire même leur obstruction complète. Le blocage des vaisseaux du cœur cause l'infarctus du myocarde, tandis que l'obturation de la circulation sanguine cérébrale est l'une des causes des accidents vasculaires cérébraux (AVC). L'apparition et le développement de cette pathologie implique notamment une réaction inflammatoire qui se manifeste par le recrutement de monocytes, de macrophages et d'autres cellules immunitaires au niveau de la paroi vasculaire. En plus de l'inflammation, le cholestérol plasmatique joue également un rôle important dans l'athérosclérose, puisqu'une accumulation de cholestérol a pu être détectée au niveau de l'endothélium vasculaire. Ceci contribue à la formation d'une plaque d'athérome et entraîne le rétrécissement des artères, diminuant le flot sanguin qui peut entraîner des complications lors d'un blocage partiel des vaisseaux. De plus, la rupture de la plaque entraîne l'activation des facteurs de coagulation menant à la formation d'un caillot sanguin (thrombus). Ce dernier peut alors bloquer le vaisseau à l'endroit où il s'est formé, entraînant une thrombose. Le thrombus peut aussi se détacher de la plaque et entraîner l'obstruction de vaisseaux distants ; on parle alors d'embolie. L'obstruction totale, par thrombus ou embolie, des vaisseaux irriguant le cœur caractérise l'infarctus du myocarde, tandis qu'un blocage du réseau vasculaire cérébral entraîne des AVC.

2.1 Les causes du développement de l'athérosclérose

2.1.1. Cholestérol et lipoprotéines

Le cholestérol est une molécule organique essentielle pour l'organisme étant donné son rôle en tant que l'un des principaux composants de la membrane cellulaire. La présence de cholestérol régule la fluidité et assure l'intégrité structurelle de la bicouche lipidique membranaire. De plus, cette molécule est aussi un important précurseur de plusieurs autres composés biologiques, dont la vitamine D, les acides biliaires et les hormones stéroïdiennes. Le cholestérol peut être obtenu par l'alimentation ou bien être synthétisé par l'organisme, principalement au niveau du foie. En effet, les cellules peuvent synthétiser ce composé via une cascade enzymatique impliquant le 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl coenzyme A (HMG-CoA) qui est converti par l'HMG-CoA réductase en mévalonate, un processus finement régulé par différentes protéines et facteurs de transcriptions qui sont influencés par les niveaux de cholestérol cellulaire.

Le cholestérol produit par l'organisme ou provenant de l'alimentation doit ensuite être acheminé aux différentes cellules de l'organisme. Comme le cholestérol est une molécule hydrophobe, celui-ci est associé à différentes protéines plasmatiques de la classe des apolipoprotéines (apo). Ces protéines sont amphipathiques, c'est-à-dire qu'elles sont à la fois hydrosolubles, pouvant être dissoutes et transportées facilement dans le plasma, mais elles possèdent aussi des domaines hydrophobes qui leur permettent d'englober les lipides. L'association des apolipoprotéines avec le cholestérol et différentes espèces lipidiques, comme les phospholipides et les sphingolipides, forment des particules appelées lipoprotéines qui sont réparties en fonction de leur taille et de leur densité et de leur composition en apolipoprotéines [30].

Les chylomicrons sont des particules de grande taille, mais d'une densité faible (moins de 0.95 g/ml), composées essentiellement de l'apolipoprotéine B-48, de triglycérides et de phospholipides. Celles-ci sont produites par les entérocytes suite à l'absorption des lipides de l'alimentation, distribuant ainsi le cholestérol et les triglycérides de l'alimentation aux différents organes. Ainsi, ces lipoprotéines sont principalement retrouvées dans le plasma postprandial. Une fois dans la circulation, les chylomicrons sont métabolisés par la

lipoprotéine lipase (LPL) à la surface des cellules endothéliales de différents tissus extra-hépatiques. L'activité enzymatique de la LPL contribue à l'hydrolyse des TG qui permet la distribution du contenu lipidique des chylomicrons aux différents tissus. Par la suite, les résidus des chylomicrons retournent vers le foie et sont récupérés par les récepteurs des résidus de chylomicrons exprimés par les hépatocytes [30].

Les lipoprotéines de très basse densité (*very low density lipoproteins*, VLDL), légèrement plus denses que les chylomicrons (0,95-1,006 g/ml), sont produites et sécrétées par le foie. Comme les chylomicrons, elles sont composées majoritairement de TG et ont comme fonction de redistribuer les acides gras sous forme de TG aux différents tissus du corps. Cette distribution, se faisant également par l'intermédiaire de la LPL, entraîne la formation de résidus de VLDL, aussi appelés lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL). Ces dernières peuvent être récupérées par le foie via l'interaction de l'apo E et de l'apo B-100 à leur surface avec le rLDL [30].

Par ailleurs, une partie des IDL n'est pas récupérée au niveau hépatique et les TG de ces dernières sont hydrolysées par la lipase hépatique. Ces lipoprotéines reçoivent alors du cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL) par l'action de la *cholesteryl ester transfer protein* (CETP). Les lipoprotéines ainsi réduites en TG et enrichies en cholestérol constituent alors les lipoprotéines de faible densité (LDL), composées principalement d'apolipoprotéine B-100 et de cholestérol sous forme estérifiée. La taille de ces lipoprotéines peut varier, certaines étant qualifiées de petites et denses (<25,8 nm), alors que d'autres sont qualifiées de moyennes (25,8-26,4 nm) ou larges (>26,4 nm) [31]. Les LDL sont principalement responsables du transport du cholestérol vers les différents tissus de l'organisme, qui peuvent récupérer le cholestérol par des interactions entre les LDL et leur récepteur, le rLDL, exprimé à la surface des cellules. Les LDL sont récupérées au niveau du foie par les rLDL des hépatocytes, ce qui contribue fortement à la régulation des niveaux circulants de LDL [30].

Finalement, les HDL constituent une classe de lipoprotéines plasmatiques d'une densité de plus de 1,063 g/ml qui peuvent être subdivisées en différentes sous-classes selon leur taille et leur contenu en cholestérol (HDL₃, HDL₂, HDL₁), les HDL₃ étant les plus petites et les HDL₁ les plus grosses. Ces HDL ont comme apolipoprotéine principale l'apolipoprotéine A-I (apo

A-I) qui va assurer la récupération du cholestérol des différents tissus périphériques pour l'acheminer au foie. Ainsi, les HDL sont impliquées dans le transport inverse du cholestérol (TIC) qui permet d'assurer l'élimination du cholestérol excédentaire dans les tissus périphériques [30].

2.1.1.1. Impact des niveaux de cholestérol associés aux lipoprotéines sur la formation de l'athérosclérose

Les lipoprotéines sont essentielles au bon fonctionnement de l'organisme, mais des niveaux plasmatiques inadéquats de ces dernières peuvent entraîner le développement de l'athérosclérose et par conséquent favoriser les maladies cardiovasculaires. Ceci est mis en valeur par la caractérisation de l'athérome qui a montré la présence de cristaux de cholestérol dans les artères de patients, ce qui a permis d'associer le cholestérol aux maladies coronariennes et à la formation de la plaque. Des études observationnelles, dont l'étude de Framingham, ont associé des taux élevés de LDL-C à un risque accru d'évènement ou de mortalité cardiovasculaire, d'où son appellation de mauvais cholestérol [32]. Le développement précoce d'athérosclérose chez les patients atteints de dyslipidémies familiales qui sont causés par différentes mutations menant à une hausse des niveaux de LDL-C vient d'autant plus appuyer l'implication de ces lipoprotéines dans l'athérosclérose. Cette implication est aussi attestée par les travaux sur les statines qui ont montré que la réduction pharmacologique des taux de LDL-C réduit et prévient le risque d'évènements cardiovasculaires. Les statines sont une classe de molécules qui agissent en inhibant la synthèse de cholestérol cellulaire en bloquant l'activité enzymatique de l'HMG-CoA réductase [33]. La réduction de synthèse de cholestérol endogène au niveau du foie entraîne une hausse de l'expression du rLDL par les hépatocytes, résultant ultimement en une clairance accrue des LDL plasmatiques. Plusieurs études randomisées sur l'efficacité des statines ont montré leurs effets sur la baisse des niveaux de LDL-C et la réduction du risque cardiovasculaire [34]. À l'opposé, les niveaux plasmatiques élevés de HDL-C sont indicateurs d'une meilleure santé cardiovasculaire et d'une réduction de risque coronarien. En effet, il a été démontré à plusieurs reprises que les taux de HDL-C étaient inversement corrélés avec la mortalité et le risque d'évènements coronariens [35]. Par contre, bien que le HDL-C reste un biomarqueur valable du risque cardiovasculaire, certaines études questionnent le rôle des interventions

pharmacologiques visant à hausser le taux de HDL-C afin de prévenir les maladies coronariennes. Rader [36] rapporte que plusieurs études visant à augmenter de façon pharmacologique les taux de HDL-C circulants n'ont pas réduit les risques d'évènements cardiovasculaires. Les auteurs suggèrent plutôt que la fonctionnalité des HDL et leur capacité d'efflux seraient des meilleurs marqueurs prédictifs du risque, ou encore des meilleures cibles d'intervention que les niveaux de HDL-C.

2.1.2 Inflammation

L'implication de l'inflammation dans le développement de l'athérosclérose a été soulevée suite à certaines études portant sur les protéines inflammatoires en circulation. Le principal marqueur connu est la protéine C-réactive (CRP), qui est une protéine de phase aiguë de la réponse inflammatoire, sécrétée par le foie [37]. Des études observationnelles ont associé des niveaux plasmatiques élevés de CRP au risque d'évènements cardiovasculaires, indépendamment d'autres facteurs de risque [37]. Toutefois, les études n'ont pas clairement établi si les niveaux de CRP étaient une cause de l'athérosclérose ou plutôt une conséquence de l'inflammation associée à l'athérosclérose. À cet effet, l'implication de l'interleukine-1 (IL-1) et l'interleukine-6 (IL-6) sur le risque cardiovasculaire a été investiguée, puisqu'il a été montré que ces cytokines régulent en amont la production de CRP et sont produites dans la plaque d'athérosclérose. De plus, ces cytokines modulent aussi l'expression d'autres facteurs comme le *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) et le *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), des médiateurs d'inflammation et de recrutement monocytaire, aussi associés à la formation et à la progression de l'athérosclérose. Des études d'association ont montré une corrélation positive entre les taux plasmatiques d'IL-6 et le risque de maladie coronarienne, et ce de façon indépendante des taux de CRP [38]. Plus récemment, l'étude CANTOS cherchait à évaluer l'effet de l'inhibition pharmacologique de l'interleukine-1 β sur la prévention du risque d'évènements cardiovasculaires [39]. Cette cytokine est située en amont de la cascade inflammatoire, régulant non seulement la production de la CRP, mais aussi de l'IL-6 [40]. Les résultats de l'étude CANTOS ont montré qu'une réduction de l'IL-1 β est associée à une baisse des niveaux de CRP, et une diminution des risques d'évènements cardiovasculaires. Par ailleurs, une absence de modulation des taux de HDL-C, de LDL-C ou de triglycérides par

l'inhibition de l'IL-1 β appuie fortement le rôle de l'inflammation comme facteur indépendant des lipides dans le développement de l'athérosclérose. En résumé, l'inflammation soutenue contribuerait à la formation de la plaque via le recrutement des macrophages en plus de créer un milieu propice à la modification des lipoprotéines connue pour favoriser l'accumulation de cholestérol et la formation de cellules spumeuses.

2.2 Formation de la plaque d'athérome

2.2.1 Histologie des artères

Afin de bien comprendre les mécanismes menant à la formation de la plaque d'athérome, il est important de connaître la structure de base des vaisseaux sanguins. Ceux-ci sont subdivisés en trois couches, l'intima étant en contact avec la lumière des vaisseaux et la circulation sanguine, la média étant la couche intermédiaire, et la plus éloignée étant l'adventice (Figure 2). L'intima est composée principalement de cellules endothéliales séparées de la média par une couche composée de fibres élastiques. Les cellules endothéliales participent à plusieurs fonctions de la circulation sanguine, assurant entre autres la perméabilité vasculaire en agissant comme une barrière semi-sélective qui contrôle le passage des éléments dans l'espace sous-endothélial. De plus, l'endothélium module aussi le tonus vasculaire par la sécrétion de molécules vasodilatatrices (oxyde nitrique, EDHF–*Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor*, PGI₂-*prostacyclin*) ou vasoconstrictrices (endothéline) afin de permettre l'apport adéquat de sang vers les différents organes. La seconde couche des vaisseaux sanguins, la media, est formée de cellules musculaires lisses et protéines élastiques. Les cellules musculaires lisses vasculaires participent aussi à la vasodilatation et à la vasoconstriction des vaisseaux, en réponse aux facteurs sécrétés par les cellules endothéliales, mais aussi par l'effet du système nerveux sympathique, agissant par l'effet de neurotransmetteurs sur les récepteurs alpha- et bêta-adrénergiques présents à la surface de ces cellules. L'adventice, est la couche la plus éloignée de la lumière des vaisseaux et est composée majoritairement de collagène et autres tissus connectifs produits par les fibroblastes résidents, ce qui permet d'assurer le support et la stabilité des vaisseaux.

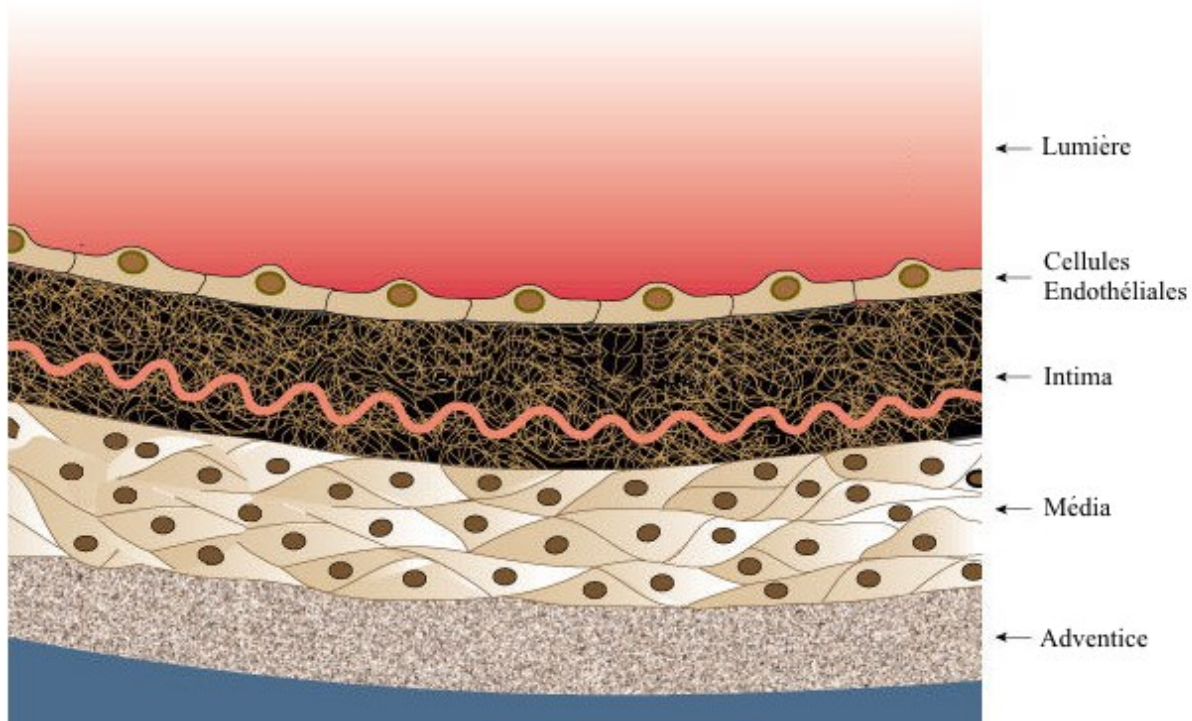


Figure 2. Histologie d'une artère. Figure adaptée de Lusis [41].

Représentation des différentes couches de l'endothélium d'une artère humaine de moyen calibre en partant de la lumière du vaisseau. Permission de citation ©Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**: p. 233.

2.2.2 Dysfonction endothéliale

À ce jour, l'élément déclencheur de l'athérosclérose n'est pas clairement établi, mais plusieurs facteurs contribuant à la formation de la plaque ont été identifiés, dont la perte ou une diminution des fonctions de l'endothélium vasculaire. En conditions normales, l'endothélium constitue une barrière semi-imperméable à la circulation sanguine, qui prévient l'infiltration des cellules sanguines dans la paroi vasculaire, mais permet l'échange de nutriments et de certaines molécules avec l'espace sous-endothélial. De plus, l'endothélium peut influencer la dilatation des vaisseaux sanguins en réponse à des fluctuations de la circulation sanguine, afin d'assurer l'apport sanguin continu aux différents tissus et organes. Cette dilatation des vaisseaux (vasodilatation) se produit par l'intermédiaire de l'oxyde nitrique (NO) sécrété par les cellules endothéliales. En réponse aux forces de cisaillement, exercées par la circulation sur l'endothélium, les cellules peuvent synthétiser du NO à partir de l'acide aminé L-arginine,

via l'activité enzymatique de la *endothelial nitric oxide synthase* (eNOS) [42]. D'autre part, l'EDHF et la prostacycline peuvent aussi contribuer à la vasodilatation de façon indépendante du NO [42]. L'EDHF agit en augmentant la conductivité au potassium des SMC vasculaires et entraîne la dépolarisation, contribuant au maintien du tonus vasculaire. La prostacycline est dérivée de l'action des cyclooxygénases et contribue à la vasodilatation en plus d'avoir un rôle dans la régulation de l'endothélium et d'inhiber l'agrégation plaquettaire [42, 43].

La dysfonction endothéliale se produit lorsqu'il y a un déséquilibre entre la production et la dégradation de NO. Plus précisément, il peut se produire une diminution de la production ou bien une augmentation de la dégradation de NO, ce qui réduit donc la capacité de vasodilatation du vaisseau. Plusieurs facteurs peuvent contribuer à la baisse de la biodisponibilité du NO, tel qu'une hausse de la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS). Cette dysfonction endothéliale peut entraîner différents effets associés avec la formation de la plaque athérosclérotique. En effet, il a été rapporté que lors d'une diminution de la disponibilité de NO, l'intégrité de la barrière endothéliale est compromise, ce qui mène à un influx des LDL dans l'espace sous-endothélial [44]. Ces LDL seront éventuellement modifiées par une oxydation locale et contribueront au développement de la plaque.

En plus d'être impliqué dans une hausse de la perméabilité endothéliale, la dysfonction endothéliale a également été impliquée dans le processus d'activation endothéliale qui joue un rôle majeur dans le recrutement des cellules inflammatoires et donc dans les étapes précoces de l'athérosclérose. L'activation endothéliale se traduit par une induction de l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, qui sont impliquées dans l'infiltration des monocytes. À cet effet, il a été démontré que la suppression de l'activité de la eNOS entraîne une hausse de l'expression de la *vascular cell adhesion protein 1* (VCAM-1), une molécule d'adhésion cellulaire. Ces résultats suggèrent que certaines zones où le flot sanguin est perturbé, présentant possiblement une réduction de NO dérivé de l'endothélium, sont plus susceptibles à l'activation endothéliale et à l'athérosclérose. D'ailleurs, une réduction des forces de cisaillement est associée à l'augmentation de l'expression endothéliale de molécules d'adhésion, dont VCAM-1 et *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), qui participent au recrutement leucocytaire [45]. Ces résultats concordent avec la démonstration que les plaques se forment aux endroits où les forces de cisaillement sont plus faibles, particulièrement où le

flot sanguin est perturbé ou turbulent, comme à la bifurcation de la carotide en deux branches, interne et externe [46].

2.2.3 Adhésion et infiltration monocytaire

Tel que mentionné dans la section précédente, la dysfonction des cellules endothéliales est impliquée dans leur activation puisqu'elles exprimeront différentes molécules d'adhésion qui favorisent le recrutement des cellules inflammatoires dans la paroi vasculaire. Cette induction des protéines d'adhésion peut aussi être causée par des cytokines inflammatoires comme l'IL-1 et le *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α), qui sont sécrétées par les cellules de la paroi vasculaire suite à une exposition aux LDL oxydées (OxLDL) [47]. Les OxLDL peuvent aussi induire la production par les cellules vasculaires de MCP-1, une protéine favorisant le recrutement des monocytes. Lors de ce recrutement, les monocytes circulants roulent d'abord à la surface de l'endothélium vasculaire et sont ralentis par des interactions entre les L-sélectines à la surface des monocytes et les P- et E-sélectines exprimées par les cellules endothéliales. Suite au ralentissement, les intégrines des monocytes permettent l'attachement à la paroi vasculaire en se liant à ICAM-1 et à VCAM-1 exprimée par l'endothélium. L'attachement des monocytes à la paroi vasculaire facilite leur déplacement vers l'espace sous-endothélial par diapédèse, un processus de migration induit par l'effet de protéines comme la *junctional adhesion molecule-1* (JAM-A), présente à la jonction des cellules endothéliales, et la *platelet adhesion molecule-1* (PECAM-1) exprimée par les monocytes [48]. Dans l'intima, les monocytes sont exposés à plusieurs facteurs inflammatoires et cytokines sécrétés par les cellules endothéliales et les macrophages déjà présents dans l'espace sous-endothélial. Sous l'action de ces différents facteurs, comme le *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF), les monocytes fraîchement recrutés vont alors se différencier en macrophages [49].

2.2.3. Cellules spumeuses et progression de la plaque

Une composante importante de l'athérosclérose est l'infiltration des LDL à l'intérieur de la paroi vasculaire. Ces dernières peuvent être oxydés par les ROS et des radicaux libres produits par les cellules de la paroi vasculaire [50], mais peuvent aussi être oxydées par l'activité de

certaines enzymes de la familles des myéloperoxydases et des lipoxigénases [51]. Les LDL modifiées sont ensuite captées par les macrophages et les cellules musculaires lisses (CML) présents dans la paroi vasculaire, ce qui va entraîner la formation de cellules spumeuses, un phénotype cellulaire caractérisé par une accumulation massive de cholestérol, typique de la plaque d'athérosclérose [52]. De plus, les macrophages infiltrés sécrètent aussi des facteurs de croissance qui favorisent le recrutement et la prolifération des CML [53]. Les CML ainsi recrutées vont aussi produire des molécules de matrice extracellulaire, comme du collagène, de l'élastine et des protéoglycanes [54] qui contribuent à la formation d'une chape fibreuse, entourant un coeur nécrotique composé de dépôt de cholestérol, de cellules spumeuses et de CML apoptotiques, ainsi que de débris cellulaires. De plus, des dépôts de granules de calcium peuvent s'accumuler dans le coeur nécrotique, menant à l'accumulation et la formation de large amas calcifiés [54]. La chape fibreuse, formée des cellules endothéliales, de fibrine et de collagène, constitue ainsi une barrière entre le coeur nécrotique et la lumière endothéliale, stabilisant ainsi la plaque d'athérosclérose.

Le maintien de l'inflammation, le recrutement continu de monocytes et de CML, la formation et l'apoptose des cellules spumeuses, la fibrose et la calcification constituent ensemble une boucle de rétroaction contribuant à la progression et à l'épaississement de la plaque. Plusieurs de ces caractéristiques sont utilisées pour définir les étapes de la progression des lésions athérosclérotiques. Une classification de Stary et ses collègues, présentant une mise à jour de la classification de l'AHA, divise la progression des lésions de la plaque d'athérosclérose en stades numérotés de I à VIII [55]. Les lésions des premiers stades (I à III) sont dites cliniquement silencieuses puisqu'aucune manifestation clinique ou symptomatique n'est observable durant ces stades de progression. Les lésions I, II et III sont caractérisées par l'infiltration de cellules spumeuses, d'abord de façon isolée au stade I, puis plus définie au stade II. De plus, les lésions de type III sont définies par la présence d'amas de cholestérol extracellulaire. L'accumulation de lipides et la formation d'un coeur nécrotique de lipides extracellulaires sont caractéristiques de lésions du stade IV. Les lésions de type IV et subséquentes sont caractérisées par une diminution assez marquée de la lumière des vaisseaux pouvant entraîner un événement cardiovasculaire et même la mort [55].

2.2.4. Rupture de la plaque

La progression de la plaque au fil des années, voire des décennies, contribue au rétrécissement de la lumière des vaisseaux et réduit le flot sanguin. Cette diminution du flot peut entraîner des symptômes et des complications lorsque ce blocage limite l'apport de sang vers les artères coronariennes irriguant le cœur. Par contre, la rupture de la plaque reste un des événements les plus à craindre chez les patients avec des lésions athérosclérotiques avancées. Plusieurs facteurs inflammatoires peuvent déstabiliser la chape fibreuse et contribuer à l'instabilité de la plaque. La rupture peut alors survenir lorsque la balance penche vers une production accrue de facteurs qui dégradent la matrice ou diminuent sa synthèse.

Il a été montré que l'interféron gamma (IFN γ), une cytokine inflammatoire produite par les leucocytes, diminuait la production de collagène des CML vasculaires humaines *in vitro* [56]. L'inflammation au niveau de la plaque entraîne le recrutement continu de monocytes et la production d'IFN γ par les macrophages, contribuant ainsi à la déstabilisation de la plaque par une diminution de synthèse de la matrice extracellulaire. De plus, différentes études ont montré que les macrophages produisaient des enzymes protéolytiques capables de dégrader la matrice extracellulaire. Plusieurs membres de la famille des métalloprotéinases (MMP) ont été observés dans les plaques athérosclérotiques [57]. Les cathepsines S, K et F, qui sont aussi des protéases produites par les macrophages, ont été caractérisées dans des plaques humaines. Il a été montré que ces protéases pouvaient dégrader l'élastine, un composant de la limitante élastique qui entoure l'intima [57]. Des enzymes de la famille des sérines protéases, dont u-PA l'*urokinase-type plasminogen activator* (u-PA) et le *tissue plasminogen activator* (t-PA), peuvent aussi contribuer à la déstabilisation de la plaque suite à leur activité de conversion du plasminogène en plasmine, entraînant ultimement la dégradation de la fibrine, de la fibronectine, de la laminine et d'autres composantes de la matrice extracellulaire [57]. L'activité protéolytique de plusieurs de ces enzymes est normalement limitée par différents inhibiteurs de protéases dont des membres de la famille des *tissue inhibitor of metalloproteinase* (TIMP), le *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1). Un déséquilibre entre l'activité enzymatique et l'inhibition de ces protéases peut donc accélérer la dégradation de la chape fibreuse et entraîner la rupture du cœur nécrotique suite à un événement déclencheur, comme l'activité physique, des variations émotionnelles, du stress, ainsi qu'une

tension artérielle augmentée ou l'activation du système nerveux sympathique [54]. Suite à la rupture, les différents éléments composant le cœur nécrotique sont exposés et libérés dans la circulation sanguine, entraînant ainsi la cascade d'activation plaquettaire et la formation d'un thrombus afin de combler la section qui a subi une rupture. Par contre, l'occlusion complète de l'artère par un caillot entraîne une thrombose, limitant ainsi l'apport sanguin des tissus alimentés par ce vaisseau (ischémie), ce qui peut ultimement aboutir à la nécrose des tissus non-irrigués sur une période de temps prolongée. De plus, le thrombus peut provoquer une embolie s'il se détache de la paroi artérielle et migre dans la circulation pour aller bloquer un autre vaisseau. La rupture du cœur nécrotique est donc responsable des complications majeures associées à l'athérosclérose, comme les thromboses et embolies [58]. La Figure 3 ci-dessous résume les étapes de la formation de la plaque athérosclérotique.

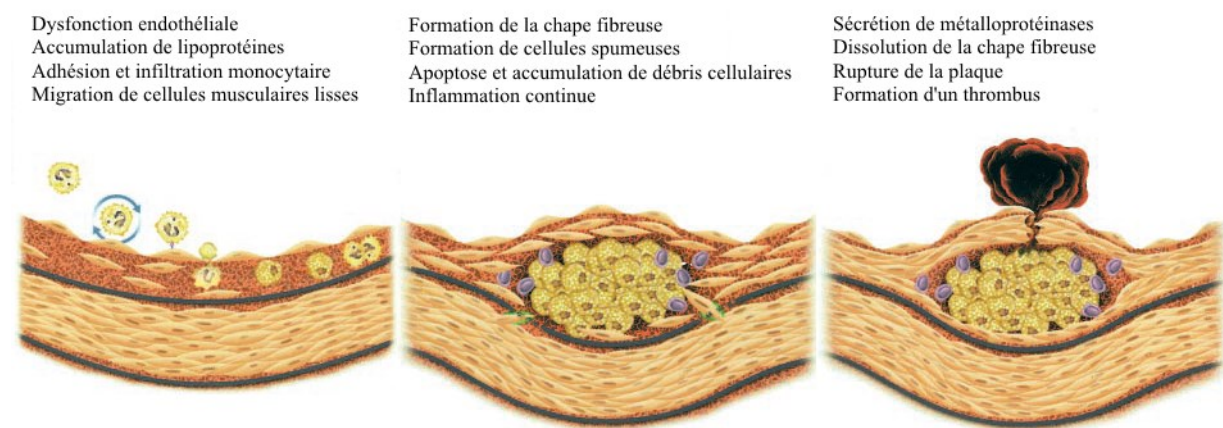


Figure 3. Étapes clés de la formation et de la progression de la plaque. Figure adaptée de Libby [53].

De gauche à droite : Une dysfonction endothéliale et l'infiltration de lipoprotéines oxydées entraîne une inflammation continue menant au recrutement et à l'infiltration monocytaire. Ceci entraîne la formation de la cellules spumeuses qui contribuent à l'apparition de la plaque. L'apoptose des cellules spumeuses entretient l'inflammation et la progression de la plaque. La production de protéases et métalloprotéinases par les cellules immunitaires présentes dans la plaque affaiblissent l'intégrité de la chape fibreuse, et la rupture de cette dernière peut induire la formation d'un thrombus. Permission de citation ©Libby, P., *Inflammation and Atherosclerosis*. Circulation, 2002. 105(9): p. 1135-1143.

2.3 Sous-types de macrophages dans la plaque

Le recrutement monocyttaire au niveau de l'endothélium vasculaire et leur différenciation subséquente en macrophage résulte de l'activation de la réponse inflammatoire. Outre la captation des lipoprotéines modifiées, les rôles des macrophages dans l'athérosclérose sont multiples. Les macrophages sont capables de phagocytose, un processus par lequel la membrane peut se déformer et englober les débris cellulaires afin de les dégrader [59]. L'expression de récepteurs *scavengers* et de récepteurs de type *Toll* (*Toll-like receptor*, TLR) par les macrophages confirme leurs rôles de phagocytes spécialistes, puisque ces récepteurs permettent la reconnaissance extracellulaire de pathogènes menant à la phagocytose. Plusieurs autres fonctions sont associées aux macrophages : la production de molécules antimicrobiennes comme les ROS et les radicaux libres, la présentation d'antigènes, la captation et l'internalisation de complexes antigènes-anticorps et la production de facteurs de croissance, la régulation du métabolisme osseux et beaucoup d'autres [60]. Cette diversité de fonctions médiées par les macrophages est possible grâce à leur plasticité fonctionnelle. Tel que présenté à la figure 4, différents signaux présents au site de différenciation vont polariser les macrophages vers un phénotype avec des fonctions spécifiques. Le premier phénotype identifié a été le macrophage M1 et le deuxième principal sous-type de macrophage identifié, le sous-type M2, a été appelé macrophage alternatif, en opposition aux macrophages activés de façon classique (M1). Les deux phénotypes, M1 et M2 présentent un profil inflammatoire complètement opposée, non seulement selon leur rôle dans la réponse immunitaire, mais aussi selon les signaux responsables de leur différenciations respectives.

2.3.1 Les macrophages M1

Les macrophages constituent l'une des premières lignes de défense contre les pathogènes et certaines molécules dangereuses. En réponse aux pathogènes, certaines cellules leucocytaires produisent de l'IFN γ , une cytokine régulant l'expression de gènes inflammatoires. En effet, il a été montré que l'IFN γ induit la polarisation des macrophages vers un phénotype nommé M1 qui sont des cellules qui assurent une réponse immunitaire en vue de l'élimination des agents infectieux [61]. Dans l'endothélium vasculaire, l'infiltration de lipoprotéines modifiées favorise le recrutement de cellules immunitaires dont les lymphocytes T [62], induisant alors

la production d'IFN γ et favorisant la polarisation des macrophages vers un sous-type pro-inflammatoire. En plus de la signalisation par l'IFN γ , la polarisation des macrophages en phénotype M1 nécessite aussi la reconnaissance des pathogènes par des récepteurs capables de lier des motifs associés aux pathogènes (*pathogen associated molecular patterns*, PAMP) ou à des *danger associated molecular pattern* (DAMP). Les lipopolysaccharides (LPS), des composants de la membrane externe des bactéries Gram négatif, constituent un PAMP reconnu par les *Toll-like receptor 4* (TLR4) à la surface des macrophages. Il est toutefois important de noter que dans le contexte de l'athérosclérose, il est peu probable que le LPS soit impliqué dans la polarisation en M1. Ainsi, d'autres ligands du TLR4, tels les lipides et lipoprotéines oxydés, pourraient contribuer à cette polarisation. En effet, il a été démontré que ces composés sont reconnus par les macrophages comme DAMP et entraînent l'activation de TLR4 dans les CML et les macrophages et contribuent donc à la polarisation de macrophages vers un phénotype M1 pro-inflammatoire [63, 64]. Cette polarisation induite par l'activation du TLR4 et la liaison de l'IFN γ avec son récepteur entraîne une cascade de signalisation caractérisée par l'activation de plusieurs kinases et facteurs de transcriptions pro-inflammatoires dépendant de *Janus kinase 2* (JAK2), de *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT1), de l'*Activator Protein 1* (AP-1) et du *Nuclear Factor-Kappa B* (NF- κ B) [61]. L'activation de cette cascade de signalisation pro-inflammatoire induit la transcription de plusieurs cytokines, comme le TNF- α et certaines interleukines (IL-1 β , IL-6, IL-8), qui contribuent aussi à l'activation et à l'exacerbation de la réponse inflammatoire en favorisant le recrutement de cellules immunitaires via une augmentation d'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1, des E-sélectines et la production de ROS afin de lutter contre les pathogènes [65]. De plus l'IL-1 et le TNF- α peuvent aussi activer l'expression du NF- κ B d'autres cellules, perpétuant la boucle de réponse inflammatoire [66]. Les macrophages de phénotype M1 seraient donc différenciés dans l'endothélium vasculaire afin de répondre à la présence d'un pathogène ou d'une particule reconnue comme dangereuse, tel les OxLDL dans le cadre de l'athérosclérose. Les macrophages M1 produiraient alors des molécules pour induire le recrutement d'autres cellules immunitaires afin de résoudre l'inflammation et favoriser la récupération de ces particules.

2.3.2. Les macrophages M2

À l'inverse, les macrophages activés de façon alternative (M2) expriment un profil d'expression anti-inflammatoire. Stein et ses collègues [67] avaient remarqué que des macrophages exposés à l'interleukine-4 (IL-4) présentaient un phénotype différent des macrophages exposés à l'IFN γ , étant caractérisés par une hausse d'expression du *mannose receptor* (MR) et une diminution de production de cytokines inflammatoires. Par la suite, les récepteurs membranaires *C-type mannose receptor-1* (MRC-1) et le *Dendritic cell specific ICAM-3 grabbing nonintegrin* (DC-SIGN) ont été identifiés comme des marqueurs du sous-type M2 qui sont régulés à la hausse par l'IL-4 [68]. La liaison de l'IL-4 avec son récepteur active une voie de signalisation dépendante de STAT6 [69], qui réprime l'expression de molécules inflammatoires (TNF α , IL-1 and IL-6) par une inhibition de la voie NF- κ B. De plus, l'IL-4 augmente l'expression de molécules anti-inflammatoires comme l'interleukine-10 (IL-10) et le *Tumoral Growth Factor beta* (TGF- β) [65], qui peuvent à leur tour réprimer l'expression de molécules inflammatoires résultant de l'activation de NF- κ B, dont le TNF- α , l'IFN γ et plusieurs interleukines (IL-1 β , IL-2, IL-3, IL12). L'inhibition de ces cytokines inflammatoires par la polarisation M2 modère la réponse inflammatoire et dirige les macrophages vers un phénotype associé à la résolution de l'inflammation. L'activation en phénotype M2 est aussi marquée par une augmentation de l'expression et de l'activité des *peroxysome proliferator-activated receptor* (PPAR), qui sont des récepteurs nucléaires possédant une activité de facteur de transcription et régulant l'expression de plusieurs gènes responsable du transport et du métabolisme énergétique de la cellule (cholestérol, lipides et glucides) [60]. La hausse d'expression du PPAR surviendrait suite à une augmentation de la demande énergétique des macrophages afin d'exercer des fonctions anti-inflammatoires [60]. Aussi, la polarisation en macrophage M2 favorise la réparation des tissus et la revascularisation via la production de facteurs pro-angiogéniques et pro-fibrotiques, dont le TGF- β , le *fibroblast growth factor 2* et le *placental growth factor* [70, 71]. Différents variants du phénotype M2 ont été répertoriés par la suite, qui sont polarisés par un panel différent de signaux anti-inflammatoires, mais présentant un profil d'expression majoritairement anti-inflammatoire [65].

2.3.3. Autres phénotypes de macrophages

Plusieurs autres sous-types de macrophages ont aussi été recensés au niveau de la plaque, avec des phénotypes intermédiaires entre M1 et M2, voire complètement différents. Kadl et ses collègues [72] ont montré que l'exposition de macrophages à des phospholipides oxydés entraîne leur polarisation en un sous-type de macrophages nommés Mox, qui sont associés à l'activation du facteur de transcription Nrf2. Ce phénotype de macrophage est caractérisé par l'expression accrue d'enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydant, comme l'hème oxygénase-1 (HO-1), la glutathione S-transférase (GST) et la thiorédoxine réductase (Txnrd1) [72]. Les Mox ont une capacité chimiotactique et phagocytaire réduite par rapport aux sous-types M1 et M2. De plus, l'expression de gènes inflammatoires comme COX-2 et IL-1 β est haussée dans les Mox, mais beaucoup moins que dans les M1. Marques et ses collègues [73] ont présenté que l'exposition simultanée de macrophages aux OxLDL, au LPS et à l'IFN γ , induisait la polarisation vers un phénotype M1. Par ailleurs, la plaque d'athérome peut être caractérisée par la formation de nouveaux capillaires suite à l'épaississement de l'intima, un processus appelé néovascularisation [74]. La rupture de ces vaisseaux au sein de la plaque peut entraîner une hémorragie, caractérisée par l'infiltration d'érythrocytes et d'hème. Deux autres sous-populations de macrophage, nommées M(hb) et Mhème ont été observées dans les plaques d'athérosclérose. L'exposition des monocytes aux complexes d'hémoglobine et d'haptoglobine (hb/hp) ou à l'hème induit la polarisation en macrophages M(hb) et Mhème, respectivement. La polarisation en sous-types M(hb) et Mhème augmente l'expression du CD163. Ce dernier est un récepteur qui peut lier et internaliser l'hémoglobine et les complexes hb/hg, conférant aux phénotypes M(hb) et Mhème un rôle dans la clairance et à l'endocytose de ces molécules qui contiennent du fer, un élément pouvant contribuer au stress oxydant. À cet effet, l'expression de l'HO-1, une enzyme responsable de la dégradation de l'hème, est aussi augmentée dans les Mhème [65].

Le sous type M4 est polarisé par la chimiokine CXCL4, aussi appelé *platelet factor 4*, vers un phénotype intermédiaire entre le M1 et M2, mais incapable de phagocytose [65]. Puisque les M4 n'expriment pas de CD163, l'expression de l'HO-1 induite par l'interaction du récepteur avec les complexes hémoglobine/haptoglobine est limitée. Erbel et ses collègues [75] ont détecté des macrophages M4 étaient présents dans la plaque, de façon plus importante chez les

patients ayant une maladie coronarienne sévère. Ces chercheurs ont émis l’hypothèse que les M4 pourraient contribuer à la déstabilisation de la plaque, puisque ceux-ci démontrent une augmentation de l’expression de la *matrix metalloproteinase-7* (MMP7), une enzyme responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire et associée à la rupture de la plaque.

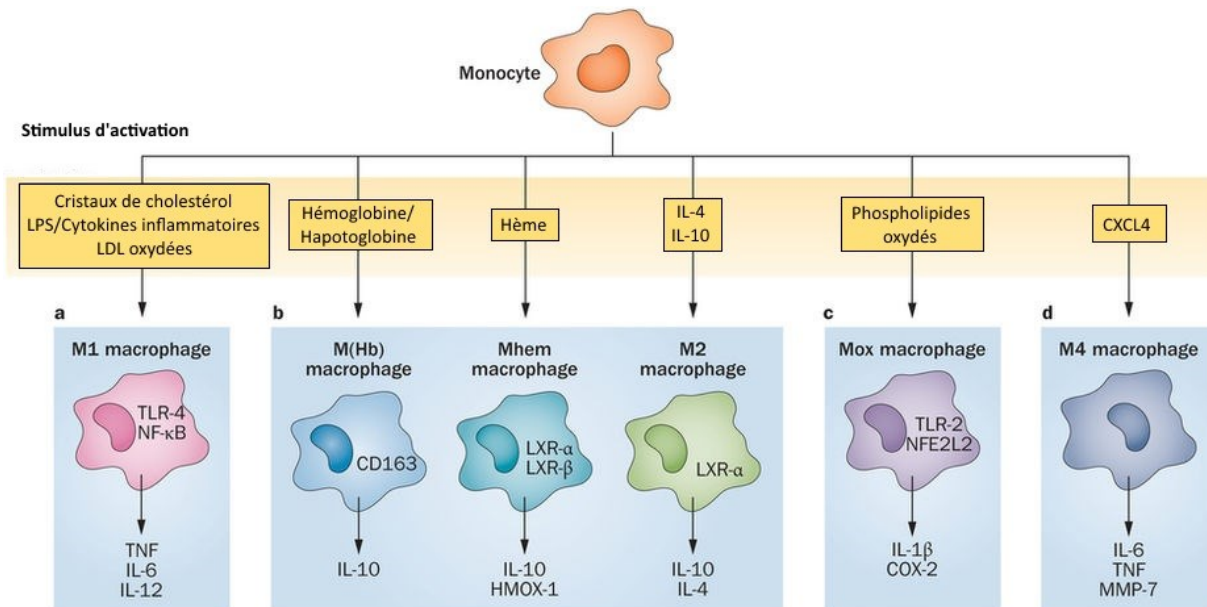


Figure 4. Phénotypes de macrophages répertoriés au niveau de lésions athérosclérotiques. Figure adaptée de Chinetti-Gbaguidi et collègues [65].

Les macrophages sont présentés selon les différents stimuli répertoriés pour les polariser vers des phénotypes distincts, ainsi les voies de signalisation intracellulaire activés par la polarisation vers les phénotypes, ainsi que différentes cytokines et protéines caractérisant ceux-ci. Permission de citation ©Chinetti-Gbaguidi, G., S. Colin, and B. Staels, *Macrophage subsets in atherosclerosis*. Nat Rev Cardiol, 2015. 12(1): p. 10-7.

2.3.4. Localisation des sous-types M1 et M2 dans la plaque

Plusieurs équipes de recherche ont d’abord étudié l’expression de marqueurs phénotypiques des macrophages afin de caractériser la localisation des M1 et M2 au niveau de la plaque, ce qui pourrait renseigner sur leur rôle dans la formation et la progression de la plaque d’athérosclérose. Une étude histologique effectuée à partir de carotides de patients a mesuré

l'expression d'ARN messagers (ARNm) dans différentes sections de la plaque [76]. Les résultats démontrent que l'expression du MR, associé au phénotype M2, était plus élevée dans les régions stables et distales des plaques de patients asymptomatiques (sans historique de maladies cardiovasculaires), mais aussi dans le coeur de la plaque en développement. Dans les plaques de patients symptomatiques, l'expression du MR était fortement réduite au niveau du coeur, indiquant possiblement une plus grande proportion de macrophages M1 dans cette région. Chinetti-Gbaguidi et ses collègues [77] ont remarqué une distribution similaire de l'ARN de ce marqueur au niveau de plaques provenant d'endartériectomies de patients humains, rapportant que les macrophages exprimant le MR étaient localisés en périphérie du coeur lipidique, tandis que des sous-types n'exprimant pas le MR étaient abondamment présents dans le coeur de la plaque. L'analyse de segments de lésions athérosclérotiques d'endartériectomies de patients a révélé que des marqueurs associés au M1 sont présents dans des régions entre l'intima et le coeur nécrotique, des sites connus pour leur risque élevé de rupture [78]. Par contre, aucun patron d'expression de marqueur des sous-types n'était prédominant au niveau de la chape fibreuse, indiquant la présence égale des M1 et M2. Comme plusieurs études rapportent que les M1 semblent être situés dans des régions à risque de rupture et proche du coeur nécrotique, ceci pourrait indiquer que les M1 favorisent la progression du coeur de la plaque ou de la rupture de celle-ci

3. Implications des fonctions de transport du cholestérol des macrophages dans l'athérosclérose

Le transport du cholestérol par les macrophages est un phénomène complexe, impliquant la capture et l'internalisation des lipoprotéines, mais aussi l'efflux du cholestérol hors des cellules. Les lipoprotéines sont captées par différents récepteurs à la surface cellulaire ou bien par d'autres mécanismes indépendants de l'endocytose des récepteurs. Ces mécanismes de capture et d'internalisation participent à la récupération du cargo lipidique des lipoprotéines. Les lipoprotéines ainsi récupérées sont ensuite dégradées dans les endosomes tardifs et les lysosomes. Le cholestérol des lipoprotéines est présent sous deux formes, soit sous sa forme libre ou estérifié, c'est-à-dire conjugué à un acide gras. Le cholestérol estérifié est ensuite hydrolysé en cholestérol libre dans des vésicules endosomales et lysosomales. Par la suite, le

cholestérol libre peut être réestérifié par l'enzyme ACAT (*Acyl-CoA cholesterol acyltransferase*) [79]. Une fois estérifié, la majeure partie du cholestérol est stockée dans des organelles appelées gouttelettes lipidiques [80]. Ce stockage permet de limiter les effets cytotoxiques du cholestérol et des lipides. Les acides gras libres et plusieurs métabolites dérivés de ceux-ci peuvent favoriser l'apoptose des cellules, corrélé avec une diminution de la phosphorylation des protéines kinases B et l'activation de la voie NF- κ B [81]. L'accumulation de cholestérol libre contribue aussi à la cytotoxicité en modifiant la fluidité membranaire, en dérangeant certains domaines de la membrane, en formant des cristaux de cholestérol intracellulaire, et en générant des espèces de lipides oxydées, tous des effets qui peuvent induire des perturbations des organelles cellulaires et induire l'apoptose [82]. Afin de prévenir l'accumulation excessive de cholestérol dans les cellules, le cholestérol estérifié peut être remis en disponibilité en étant hydrolysé par plusieurs enzymes de la famille des hydrolases, dont la *hormone-sensitive lipase* (HSL) et les carboxylestérases 1 et 3 (CES1 et CES3) [83, 84]. L'estérification, le stockage et l'hydrolyse du cholestérol constitue un processus dynamique, permettant de maintenir la balance de cholestérol intracellulaire. La baisse du stock de cholestérol cellulaire régule à la hausse les gènes et les protéines reliés au métabolisme et à la capture des lipoprotéines. À l'opposé, l'internalisation de lipoprotéines et la synthèse *de novo* du cholestérol entraîne une hausse de régulation des gènes et protéines impliquées dans l'exportation de cholestérol hors de la cellule.

Cette sortie du cholestérol des cellules constitue la première étape du TIC qui permet l'élimination de cholestérol hors des tissus périphériques en vue de l'acheminer au foie pour assurer son excrétion au niveau biliaire hors de l'organisme (Figure 5). Ainsi, ce mécanisme de transport peut limiter l'accumulation de cholestérol dans les cellules des tissus périphériques et ainsi prévenir la formation de la plaque d'athérosclérose. L'efflux de cholestérol se fait par l'intermédiaire d'une interaction entre des accepteurs, tel que les HDL, et des récepteurs ou transporteurs à la surface des macrophages. Suite à l'efflux vers les différents accepteurs, une enzyme présente dans le milieu extracellulaire appelée lécithine : cholestérol acyltransférase (LCAT) se lie aux lipoprotéines HDL naissantes et catalyse une réaction transférant un acide gras d'un phospholipide vers le cholestérol, formant ainsi des esters de cholestérol [85]. Les esters de cholestérols étant plus hydrophobes que le cholestérol

libre, ceux-ci vont s'entasser au centre de la lipoprotéine. Une fois chargées, les HDL réintègrent la circulation sanguine et sont transportées vers le foie afin d'y être catabolisées. Dans la circulation, les HDL interagissent aussi avec la CETP, favorisant le transfert d'esters de cholestérols des HDL vers les LDL ou les VLDL, et le transfert de TG de ces dernières vers les HDL [86]. Ce mécanisme de transport par les LDL constitue une seconde voie par laquelle l'organisme peut cataboliser les esters de cholestérol, puisque les LDL sont récupérés par le récepteur rLDL des hépatocytes, entraînant leur capture et dégradation complète. En parallèle, le cholestérol des HDL est aussi récupéré par le foie, mais à la différence des LDL, ce transfert s'effectue plutôt par le mécanisme de captation sélective par les récepteurs SR-BI exprimés à la surface des hépatocytes [87]. Collectivement, ces différentes étapes du TIC limitent donc l'accumulation de cholestérol dans les cellules des tissus périphériques afin de prévenir la formation de la plaque d'athérosclérose.

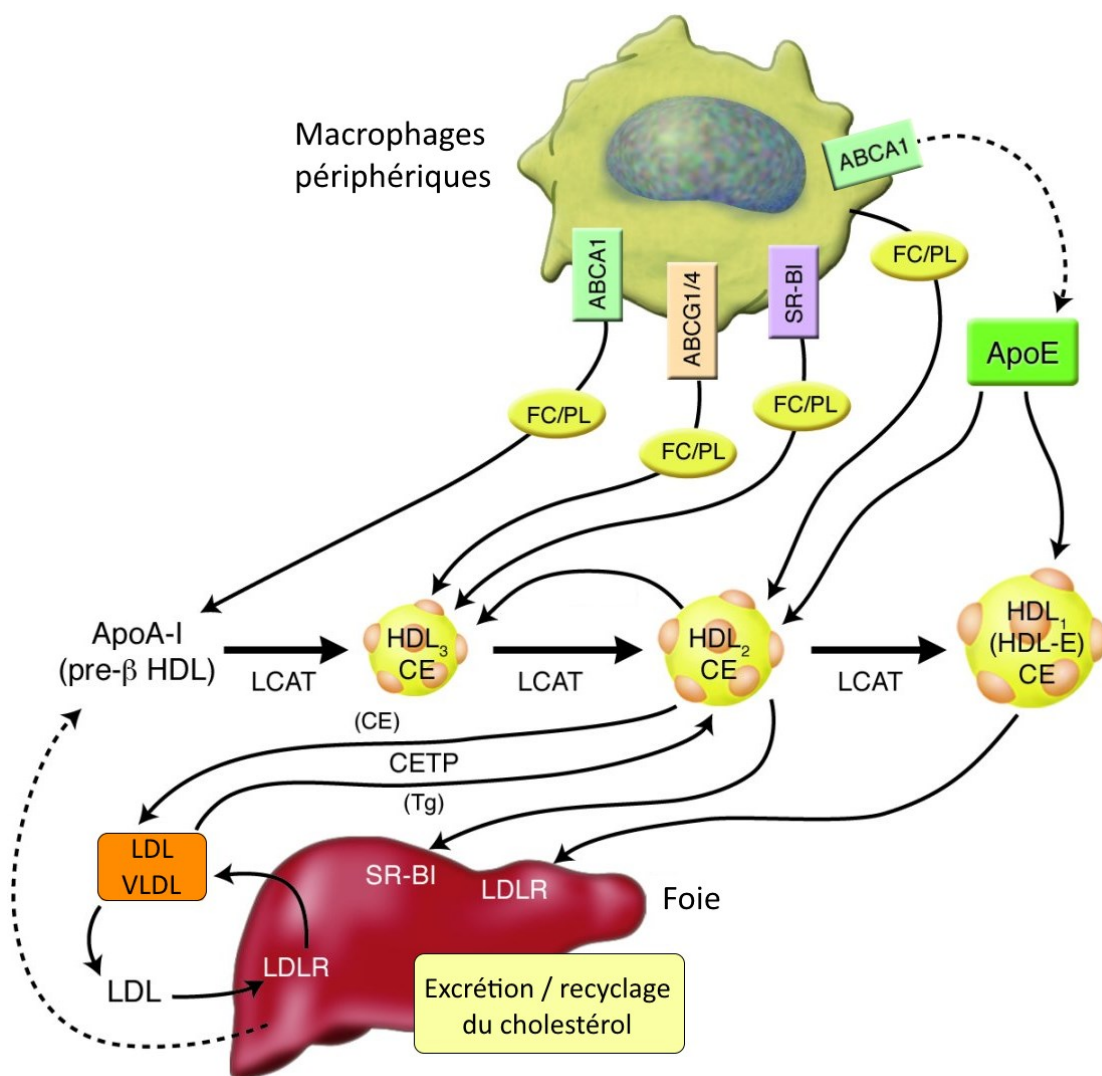


Figure 5. Principales étapes du transport inverse du cholestérol (TIC). Figure adaptée de Mahley et collègues [88].

Présentation des transporteurs de cholestérol impliqués dans l'efflux de cholestérol des macrophages en périphérie, les ligands respectifs de ces transporteurs, les différentes enzymes plasmatiques impliqués dans les échanges de lipides entre lipoprotéines, et les récepteurs responsable de la captation hépatique des lipoprotéines. L'ensemble de ces étapes constituent le transport inverse du cholestérol. Permission de citation ©Mahley, R.W., Y. Huang, and K.H. Weisgraber, *Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1226-9.

3.1. Capture des lipoprotéines

Les lipoprotéines plasmatiques livrent leur cargaison de cholestérol aux différentes cellules de l'organisme ou sont récupérées par le foie afin d'être catabolisées. Comme la composition lipidique et protéique de chaque lipoprotéine diffère, celles-ci sont captées et internalisées selon différents mécanismes, impliquant l'interaction avec des récepteurs membranaires. Étant donné le rôle des macrophages comme cellules phagocytaires impliquées dans l'internalisation et le recyclage de molécules, ces cellules expriment entre autres les récepteurs responsables de la captation des lipoprotéines, dont le rLDL, le SR-A, le SR-BI et le CD36 présentés ci-dessous. Puisque plusieurs de ces récepteurs sont impliqués dans la capture de lipoprotéines modifiées pouvant contribuer à la plaque, il est important de bien comprendre la fonction et la régulation de ces récepteurs afin d'établir leur rôle dans l'accumulation cellulaire menant à la formation de cellules spumeuses.

3.1.1 Récepteur des LDL

Ligands, structure et distribution

Comme son nom l'indique, le rLDL a été caractérisé pour son rôle dans la capture et l'internalisation des LDL. Le rLDL est une glycoprotéine membranaire de 839 acides aminés pouvant lier les lipoprotéines porteuses d'apolipoprotéine B-100 ou d'apolipoprotéine E, comme les VLDL et les LDL [8]. L'internalisation des lipoprotéines de faible densité se produit lorsqu'il y a interaction entre ces lipoprotéines et le domaine de liaison des lipoprotéines du rLDL. Ce domaine du récepteur comprend 292 acides aminés en position amino-terminale, étant composé d'une séquence de 40 acides aminés riche en cystéine, répétée sept fois [8]. Afin de pouvoir internaliser les lipoprotéines, le rLDL est localisé dans des puits tapissés de clathrine qui sont présents à la membrane des cellules. La liaison des lipoprotéines avec le récepteur entraîne l'invagination des puits et la formation d'endosome précoce. La fusion de plusieurs de ces vésicules produit des endosomes de triage, où les LDL vont se dissocier du récepteur suite à l'acidification de ces vésicules. Les récepteurs peuvent ensuite être recyclés vers la surface afin de continuer l'internalisation des LDL [9]. Le récepteur des

LDL est exprimé de façon ubiquitaire par les différents tissus, mais majoritairement exprimé au niveau du foie et des glandes surrénales [8].

Régulation du rLDL

Le rLDL est régulé entre autres par le contenu cellulaire de cholestérol. Suivant l'internalisation du récepteur, les LDL sont internalisées et dégradées dans les lysosomes, libérant ainsi du cholestérol qui agit comme signal intracellulaire. D'abord, le cholestérol des LDL peut se lier au *Sterol Regulatory Element Binding Proteins* (SREBP), et maintenir cette protéine attachée à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Lors d'une carence en cholestérol, SREBP est détaché de la membrane du RE et dirigé dans des vésicules de transport vers l'appareil de Golgi. Dans les vésicules, SREBP est clivé par des protéases, libérant la forme mature qui est transportée vers le noyau, où le SREBP se lie aux *sterol response elements* (SRE), situés dans les régions promotrices de plusieurs gènes, notamment le gène du LDLR, codant pour le rLDL, et celui de l'HMG-CoA réductase, encodant pour l'enzyme principale de la synthèse cellulaire du cholestérol [89]. La diminution de cholestérol cellulaire régule donc l'expression de ces gènes à la hausse par les SREBP afin de pallier cette baisse par une augmentation de captation des LDL et la synthèse de cholestérol *de novo*. En plus d'être régulé par SREBP, le rLDL peut être dégradé par son interaction avec une protéine sécrétée appelée proprotéine convertase subtilisin / kexine de type 9 (PCSK9). L'endocytose du rLDL lié à PCSK9 entraîne sa dégradation plutôt que son recyclage [11]. L'expression de PCSK9 est aussi régulée à la hausse par les SREBP, limitant ainsi l'augmentation d'expression du rLDL en l'absence de cholestérol [90].

3.1.2. Récepteurs *scavengers* des macrophages

Les macrophages expriment des protéines membranaires de la famille des récepteurs *scavenger*, dont plusieurs sont reconnues pour leur implication dans l'internalisation des lipoprotéines. Ces récepteurs ont aussi un rôle important dans l'immunité via la reconnaissance de pathogènes, la capture et la dégradation de débris, en plus d'être impliqués dans l'adhésion cellulaire et la présentation d'antigènes [91]. Cette diversité de ligands et de fonctions provient du rôle des récepteurs *scavengers* comme récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires ou *Pattern Recognition Receptors* (PRR) [92], capables de reconnaître les

PAMP et les DAMP [91]. Les phospholipides et le cholestérol oxydés, présents à la surface des lipoprotéines modifiées, sont reconnus comme des DAMP par les récepteurs *scavengers* [93]. Comme les LDL oxydées sont cytotoxiques sur les autres cellules de la paroi vasculaire [94], leur capture par les SR des macrophages pourrait réduire les effets néfastes sur les cellules environnantes. Les récepteurs *scavengers* sont divisés en classes en fonction de leur structure, similaire entre les membres de la même classe, mais sinon très hétérogène. Les récepteurs *scavenger* de classe A possèdent un domaine de collagène, mais peuvent aussi avoir un domaine SRCR (*Scavenger Receptor Cystein Rich*) riche en cystéine. Les récepteurs *scavenger* de classe B possèdent un domaine nommé CD36, propre à cette famille. Plusieurs autres motifs sont caractéristiques des classes C à F et ont été répertoriés par Canton et ses collègues [91].

3.1.2.1. Récepteurs *scavenger* de classe A (SR-A)

Ligands, structure et distribution

Un des premiers récepteurs éboueurs à être caractérisé a d'abord été appelé *macrophage scavenger receptor* (MSR), puis renommé récepteur *scavenger* de classe A (SR-A). Ce récepteur avait d'abord été identifié par Goldstein et ses collègues comme un site de liaison à la surface des macrophages, capable de capter et dégrader les LDL modifiées par acétylation [95]. Le récepteur fut cloné et caractérisé chez le bœuf par l'équipe du professeur Krieger [96], et ensuite chez l'humain [97]. Structurellement, le SR-A est une glycoprotéine trimérique formé de 6 domaines, dont un domaine dit « *collagen-like* » qui fut montré comme le site d'interaction avec des ligands chargés négativement (anioniques), comme les lipoprotéines oxydées et acétylées, l'albumine sérique glyquée ou méthylée, des polysaccharides (tels le LPS), et certains phospholipides [98]. Cependant, ce récepteur est mieux connu et caractérisé pour son implication dans la capture des lipoprotéines modifiées, comme les LDL oxydées et acétylées [99]. Il existe deux variants du SR-A, provenant d'un épissage alternatif du même gène. Les deux formes, nommées SR-AI et SR-AII, diffèrent légèrement au niveau de leur structure, SR-AI possédant un domaine riche en cystéine en position carboxy terminale [100]. Par contre, la différence structurelle entre les deux types de SR-A ne modifie pas l'interaction avec leurs ligands [100]. Le SR-A est exprimé dans plusieurs tissus et cellules d'origine

leucocytaires, principalement dans les macrophages, ainsi que dans les cellules endothéliales du foie et des vaisseaux lymphatiques. Il est possible que le récepteur SR-A soit aussi exprimé par les cellules musculaires lisses au niveau de la plaque, mais les études d'expression sont contradictoires [100].

Régulation

L'expression du SR-A est régulée par plusieurs facteurs et cytokines, dont le M-CSF, qui augmente la transcription du récepteur possiblement par l'activation d'une voie de signalisation impliquant la protéine kinase C et le facteur de transcription AP-1 [100]. La régulation à la hausse de l'expression du SR-A par le M-CSF, une cytokine connue pour induire la différenciation des monocytes en macrophages, concorde avec l'expression du SR-A prédominante dans les macrophages. De plus, une étude de Gough et ses collègues [101] démontre que l'expression du SR-A des monocytes isolés de patients humains est fortement augmentée suite à la différenciation en macrophages, indiquant que l'expression de ce récepteur est induite dans les macrophages. Dans cette optique, il a été démontré que différents esters de phorbol régulent aussi à la hausse l'expression du SR-A. Des composés de cette famille, dont le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA), sont utilisés pour la différenciation en macrophage de monocytes issus de lignées cellulaires. Des études sur les macrophages différenciés à partir des monocytes THP-1 ou des macrophages provenant de monocytes humains isolés ont montré que des signaux associés à la polarisation des macrophages ont un impact sur l'expression du SR-A. En effet, il a été démontré que l'IFN γ et le TNF- α régulent l'expression du SR-A à la baisse [102, 103], ce qui suggère que ce récepteur serait diminué dans les macrophages M1. Par ailleurs, le PGDF et le TGF- β , des facteurs associés à la réparation tissulaire et à la résorption de l'inflammation, modulent aussi l'expression du SR-A de façon différentielle, le PGDF augmentant son expression mais le TGF- β l'inhibant [100]. Draude et Lorenz [104] proposent que baisse d'expression du SR-A des macrophages par le TGF- β diminuerait la formation de cellules spumeuses, en plus de stabiliser la plaque par le recrutement de SMC et la production de matrice extracellulaire. Une étude de Ricote et collègues [105] sur l'activation des macrophages montre que l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ réduit l'expression de plusieurs gènes liés à l'inflammation, mais réduit aussi l'expression du SR-A. Puisque les stimuli pro- et anti-inflammatoires comme l'IFN γ et le

TGF- β peuvent contribuer à la polarisation des macrophages vers des sous-types avec des rôles distincts, il est donc difficile de prévoir l'expression du récepteur SR-A dans les phénotypes M1 et M2.

Capture des lipoprotéines

Goldstein et ses collègues avaient observé que les AcLDL étaient captées et dégradées beaucoup plus rapidement que les LDL natives par des macrophages de souris, et ce via la liaison avec un site autre que le rLDL à la surface cellulaire [95]. De plus, l'internalisation de ces lipoprotéines modifiées par interaction avec ce site de liaison induisait l'accumulation d'ester de cholestérol dans les macrophages, indiquant un rôle possible de cette voie de capture dans la formation de cellules spumeuses. Suite à l'identification de ce site de liaison comme étant le SR-A, d'autres études ont montré l'implication de ce récepteur dans la capture de LDL acétylées et l'accumulation excessive de cholestérol par la surexpression du SR-A dans des cellules CHO et des macrophages de souris transgéniques [106, 107]. Par ailleurs, l'étude de Freeman [106] sur la surexpression du SR-A a aussi montré que ce récepteur pouvait aussi capter et internaliser les LDL oxydées, ce qui fût appuyé par Kunjathoor et ses collègues en 2002 [99]. En revanche, certains résultats des études de Freeman et Kunjathoor semblent montrer que le SR-A serait plus impliqué dans la dégradation des AcLDL que les celles des OxLDL. En effet, Freeman et ses collègues ont montré que la dégradation des OxLDL est plus basse que celle des AcLDL dans des cellules CHO transfectées avec le SR-A bovin de type I et II [106]. D'autre part, des macrophages péritonéaux isolés de souris SR-A *knock-out* (KO) présentent une réduction plus importante de la capture et de la dégradation des AcLDL que des OxLDL [99].

3.1.2.2. CD36

Structure, distribution et ligands

Le *Cluster of Differentiation* (CD36), est une glycoprotéine membranaire appartenant à la classe B des récepteurs scavenger comme le SRBI, encodée par le gène *CD36*. CD36 est une protéine de 53 kDa formée de 473 acides aminés avec deux domaines transmembranaires, deux courts domaines cytoplasmiques et une large boucle extracellulaire fortement N-

glycosylée, augmentant sa masse à 88 kDa [108]. CD36 est exprimé par une multitude de types cellulaires, soit les plaquettes, les cellules endothéliales, les cellules dendritiques, les entérocytes, les cellules musculaires lisses, les cellules hématopoïétiques, les monocytes, les macrophages et beaucoup d'autres [109]. Plusieurs ligands de CD36 ont été identifiés à ce jour : la thrombospondine-1, le collagène, les LDL oxydées, des cellules apoptotiques, des protéines glyquées et plusieurs autres particules provenant de pathogènes [110]. Cette multiplicité de ligands confirme le rôle de CD36 comme récepteur impliqué dans la reconnaissance des PAMP, l'élimination de déchets cellulaires et l'activation de la réponse immunitaire. Même s'il peut lier plusieurs classes de lipoprotéines [111], le CD36 est plutôt connu comme un des principaux récepteurs pouvant lier les LDL modifiées [112, 113].

Régulation

L'expression du récepteur *scavenger* CD36 est régulée à la hausse par la différenciation des monocytes en macrophages. En effet, il a été démontré par Huh et ses collègues [114] que des macrophages en culture différenciés de monocytes circulants, expriment davantage de CD36. De plus, le traitement de monocytes alvéolaires humains avec le M-CSF augmente aussi l'expression d'ARNm et protéique de CD36. Le PMA induit aussi une hausse d'expression de CD36, ce qui est cohérent avec la différenciation en macrophage observée avec le M-CSF [115]. L'expression à la hausse de ce récepteur par la différenciation en macrophages permet au macrophage d'assumer plusieurs de ses fonctions de phagocyte, étant donné son rôle dans la capture, la récupération et la détection de débris, pathogènes et autres particules extracellulaires.

La polarisation des macrophages en phénotypes distincts a également un impact sur l'expression de CD36. Huh et ses collègues [114] ont montré que le LPS inhibait l'expression du CD36 dans les macrophages alvéolaires humains. De plus, un second groupe a aussi présenté que l'IFN γ diminuait l'expression de l'ARNm et de la protéine CD36 dans les macrophages dérivés de monocytes circulants humains. À l'opposé du spectre inflammatoire, il a été montré que l'expression du CD36 de macrophages murins RAW264.7 augmente suite à l'exposition à l'interleukine-4 [116]. Cette hausse étant induite par l'activation d'une voie qui augmente l'expression de PPAR γ , qui est bien connu pour réguler le CD36 [117]. La baisse

d'expression du CD36 par le LPS et l'IFN γ et la hausse par l'IL-4 suggèrent que les macrophages M1 inflammatoires exprimeraient moins de CD36 que les macrophages M2 anti-inflammatoires.

Capture des lipoprotéines

Le CD36 est un récepteur éboueur avec un spectre de ligands très vaste qui renferme plusieurs classes de lipoprotéines. Une étude *in vitro* a montré que l'expression forcée de CD36 dans des cellules C32 (mélanomes humains), COS7 (cellules de rein de singe) et Sf9 (cellules d'insecte) augmentait fortement la liaison des VLDL, des LDL et des HDL aux cellules, indiquant que le CD36 peut lier ces lipoprotéines [111]. Par contre, le récepteur CD36 est principalement connu pour son implication dans la capture et l'internalisation de lipoprotéines modifiées. En 1993, Endemann et ses collègues ont montré que la transfection de CD36 dans des cellules HEK293 augmentait la capture et la dégradation des OxLDL [112]. Les résultats de Kunjathoor et collègues [99] ont montré que des macrophages péritonéaux provenant de souris KO pour CD36 présentaient une réduction de la capacité d'association et de dégradation pour les AcLDL, mais surtout pour les OxLDL, par rapport aux macrophages provenant de souris contrôles. Ces résultats indiquent donc que le récepteur CD36 est fortement impliqué dans la capture des LDL modifiées et plus particulièrement dans celle des OxLDL.

3.1.2.3. Récepteur *scavenger* de classe B type I (SR-BI)

Ligands, structure et distribution

Le récepteur *scavenger* de classe B type I (SR-BI) fût d'abord caractérisé comme un récepteur de lipoprotéines modifiées, suite aux découvertes du SR-AI/AII et de CD36 dans la captation et l'internalisation de LDL oxydées et acétylées [118]. Des recherches subséquentes ont permis d'identifier le rôle central du SR-BI dans la captation sélective du cholestérol estérifié des HDL [87], même s'il peut aussi lier les LDL natives et modifiées [118, 119]. Le SR-BI est une glycoprotéine de 509 acides aminés, caractérisé par une boucle extracellulaire de 403 résidus, ancrés par deux domaines transmembranaires et de courtes extensions cytoplasmiques en N- et en C- terminal [120]. La protéine est fortement N-glycosylée sur plusieurs sites, avec un poids moléculaire de 57 kilodaltons (kDa) pour la forme native et environ 82 kDa pour la

forme glycosylée [121]. La protéine SR-BI est encodée par le gène *SCARB1*, qui code aussi pour un variant nommé SR-BII qui résulte d'un épissage alternatif [122]. Structurellement, SR-BII est similaire à SR-BI, sauf pour les 44 acides aminés du domaine cytoplasmique C-terminal. De par son rôle dans le métabolisme du cholestérol et la captation de lipoprotéines, le SR-BI est exprimé principalement au niveau du foie, mais aussi dans les glandes surrénales et les ovaires, ainsi que plusieurs types cellulaires dont les macrophages et les cellules endothéliales [123]. L'expression du récepteur SR-BII est analogue au SR-BI, mais il est exprimé de façon beaucoup moins importante que ce dernier [123].

Régulation

L'expression du SR-BI est régulée par plusieurs facteurs de transcription, notamment par les récepteurs nucléaires PPAR α et PPAR γ , les LXR α et LXR β , mais aussi les SREBP-1a et SREBP-2 [123]. Ces facteurs de transcription sont responsables de la régulation de gènes participant au transport et au métabolisme des lipides et du cholestérol. Puisque le SR-BI est un récepteur impliqué dans la capture des lipoprotéines, il est donc plausible que le cholestérol et les acides gras libérés lors de la dégradation des lipoprotéines régulent son expression. Ji et ses collègues [124] ont observé que le chargement en cholestérol suivant l'incubation de macrophages de souris avec des AcLDL diminuait l'expression du SR-BI, tandis que l'expression du récepteur était augmentée suite à la privation de cholestérol par incubation avec du sérum déficient en lipoprotéines. Ce résultat démontre l'implication de l'état lipidique de la cellule dans la régulation du SR-BI. Une étude de Yu [125] a aussi montré que le chargement en cholestérol de macrophages de souris J774 par incubation avec des AcLDL ou du 25-hydroxycholestérol (25-OH) réduisait l'expression protéique et de l'ARNm du SR-BI. Ces derniers ont conclu que la baisse d'expression de SR-BI par le chargement en cholestérol était indépendante du LXR, et serait possiblement aussi indépendante de SREBP. Cependant, d'autres études ont démontré un rôle du LXR dans la régulation de SR-BI. À cet effet, Malerød et ses collègues [126] ont montré que le LXR α pouvait lier le promoteur et induire l'expression de SR-BI humain transfecté dans des préadipocytes (3T3-L1) et des hépatomes murins (Hepa 1c1c-7). De plus, Ma et collègues [127] ont montré que le traitement de macrophages différenciés à partir de monocytes sanguins humains avec un agoniste LXR (T0901317) induisait une hausse d'expression d'ARNm et protéique de SR-BI. Les études de Malerød et de

Ma semblent ainsi confirmer un rôle de la voie LXR dans la régulation du SR-BI. En plus du LXR, il a été démontré que les récepteurs nucléaires PPAR sont aussi en mesure de réguler l'expression du SR-BI. En effet, Chinetti et ses collègues [128] ont montré que l'activation des récepteurs nucléaires PPAR α et PPAR γ à l'aide d'agonistes de ces récepteurs augmentait l'expression de SR-BI dans des macrophages différenciés de monocytes humains. Par ailleurs, la hausse d'expression des récepteurs nucléaires PPAR a été observée lors de la polarisation de macrophages en sous-type M2 [129], suggérant que la polarisation en phénotype anti-inflammatoire pourrait réguler à la hausse le récepteur SR-BI.

Plusieurs autres études suggèrent que l'expression du SR-BI pourrait différer selon les sous-types de macrophages. En effet, il a été montré que le TGF- β , une cytokine anti-inflammatoire, régulate à la hausse l'expression du SR-BI par une voie de régulation dépendante de LXR α dans des macrophages spumeux de lignée THP-1 [130]. À l'opposé, Park et ses collègues [131] ont présenté que le LPS réduisait l'expression protéique de SR-BI dans des macrophages murins de lignée RAW 264.7. De plus, selon la même étude, le TNF- α réduisait aussi l'expression d'ARNm de SR-BI, LXR α et PPAR γ dans des macrophages péritonéaux issus de souris de lignée C57BL/6J, tandis que le LPS réduisait l'expression d'ARNm et protéique du SR-BI, LXR α et PPAR γ . Ensemble, ces résultats démontrent que les stimuli inflammatoires diminueraient l'expression du SR-BI, tandis que des stimuli anti-inflammatoires augmenteraient son expression, indiquant que les macrophages M2 exprimeraient plus de ce récepteur que les M1.

Capture des lipoprotéines natives

Le SR-BI participe à la capture du cholestérol estérifié des LDL et des HDL par un mécanisme appelé captation sélective, qui se produit lors de l'interaction des lipoprotéines avec le SR-BI induisant l'échange de lipides entre ces dernières et la cellule sans entraîner la dégradation de ces dernières [87]. En effet, il a été démontré par l'utilisation de cellules surexprimant le SR-BI que ce dernier était effectivement responsable de la captation sélective des esters de cholestérol (CE) présents au niveau des HDL [87]. Il a aussi été démontré que la mutation de deux sites de glycosylation (asparagine en position 108 et 173) sur le SR-BI entraîne une diminution de l'activité de captation sélective des HDL sans nuire à leur liaison [132]. Pour ce

qui est des LDL, Rhains et ses collègues [133] ont montré l'implication du SR-BI dans la captation sélective faite à partir de ces dernières. En effet, ils ont démontré que les hépatocytes des souris hétérozygotes pour le SR-BI présentaient une diminution d'environ 50% de la captation sélective d'esters de cholestérol des LDL, tandis que les hépatocytes des souris ayant deux allèles déficients (homozygotes) avaient une captation sélective réduite de 85% par rapport aux cellules des souris contrôles. Ensemble, ces résultats confirment donc que le SR-BI est impliqué dans la captation sélective du cholestérol contenu dans les HDL et les LDL.

Plusieurs études *in vivo* ont démontré l'importance du SR-BI dans la captation sélective des esters de cholestérol des HDL. Le modèle de souris déficient en SR-BI généré par Rigotti et ses collègues [134] montre une hausse plasmatique importante des taux de cholestérol associé aux HDL en absence de SR-BI. Varban et ses collègues [135] ont aussi observé des effets similaires dans un modèle de souris avec une mutation du promoteur du SR-BI diminuant son expression. De plus, suite à l'injection de HDL doublement radio-marquées, ils ont démontré que seulement la clairance de la partie lipidique des HDL était réduite dans les souris avec le SR-BI muté. Ainsi, en absence du SR-BI, les HDL n'étaient plus soumises au processus de captation sélective.

À l'opposé, des expériences de clairance plasmatique faite chez les souris surexprimant le SR-BI ont montré que ces souris avaient une plus forte captation sélective du cholestérol des HDL. Ces résultats concordent avec une diminution des taux de HDL-C plasmatique et une hausse du cholestérol excrété dans la bile [136]. Ensemble, ces résultats confirment le rôle du récepteur SR-BI dans la capture et le catabolisme du cholestérol associé aux HDL. De plus, l'étude *in vivo* sur la clairance des LDL par Brodeur et ses collègues [137], a montré par des expériences de clairance plasmatique des LDL radioactives que la captation sélective du cholestérol faite à partir des LDL était réduite dans les souris déficientes en SR-BI par rapport aux souris contrôles.

Deux hypothèses ont été émises pour expliquer le mécanisme d'échange des lipides entre la cellule et les lipoprotéines suite à la liaison avec le SR-BI. Certains ont d'abord décrit la possibilité d'un pore hydrophobe au centre de la protéine SR-BI, favorisant le déplacement des espèces lipidiques et du cholestérol. La caractérisation par cristallographie de la structure du récepteur LIMP-2, un récepteur de la même famille que le SR-BI et le CD36, a permis de

découvrir l'existence d'une série de cavités au centre de la protéine, formant un tunnel hydrophobe qui peut ensuite faciliter le transport de lipides entre les HDL et la cellule lorsque la structure du SR-BI est modélisée sur celle de LIMP-2 [138]. Par ailleurs, le récepteur SR-BI peut être internalisé avec les HDL et ensuite recyclé vers la membrane par un processus appelé rétroendocytose [139]. Sun et ses collègues ont étudié ce mécanisme à partir des fibroblastes de lignée COS7 et des hépatocytes de lignée HepG2 infectées pour exprimer le SR-BI murin. Suite à l'incubation avec des HDL radioactives et biotinylées, ceux-ci observèrent qu'environ 44% des HDL marquées et internalisées par la cellule avaient été retournées dans le milieu de culture, confirmant un mécanisme de recyclage des HDL par les cellules via le SR-BI.

SR-BII semble aussi être impliqué dans la captation sélective des HDL, mais de façon moins efficace que SR-BI [122]. Il est possible que le SR-BII participe aussi à l'endocytose de lipoprotéines, puisque Sun et ses collègues [139] ont montré que ce récepteur était rapidement internalisé et favorisait l'accumulation intracellulaire et le transport des HDL vers des organelles de recyclage.

Capture des lipoprotéines modifiées

Puisque le SR-BI peut lier les lipoprotéines modifiées en plus des HDL et LDL natives, différents groupes ont voulu étudier l'implication relative de ce récepteur dans la capture et l'internalisation des lipoprotéines modifiées. À partir de cellules CHO transfectées avec le gène SR-BI murin, il a été montré que ce récepteur lie et permet la dégradation des LDL oxydées [140]. De façon analogue, Sun et ses collègues ont présenté des résultats montrant que les cellules de lignée COS-7 exprimant le récepteur SR-BI murin pouvaient internaliser et dégrader des LDL oxydées [141]. À partir d'un modèle de souris SR-BI KO, Bourret et ses collègues [142] ont montré que les souris KO ont une captation sélective hépatique des OxLDL réduite par rapport aux souris contrôles, ce qui indique que le SR-BI serait impliqué dans la captation sélective des LDL modifiées. Par contre, les auteurs de l'étude ont montré que des LDL et des OxLDL radioactives injectées dans des souris n'étaient pas accumulées dans les mêmes cellules hépatiques. En effet, les LDL natives s'étaient accumulées principalement dans les cellules parenchymateuses du foie, tandis que les OxLDL s'étaient plutôt accumulées dans les tissus non-parenchymateux, composés de cellules endothéliales, de

cellules épithéliales, de cellules stellaires et de cellules immunitaires (cellules de Kupffer). Ces résultats indiqueraient alors que les cellules non parenchymateuses du foie seraient responsables de la captation sélective des OxLDL par le SR-BI, tandis que les cellules parenchymateuses (les hépatocytes) seraient impliquées dans la capture des LDL.

3.1.2.4 Autres récepteurs des macrophages impliqués dans la capture de lipoprotéines

D'autres protéines membranaires pouvant lier les lipoprotéines ont été identifiées, dont le *Lectin-type oxidized LDL receptor-1* (LOX-1) et le *Macrophage Receptor with Collagenous Structure* (MARCO), un autre récepteur *scavenger* de la classe A. Les deux récepteurs sont connus pour lier des lipoprotéines modifiées et différents motifs de pathogènes, mais leur rôle dans l'internalisation des lipoprotéines semble mineur et reste à élucider [143].

3.1.3 Macropinocytose et phagocytose des LDL

Les lipoprotéines de faible densité peuvent être internalisées par d'autres voies, de façon indépendante de l'endocytose des récepteurs membranaires. Kruth et ses collègues [144] ont montré que l'internalisation de LDL natives entraîne l'accumulation de cholestérol intracellulaire dans les macrophage humains, par un processus indépendant du rLDL. Selon les résultats présentés par les auteurs de cette étude, l'accumulation de cholestérol suite à l'incubation des cellules avec les LDL proviendrait de la macropinocytose de ces lipoprotéines, un processus d'endocytose de fluides extracellulaires et des particules présentes dans ce milieu, dont les lipoprotéines [145]. En plus de la macropinocytose, la phagocytose constitue un second mécanisme d'endocytose par lequel la cellule peut internaliser des particules extracellulaires solides du milieu extracellulaire. La phagocytose implique la formation de pseudopodes, des projections de la cellule pouvant entourer une particule extracellulaire et l'englober. Une étude d'Asmis [146] a démontré que l'internalisation par des macrophages humains de lipoprotéines oxydées agrégées est fortement réduite par un traitement avec la cytochalasin B, la cytochalasin D et la latrunculin A. Ces composés inhibent la polymérisation de l'actine, un processus nécessaire à la phagocytose, confirmant un rôle de ce mécanisme dans la capture de lipoprotéines modifiées. Plusieurs récepteurs et protéines membranaires liant des lipoprotéines ont été rapportés pour contribuer à l'activation de la phagocytose et à l'internalisation de lipoprotéines par cette voie, tels que le SR-A, le CD36,

LOX-1, le *low density lipoprotein receptor-related protein-1* (LRP1) et plusieurs autres [147]. À cet effet, Sakr et ses collègues [148] ont montré que l'internalisation et la dégradation de LDL agrégées présentes à la surface de macrophages se produisait suite à l'interaction de ces lipoprotéines avec le récepteur LRP. De plus, les auteurs ont démontré que ce processus d'internalisation des AgLDL était dépendant du remodelage du cytosquelette, indiquant un processus similaire à la phagocytose.

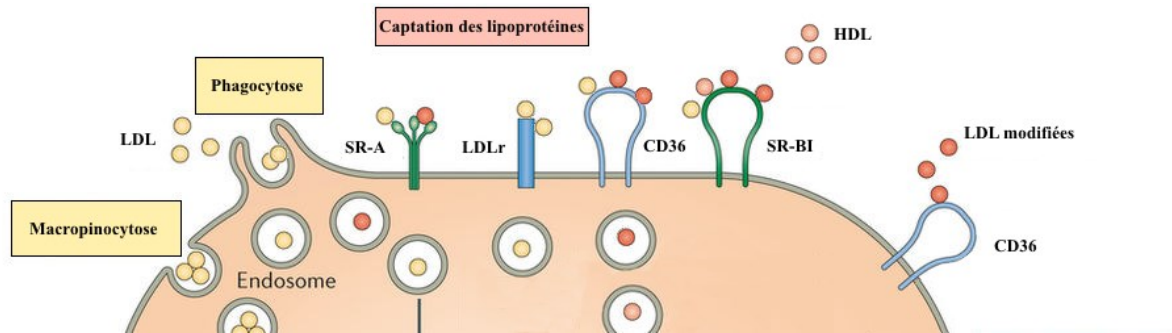


Figure 6. Principales voies de liaison et d'internalisation des lipoprotéines par les macrophages. Adapté de Moore et collègues [149].

Présentation des récepteurs de lipoprotéines exprimés à la surfaces de macrophages et leur différents ligands, ainsi que les voies d'endocytose des lipoprotéines dépendantes d'interactions avec d'autres récepteurs ou non-médiés par des récepteurs. Permission de citation ©Moore, K.J., F.J. Sheedy, and E.A. Fisher, *Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(10): p. 709-21.

3.2. Efflux de cholestérol

Tel que mentionné précédemment, l'efflux de cholestérol constitue la première étape du TIC et permet de contrer l'accumulation excessive de cholestérol causée par les voies d'entrées mentionnées précédemment. Deux principales voies sont connues pour mobiliser la sortie du cholestérol hors des cellules. Premièrement, le cholestérol libre peut simplement diffuser de façon passive vers différents accepteurs présents dans le milieu extracellulaire, un mécanisme appelé diffusion aqueuse puisqu'il emprunte brièvement le milieu extracellulaire [150]. En second lieu, le cholestérol peut être évacué des cellules par des mécanismes impliquant des

protéines membranaires qui facilitent l'efflux, dont certains transporteurs possédant une *ATP-Binding Cassette* (ABC) et le SR-BI. Cette voie active est majoritairement responsable du transport du cholestérol hors des cellules. L'interaction des différentes sous-classes de HDL avec les protéines membranaires ABCA1, ABCG1 et le SR-BI entraîne la sortie de cholestérol et de phospholipides de la cellule vers les accepteurs.

3.2.1 *ATP-Binding Cassette Sub-family A, member 1 (ABCA1)*

Structure, distribution cellulaire, ligands

L'ABCA1 est un membre de la famille des transporteurs ABC, une superfamille de protéines qui utilisent de l'ATP afin de transférer des molécules de part et d'autre de la membrane [151]. Le gène ABCA1 encode pour une protéine de 2261 acides aminés totalisant 220 kDa, constituée de deux *nucleotides binding domains* (NBD) et deux domaines transmembranaires possédant chacun six hélices traversant la membrane [152]. Les domaines NBD sont impliqués dans la dégradation de l'ATP afin de fournir l'énergie nécessaire pour la fonction de transport. ABCA1 est exprimée dans une multitude de tissus, dont le foie, les poumons, les glandes surrénales, le placenta et les macrophages [153]. Certaines protéines plasmatiques peuvent s'associer avec ABCA1, principalement des lipoprotéines porteuses d'apolipoprotéines possédant des domaines avec des hélices amphipathiques pouvant accommoder des lipides, majoritairement l'apo A-I, mais aussi plusieurs autres apolipoprotéines dont l'apo A-II, l'apo A-IV, l'apo C-I, l'apo C-II, l'apo C-III et l'apo E [154].

Régulation de l'expression

L'expression d'ABCA1 est régulée par les niveaux de cholestérol cellulaire. Langmann et ses collègues [153] avaient remarqué que l'incubation de macrophages avec des AcLDL augmentait l'expression de l'ARN messager d'ABCA1. L'augmentation des taux de cholestérol cellulaire, par synthèse *de novo* ou par apport externe, permet la génération d'oxystérols, des ligands reconnus du récepteur nucléaire appelé *liver X receptor* (LXR) [155]. La liaison des oxystérols au LXR entraîne sa dimérisation avec le *retinoic X receptor* (RXR) et l'hétérodimère peut ensuite induire la transcription d'ABCA1 via des *LXR-response element*

(LXRE) dans la région promotrice du gène [156]. De façon analogue au LXR, le PPAR, peut se dimériser avec le RXR et induire la transcription de gènes via leur liaison à des éléments de réponse aux PPAR (PPRE) [157]. Il a été montré que PPAR pouvait induire l'expression d'ABCA1 par une hausse de la transcription des récepteurs nucléaires des oxystérols (LXR), via un PPRE présent dans le gène du LXR [158].

En plus d'être régulée au niveau de l'expression de l'ARNm, la protéine ABCA1 est aussi régulée par des mécanismes post-transcriptionnels. Wang et ses collègues [159] ont découvert une séquence PEST dans la structure d'ABCA1. Ces séquences riches en prolines, acides glutamiques, sérines et thréonines sont connues pour être impliquées dans la dégradation des protéines via la liaison de protéases à ces sites [160]. L'étude de Wang démontre que la séquence PEST d'ABCA1 favorise sa dégradation, via la liaison des calpaïnes, des enzymes protéolytiques cytosoliques. La liaison d'ABCA1 avec l'apo A-I ou l'apo E empêche la liaison des calpaïnes sur la séquence PEST, stabilisant ainsi la protéine et prévenant sa dégradation. Rayner et ses collègues [161] ont démontré un second mécanisme de régulation post-transcriptionnel d'ABCA1 par l'interaction de l'ARNm du récepteur avec un microARN (miARN). Les miARN sont des séquences nucléotidiques non-codantes produites lors de la transcription de certains gènes. Une fois transcrits, ces miARN peuvent se lier à des sites complémentaires présents sur certains ARN messagers, induisant leur dégradation ou encore bloquant leur traduction en protéines par les ribosomes [162]. Une séquence codant pour le micro ARN miR-33 est présente dans un intron du gène de SREBP-2 et transcrite en même temps que ce dernier [161]. Tel que décrit, l'expression du facteur de transcription SREBP-2 est dépendante des taux de cholestérol cellulaire; une baisse de cholestérol entraîne une hausse d'expression de SREBP-2 et l'expression concomitante de miR-33, qui réprime ainsi l'expression d'ABCA1 [161]. Dans cette optique, la co-transcription de miR-33 et de SREBP-2 par la cellule serait une double régulation afin de rétablir le taux de cholestérol cellulaire, SREBP-2 augmentant l'expression de gènes pour la capture et la production de cholestérol, et miR-33 prévenant l'efflux du cholestérol.

Efflux de cholestérol

Des expériences *in vitro* à partir de macrophages péritonéaux de souris montrèrent que l'incubation de ces cellules avec certaines apolipoprotéines, principalement l'apo A-I, entraînait la sortie de cholestérol des macrophages ainsi qu'une diminution du contenu de cholestérol des cellules [163]. L'analyse de fibroblastes d'individus atteints de la maladie de Tangier, une maladie génétique caractérisée par une déficience en ABCA1, démontre que ces cellules ne forment pas de HDL et n'induisent pas l'export du cholestérol et des phospholipides hors des cellules suite à une incubation avec l'apo A-I. Ces résultats ont été attribués à une capacité fortement réduite de liaison de l'apo A-I sur l'ABCA1, limitant la maturation et le chargement en cholestérol et phospholipides des HDL qui sont alors éliminées plus rapidement de la circulation sanguine [164]. Ensemble, ces résultats indiquaient une implication de l'ABCA1 dans le processus d'efflux de cholestérol induit par l'apo A-I. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont par la suite confirmé le rôle de l'apo A-I, la principale protéine constituante des HDL, dans l'efflux de cholestérol cellulaire dépendant d'ABCA1 [150]. La taille des HDL est un facteur déterminant pour la liaison avec l'ABCA1 et l'induction de l'efflux de cholestérol cellulaire. Les particules pré- β_1 -HDL, nommées en fonction de leur patron de migration d'électrophorèse sur gel en deux dimensions, constituent les plus petites particules HDL faiblement lipidées contenant de l'apo A-I [165]. Ces petites lipoprotéines, ainsi que les HDL de petite taille (HDL_{3b} et HDL_{3c}) constituent les ligands préférentiels de l'ABCA1, leur interaction avec ce récepteur induisant l'efflux de cholestérol [165, 166].

Le rôle d'ABCA1 dans l'efflux de cholestérol est bien établi, mais les mécanismes derrière ce processus d'efflux restent à clarifier. Une des hypothèses suggère que la liaison de l'apo A-I avec ABCA1 induit la translocation de phospholipides de la face interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe [167]. Ce déséquilibre de phospholipides entraîne une courbure dans la membrane cellulaire et la formation de protubérances vésiculaires. L'interaction subséquente d'apo A-I avec ces domaines entraîne leur solubilisation et la formation de HDL naissantes, contenant d'une à quatre particules d'apo A-I, des phospholipides et du cholestérol [150]. Une seconde hypothèse postule que l'apo A-I peut se lier à ABCA1, que ce complexe est internalisé dans des endosomes tardifs. L'apo A-I se

charge alors de cholestérol et de phospholipides puis est retournée dans le milieu extracellulaire, un mécanisme appelé rétro-endocytose. [168]. La contribution respective des deux mécanismes d'efflux dépendant d'ABCA1 reste à déterminer.

Il a été montré que d'autres transporteurs de la famille des ABC pouvaient contribuer à l'efflux de cholestérol de concert avec ABCA1. Trigueros-Motos et ses collègues [169] ont montré que des souris ABCA8 KO présentent des taux plasmatiques réduits de HDL-C, et que la surexpression de ce récepteur dans des fibroblastes COS-7 augmentait l'efflux de cholestérol vers l'apo A-I. Les auteurs de cette étude postulent qu'ABCA8 agirait de concert avec ABCA1 pour promouvoir l'efflux, appuyant cette hypothèse sur la colocalisation d'ABCA1 et d'ABCA8 à la membrane et la co-immunoprécipitation des deux protéines, indiquant la formation d'un complexe. D'autre part, des études ont montré qu'ABCA12 pouvait aussi interagir avec ABCA1, de façon analogue à ABCA8, et induire l'efflux de cholestérol des macrophages, prévenant ainsi l'accumulation de cholestérol intracellulaire, réduisant aussi la formation de cellules spumeuses et de la plaque [170, 171].

Importance physiologique d'ABCA1

L'importance du récepteur ABCA1 est attribuable à son rôle dans l'efflux de cholestérol et le TIC, favorisant le retour et le catabolisme hépatique du cholestérol périphérique. McNeish et collègues [172] ont montré que les souris déficientes en ABCA1 présentaient un phénotype caractérisé par une forte baisse d'apo A-I plasmatique, la quasi-absence des HDL, la formation de cellules spumeuses dans les poumons et un risque accru d'athérosclérose. À l'opposé, il a été montré que la surexpression d'ABCA1 humain chez la souris était athéroprotectrice, puisqu'une diminution des lésions athérosclérotiques est notée dans les souris ABCA1 transgéniques comparativement aux souris contrôles. Afin de déterminer si cet effet protecteur était dû à l'ABCA1 d'un tissu particulier, différents groupes ont cherché à évaluer si l'expression hépatique pouvait avoir un rôle dans ces effets cardioprotecteurs. À partir d'un modèle de souris athérosclérotiques apo E KO, Brunham et ses collègues [173] ont montré que l'inactivation de l'expression d'ABCA1 au niveau du foie favorisait le développement de l'athérosclérose. Les résultats de Brunham suggéraient alors que l'expression d'ABCA1 hépatique était critique dans la prévention de l'athérosclérose, et non pas l'ABCA1 des macrophages. Cependant, Bi et ses collègues [174] ont montré que l'inactivation hépatique

d'ABCA1 dans un modèle de souris LDLr KO ne réduisait pas de façon importante le TIC ni le développement d'athérosclérose, indiquant que l'expression hépatique d'ABCA1 n'est pas centrale dans la prévention de l'athérosclérose. Le groupe de Bi a suggéré que les différences observées par rapport aux résultats de Brunham provenait de l'utilisation par ces derniers d'un modèle souris apoE^{-/-}, entre autres parce que l'apo E peut induire l'efflux de cholestérol via ABCA1 [175].

Plusieurs études ont également été menées afin de déterminer l'effet spécifique de l'expression d'ABCA1 au niveau des macrophages. Zhu et ses collègues [176] ont montré que l'absence d'expression d'ABCA1 spécifiquement dans les macrophages de souris réduisait la capacité d'efflux de cholestérol vers l'apo A-I de macrophages isolés de ces souris, en plus d'entraîner l'accumulation de cholestérol libre dans ces cellules par rapport aux macrophages de souris contrôles (ABCA^{+/+}). De plus, une étude de Wang [177] a démontré que l'inactivation d'ABCA1 spécifique aux macrophages de souris réduisait fortement les mécanismes de TIC *in vivo*. Ceux-ci procédèrent d'abord à l'injection des cellules de moelle osseuse provenant de souris ABCA1^{-/-} ou ABCA1^{+/-} préalablement chargées avec des AcLDL ou LDL marquées radioactivement, dans des souris contrôles. Suite à l'injection, ils ont mesuré les niveaux de cholestérol radioactif dans le sérum, le foie, la bile et les fèces. Les niveaux de cholestérol marqué dans la circulation, et captés puis excrétés par le foie (bile, fèces) étaient réduits dans les souris injectées avec les macrophages ABCA1^{-/-} par rapport aux ABCA1^{+/-}, qu'il s'agisse de macrophages marqués avec des LDL ou des AcLDL. Ensemble, ces résultats confirment l'importance de l'expression d'ABCA1 au niveau des macrophages sur l'efflux de cholestérol et le TIC.

3.2.2. ATP-Binding Cassette sub-family G, member 1 (ABCG1)

Structure, distribution cellulaire, ligands

Comme son nom l'indique, ABCG1 est aussi membre de la superfamille des transporteurs ABC. Structuellement, la protéine ABCG1 est un demi-transporteur, composé d'un seul domaine transmembranaire avec 6-hélices alpha traversant la membrane [178]. Les demi-transporteurs ABC sont connus pour former des homo- ou des hétéro-dimères afin de pouvoir assumer leur fonction. Il a été montré que l'activité d'efflux de cholestérol par ABCG1

nécessitait sa dimérisation avec un membre de la même famille ou encore avec ABCG4, un autre demi-transporteur [179]. Nakamura et ses collègues [180] ont montré que le gène d'ABCG1 code pour au moins trois isoformes de la protéine, d'une taille d'environ 67 kD. Les auteurs présentent aussi que la transfection de cellules HEK293 avec les trois isoformes d'ABCG1 murin induit de façon similaire l'efflux de cholestérol vers les HDL, indiquant que les trois isoformes sont fonctionnels pour induire l'efflux. Engel et ses collègues [181] ont démontré qu'un transcrite pour l'un des isoformes d'ABCG1, nommée ABCG1(666), était deux fois plus exprimé dans les macrophages humains et dans le foie comparativement au transcrite pour la protéine complète ABCG1(678). Les auteurs de cette étude postulent donc qu'ABCG1 (666) serait la forme majeure d'ABCG1 exprimée chez l'humain. Le récepteur ABCG1 est exprimé dans plusieurs tissus, mais majoritairement au niveau des poumons, du cerveau, de la rate, et des cellules de lignée monocyttaire [180]. Contrairement à l'ABCA1 et à d'autres protéines de transport du cholestérol, les fonctions d'ABCG1 ne nécessitent pas son association à des lipoprotéines extracellulaires. De plus, le récepteur aurait une faible spécificité pour les différents accepteurs de cholestérol extracellulaires [178].

Régulation de l'expression

L'expression d'ABCG1 est régulée de façon analogue à ABCA1, transcriptionnellement par les récepteurs nucléaires LXR et PPAR, et de façon post-transcriptionnelle par miR-33 [178, 182, 183].

Efflux de cholestérol

Plusieurs études ont démontré qu'ABCG1 favorise l'efflux de cholestérol majoritairement vers les particules HDL matures et non vers l'apoA-I faiblement lipidée [179, 184]. Selon les études initiales de Vaughan [184] et Xie [185], ABCG1 serait localisé à la surface cellulaire. Par contre, d'autres ont montré que la protéine ABCG1 serait majoritairement localisée dans les endosomes, et qu'elle contribuerait au trafic du cholestérol et sa redistribution hors du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique, d'où le cholestérol effluerait vers les HDL et autres accepteurs extracellulaires sans interaction directe de ces derniers avec l'ABCG1 [186, 187]. Il s'agirait donc d'un mécanisme de diffusion facilitée.

Impact physiologique d'ABCG1 sur la formation de la plaque

Le rôle d'ABCG1 dans l'efflux, le transport inverse du cholestérol et la formation de la plaque reste encore à élucider. Plusieurs modèles de souris offrent des réponses contradictoires sur l'impact d'ABCG1 sur le risque athérosclérotique. Deux groupes ont généré des souris KO pour le LDLr (LDLr^{-/-}) auxquelles ont été greffé des cellules de la moelle osseuse de souris KO pour ABCG1 (ABCG1^{-/-}) afin d'étudier l'implication d'ABCG1 des macrophages dans la capacité d'efflux de cholestérol et le développement de l'athérosclérose [188, 189]. Comparé aux souris transplantées avec des macrophages contrôles exprimant ABCG1, les souris injectées avec les macrophages ABCG1^{-/-} présentaient une réduction de la taille des lésions athérosclérotiques. Ces résultats indiqueraient que l'expression d'ABCG1 dans les macrophages favoriserait la formation et la progression de la plaque. Par contre, une autre étude [190] effectuée à partir d'un modèle de souris analogue, montre que les souris transplantées avec la moelle de souris ABCG1^{-/-} présentaient des lésions athérosclérotiques plus importantes que les souris contrôles transplantées avec de la moelle de souris ABCG1^{+/+}. Cette étude montre plutôt que l'expression d'ABCG1 réduirait l'accumulation de cholestérol et préviendrait l'athérosclérose en favorisant l'efflux de cholestérol. Meurs et ses collègues [191] ont présenté des résultats indiquant un rôle athéroprotecteur d'ABCG1 dans les stades précoces de la formation de la plaque, tandis que l'expression de ce récepteur serait délétère dans les stades avancés de la maladie. Ceux-ci ont observé qu'un modèle de souris LDLr^{-/-} exprimant ABCG1 (ABCG1^{+/+}) présentait des lésions athérosclérotiques réduites par rapport aux souris LDLr^{-/-} ABCG1^{-/-} suite à 10 semaines de diète riche en cholestérol. Par contre, suite à 12 semaines de diète, les souris exprimant ABCG1 avaient des lésions athérosclérotiques de plus grande taille que les souris déficientes en ABCG1. Les auteurs de cette étude attribuent ces différences à des fonctions distinctes d'ABCG1 selon le stade de l'athérosclérose. La fonction d'efflux de cholestérol par ce récepteur serait athéroprotectrice dans les premiers stades de l'athérosclérose, tandis que des mécanismes dépendant de l'expression d'ABCG1 seraient délétères à des stades plus avancés. Puisque les temps utilisés pour définir les différents stades d'athérosclérose sont assez rapprochés (10 vs 12 semaines), d'autres études avec des modèles de souris représentant des âges plus distancés permettraient de mieux comprendre ou élucider le rôle d'ABCG1 à différents stades de la pathologie.

Chez l'humain, un variant génétique d'ABCG1 est associé à une diminution d'expression des niveaux d'ARNm du récepteur dans les cellules leucocytaires en plus d'être associé à une augmentation du risque d'infarctus du myocarde, indiquant que l'expression d'ABCG1 serait athéroprotectrice [192].

3.2.3. Récepteur *scavenger* de classe B type I (SR-BI)

Efflux de cholestérol

Le SR-BI est un autre récepteur bien connu pour être impliqué dans l'efflux de cholestérol vers les HDL. Le rôle du SR-BI dans l'efflux de cholestérol vers les HDL fut d'abord montré par Ji et ses collègues [193]. Effectivement, ces derniers ont montré que la transfection de cellules CHO avec le gène SR-BI murin augmentait fortement l'efflux de cholestérol des cellules suivant une incubation avec des HDL humaines, par rapport aux cellules CHO contrôles. De plus, les niveaux d'efflux de cholestérol des cellules transfectées corrélaient avec l'expression membranaire de SR-BI. Ji et ses collègues ont montré que les cellules CHO exprimant des niveaux faibles de SR-BI suite à la transfection avaient une capacité d'efflux vers les HDL plus basse que les cellules transfectées exprimant fortement le récepteur SR-BI. Par ailleurs, les auteurs de cette étude ont aussi montré que l'efflux de cholestérol vers les HDL est corrélé avec les niveaux d'expression du récepteur de différentes lignées cellulaires (CHO, J774, Y1-BS1, Fu5AH et plusieurs autres). Gu et ses collègues [194] ont observé que des mutations entraînant une réduction de la liaison entre les HDL et SR-BI, ou le blocage des sites de liaison du récepteur avec des anticorps, réduisent la capacité d'efflux de cholestérol vers les HDL. L'ensemble de ces résultats confirment donc le rôle du récepteur SR-BI dans l'efflux de cholestérol vers les HDL. De plus, Thuahnai et ses collègues [195] ont montré que la taille des particules HDL est un facteur déterminant dans l'efflux de cholestérol vers ces lipoprotéines. Ces derniers ont démontré que des HDL reconstituées (rHDL) de grande taille (10 nm) induisent un plus grand efflux de cholestérol que des rHDL de petite taille (8 nm) dans des cellules de lignée COS-7 exprimant le SR-BI.

À ce jour, différents mécanismes ont été proposés pour expliquer le processus d'efflux du cholestérol entre le récepteur SR-BI et les HDL. En premier lieu, comme lors du transfert du cholestérol et des lipides des HDL vers les cellules, le mécanisme de captation sélective par la

formation d'un tunnel hydrophobe expliquerait aussi le transfert des lipides vers les HDL lors de l'efflux. Il a été rapporté que les HDL pouvaient aussi être internalisées avec le récepteur SR-BI par rétroendocytose et ensuite re-sécrétées par exocytose dans le milieu extracellulaire [196]. Puisque le SR-BI est impliqué à la fois dans l'absorption et l'exportation du cholestérol cellulaires via son interaction avec les HDL, le contenu en lipides de ces lipoprotéines est un facteur déterminant pour la direction du flux net de cholestérol par le SR-BI.

L'isoforme SR-BII peut aussi induire l'efflux de cholestérol vers les HDL [197], mais l'expression et l'implication de SR-BII dans plusieurs tissus et son importance dans l'efflux restent à déterminer.

Implication du SR-BI dans le développement de l'athérosclérose

Les modèles de souris SR-BI KO ont montré que l'absence de SR-BI induisait une hausse de l'étendue des plaques d'athérosclérose. Par contre, ces résultats ne permettent pas de conclure sur le rôle de l'efflux de cholestérol par le SR-BI dans la prévention du développement de l'athérosclérose, puisque ce récepteur est aussi responsable de la capture hépatique des lipoprotéines.

Afin d'étudier l'implication des fonctions d'efflux du récepteur SR-BI, différents groupes ont généré des modèles présentant une déficience en SR-BI spécifique aux macrophages. Zhang et ses collègues [198] ont produit un modèle de souris avec une déficience de SR-BI spécifique aux macrophages par le transfert de moelle osseuse de souris SR-BI^{-/-} dans des souris KO pour l'apoE. Après 12 semaines de diète normale, les souris transplantées avec les macrophages SR-BI^{-/-} présentaient des lésions athérosclérotiques aortiques beaucoup plus importantes que les souris apoE^{-/-} transférées avec de la moelle de souris exprimant SR-BI (SR-BI^{+/+}). Une seconde étude de Covey et ses collègues [199] a montré, de façon analogue à Zhang, que la transplantation de souris LDLr^{-/-} avec de la moelle osseuse de souris SR-BI^{-/-} augmente la taille des lésions athérosclérotiques dans l'aorte comparativement aux souris LDLr^{-/-} transplantées avec la moelle de souris normales (SR-BI^{+/+}). De plus, il a été montré que la restauration de l'expression de SR-BI spécifiquement au niveau des macrophages dans un modèle murin était athéroprotectrice. Ceci fut démontré par Pei et ses collègues, qui ont présenté que le transfert de moelle osseuse de souris SR-BI^{+/+} apoE^{-/-} dans des souris dKO

(SR-BI^{-/-} apoE^{-/-}) réduisait la taille des lésions athérosclérotiques (aortiques et coronaires). L'expression de SR-BI au niveau des macrophages serait donc athéroprotectrice, possiblement par le rôle de ce récepteur dans l'efflux de cholestérol vers les HDL, favorisant ainsi la sortie du cholestérol des cellules qui préviendrait la formation de cellules spumeuses.

Chez l'humain, certains variants du gène de SR-BI ont été associés avec des risques de maladies cardiovasculaires. Zanoni et ses collègues [200] rapportent que le variant P376L entraîne une perte de fonction du récepteur SR-BI en plus d'être associé à une hausse de la concentration plasmatique du HDL-C et un risque accru de maladie cardiovasculaire. L'analyse subséquente de deux cohortes prospectives révèle que le risque de MCV est 1,8 fois plus élevé (*hazard ratio* = 1,79) chez les porteurs de la mutation en comparaison aux non-porteurs. Par contre, comme le SR-BI est impliqué dans les fonctions de captation sélective hépatique en plus de l'efflux de cholestérol des macrophages, il est alors difficile d'identifier quel rôle du SR-BI est plus important chez l'humain pour prévenir l'athérosclérose.

3.3. Perte de l'homéostasie lipidique des macrophages de la paroi vasculaire

L'athérosclérose est caractérisée par le chargement de cholestérol dans les macrophages, menant à la formation de cellules spumeuses. Les macrophages sont impliqués dans la récupération et l'export du cholestérol de la paroi vasculaire, exprimant des protéines pour la capture du cholestérol des lipoprotéines et l'efflux de cholestérol vers ces dernières. Par contre, le débalancement de l'homéostasie du cholestérol des macrophages, soit par un influx massif de cholestérol ou une diminution des fonctions d'efflux, peut alors favoriser l'accumulation de cholestérol dans ces cellules. De plus, l'agglomération de ces cellules dans l'intima de l'endothélium et leur mort subséquente par apoptose ou nécrose entraîne la formation d'un coeur de lipides et de cholestérol, contribuant ainsi à la progression de la plaque athérosclérotique. Les mécanismes sous-jacents au dérèglement des fonctions de capture ou d'efflux de cholestérol sont présentés ici.

3.3.1. Infiltration et modification des lipoprotéines

La présence des OxLDL au niveau de la paroi artérielle et de la plaque reste l'une des marques distinctives de la pathologie athérosclérotique [201]. Suite à l'infiltration des LDL dans l'espace sous-endothélial des artères, celles-ci peuvent être oxydées ou modifiées par l'action de différentes enzymes présentes dans la paroi vasculaire. Plusieurs groupes de recherche ont étudié le rôle de la myéloperoxydase (MPO), une enzyme produite par les cellules phagocytaires, sur la modification des LDL. L'activité enzymatique de la MPO produit de l'acide hypochloreux (HOCl) à partir du peroxyde d'hydrogène [202]. Normalement, l'acide hypochloreux est un résultat du métabolisme oxydatif par les cellules immunitaires pour s'attaquer aux pathogènes. Par contre, le HOCl peut aussi induire des modifications aux LDL, dont la principale résulte de l'interaction entre le HOCl et les lysines de l'apolipoprotéine B des LDL, entraînant la formation de N-chloramines [202]. Les chloramines peuvent modifier la capture des LDL lorsqu'ils sont présentes à leur surface, entraînant l'internalisation massive des LDL et l'accumulation intracellulaire de cholestérol [202]. D'autres études *in vitro* ont par la suite démontré que les LDL modifiées par le HOCl induisaient une accumulation de cholestérol par les macrophages [203, 204]. En plus de l'acide hypochloreux, la myéloperoxydase peut aussi convertir le nitrite (NO_2^-), un sous-produit de l'activité du NO, en dioxyde d'azote (NO_2). Le NO_2 fait partie des espèces réactives d'azote (*reactive nitrogen species*, RNS) qui sont des molécules chimiques dérivées de l'oxyde nitrique et des ions superoxyde. Ces RNS peuvent ensuite modifier les lipides et la partie protéique des LDL, qui sont par la suite internalisées de façon incontrôlée par les cellules. Le groupe de Stanley Hazen [205] a montré que l'incubation *in vitro* de macrophages avec des LDL modifiées par les espèces réactives d'azote issue de l'activité MPO induisait l'accumulation de cholestérol intracellulaire. Par ailleurs, il a été montré que certaines enzymes pouvant modifier les LDL *in vitro*, dont la MPO et la 15-lypoxigénase, étaient présentes dans les lésions athérosclérotiques de modèles animaux, mais aussi chez l'humain [206]. La présence de ces enzymes dans la plaque contribuerait aux modifications des LDL *in vivo*, favorisant ainsi l'inflammation et la progression de la plaque par l'accumulation de ces lipoprotéines modifiées par les macrophages.

3.3.2. Mécanismes cellulaires impliqués dans la formation de cellules spumeuses

Les raisons qui mènent à l'accumulation de cholestérol dans les macrophages et à la formation des cellules spumeuses peuvent être multiples. En effet, ce phénomène peut s'expliquer par plusieurs mécanismes, dont la hausse des récepteurs responsables de la captation des LDL modifiées et par l'absence de régulation à la baisse de ces récepteurs suite à l'accumulation cellulaire de cholestérol provenant de ces lipoprotéines modifiées. De plus, le cholestérol capté des LDL modifiées peut s'accumuler et être séquestré dans des vésicules lysosomales. Par ailleurs, le cholestérol ainsi bloqué ne peut réguler à la hausse l'expression de protéines d'efflux de cholestérol, limitant par le fait même l'efflux de cholestérol afin de le sortir des cellules. La combinaison d'un ou plusieurs de ces mécanismes peut alors favoriser l'accumulation excessive de cholestérol et entraîner la formation de cellules spumeuses, contribuant ainsi à la progression de la plaque d'athérosclérose.

Perte de l'homéostasie de cholestérol causé par la capture de LDL modifiées

La capture et l'internalisation des LDL natives par le rLDL est un processus finement régulé, puisque la capture de LDL natives par leur récepteur n'entraîne pas d'accumulation de cholestérol cellulaire ni la formation de cellules spumeuses [207, 208]. Ces résultats indiquent donc que les cellules spumeuses présentes dans la plaque d'athérosclérose sont causées par d'autres mécanismes de capture du cholestérol qui ne sont pas sujets à ce type de régulation à la baisse. Une des voies d'entrée connue pour être impliquée dans la formation des cellules spumeuses est celle des récepteurs *scavengers* qui, tel que mentionné, sont impliqués dans la capture des OxLDL. En effet, il a été démontré que la capture de lipoprotéines modifiées entraîne la formation de cellules spumeuses, puisque l'expression des récepteurs CD36 et SR-AI/AII qui sont responsables de leur internalisation ne sont pas régulés à la baisse par les niveaux de cholestérol intracellulaires. L'absence de régulation à la baisse de ces récepteurs fait en sorte que les macrophages continuent de capter et d'internaliser les lipoprotéines natives et modifiées.

En plus de ne pas être régulé à la baisse par la capture de LDL modifiées, certaines études ont montré que les récepteurs CD36 et le SR-A étaient régulés à la hausse par les OxLDL, ce qui

contribue aussi à la perte de l'homéostasie du cholestérol cellulaire. Nagy et ses collègues [209] ont effectivement montré que la capture et l'internalisation de OxLDL par le CD36 augmentait son expression dans des monocytes primaires humains et des monocytes de la lignée THP-1. Cette hausse d'expression du CD36 dans les monocytes est causée par des espèces lipidiques oxydées libérées lors de la dégradation des OxLDL, le 9-HODE et le 13-HODE, qui vont ensuite lier et activer le récepteur nucléaire PPAR γ . La capture de lipoprotéines modifiées par le récepteur CD36 induit une hausse de son expression, constituant ainsi une boucle de rétroaction positive. En plus d'être régulée par les OxLDL, l'expression du CD36 peut aussi être régulée à la hausse par les AcLDL et les LDL natives [210]. À l'instar du récepteur CD36, Yoshida et collègues [211] ont aussi montré que le SR-A était régulé à la hausse par les LDL oxydées. Ceux-ci montrèrent que l'incubation de macrophages péritonéaux de souris avec ces lipoprotéines modifiées induisait une augmentation de l'expression protéique du SR-A et du CD36, en plus d'augmenter la capture et la dégradation subséquente d'OxLDL et AcLDL. Ainsi, faute de régulation à la baisse de l'expression de ces récepteurs *scavenger*, la capture des OxLDL est susceptible d'induire l'accumulation de cholestérol intracellulaire et d'esters de cholestérol, ce qui favorise la formation de cellules spumeuses. D'ailleurs, différentes études *in vivo* ont confirmé l'implication de ces récepteurs dans le développement de l'athérosclérose. En effet, Suzuki et ses collègues [212] ont observé que des souris KO pour le SR-A et l'apo E, présentaient des lésions athérosclérotiques de taille réduite par rapport aux souris contrôles apoE^{-/-}. De plus, Febbraio et ses collègues [213] ont montré que l'inactivation de CD36 dans un modèle de souris KO pour l'apo E réduit la progression de l'athérosclérose, caractérisée par la taille réduite de lésions aortiques par rapport aux souris déficientes en apo E. Ces résultats suggèrent donc que l'absence de SR-A ou de CD36 est athéroprotectrice dans les modèles murins, puisque l'entrée des OxLDL est limitée par l'absence de ces récepteurs. Toutefois, il est intéressant de noter que d'autres groupes ont montré que l'absence d'un ou des deux récepteurs simultanément n'a pas d'effet sur la formation de cellules spumeuses au niveau de la plaque [214], ce qui suggère que d'autres mécanismes ou récepteurs sont possiblement aussi impliqués dans ce déséquilibre lipidique cellulaire. Il a été montré que la capture de LDL agrégées par les macrophages via la phagocytose, pouvait entraîner la formation de cellules spumeuses *in vitro* [215], pouvant ainsi

expliquer l'accumulation de cholestérol de façon indépendante des récepteurs *scavengers* CD36 et SR-A.

Perte de l'homéostasie du cholestérol causée par la séquestration du cholestérol et la diminution de l'efflux

En plus de réguler à la baisse le rLDL, le cholestérol synthétisé ou apporté par la capture de lipoprotéines peut servir de substrat à certaines enzymes cellulaires pour générer des ligands qui régulent l'expression des transporteurs de cholestérol afin de favoriser la sortie du cholestérol des cellules. Par contre, Dhaliwal et Steinbrecher [216] ont montré que les OxLDL étaient séquestrées dans des vésicules lysosomales suite à leur capture par des macrophages péritonéaux de souris. Selon les résultats de cette étude, les lipides oxydés de ces lipoprotéines pourraient empêcher leur dégradation par les hydrolases présentes dans les lysosomes et même inactiver ces dernières. Comme le cholestérol est séquestré, il ne serait donc pas accessible pour moduler ou réguler aucune fonction cellulaire et s'amasserait dans les lysosomes. De plus, l'accumulation de cholestérol oxydé dans les lysosomes est cytotoxique et favorise l'apoptose des macrophages [217], contribuant ainsi à la progression de la plaque.

L'homéostasie du cholestérol cellulaire est aussi régulée par l'expression des différentes protéines impliquées dans l'efflux de cholestérol. À cet effet, Favari et ses collègues [218] ont montré que le chargement de macrophages murins de lignée J774 avec des OxLDL ne stimulait pas l'efflux de cholestérol et n'induisait pas non plus l'expression d'ABCA1, contrairement au chargement avec des AcLDL, puisque le cholestérol des OxLDL est séquestré et non disponible pour stimuler la voie LXR, et ultimement l'efflux ABCA1 dépendant. Par ailleurs, plusieurs des stimuli inflammatoires présents dans la plaque régulent à la baisse l'expression des transporteurs ABC, diminuant la capacité d'efflux des macrophages et la sortie du cholestérol de la plaque et favorisant l'athérosclérose.

4. Justification du modèle d'étude du macrophage in vitro

Bien que la présence et l'implication des macrophages dans le développement de l'athérosclérose a clairement été établie, les mécanismes de transport membranaire du cholestérol chez les différents sous-types restent encore peu définis. En effet, la multitude de

signaux présents au niveau de la plaque athérosclérotique compliquent la compréhension des mécanismes régulant le métabolisme du cholestérol des différents phénotypes de macrophages. Il est donc important de se munir de modèles nous permettant de déterminer l'implication relative des différents sous-types dans la plaque. Ainsi, les modèles de macrophages issus de lignées cellulaires permettent d'étudier des phénomènes complexes *in vitro*. L'information ainsi obtenue donnera une vision des phénomènes complexes sous-jacents à la pathologie de l'athérosclérose.

4.1. La lignée THP-1 comme modèle de macrophage humain

Le modèle de cellules THP-1 représente un modèle de macrophage potentiel afin de mieux comprendre les distinctions entre les différents sous-types dans leur capacité d'influx et d'efflux de cholestérol *in vitro*. Ces dernières sont issues d'une lignée monocyttaire isolée d'un patient atteint d'une leucémie, pouvant être différenciées en cellules possédant des caractéristiques analogues aux macrophages par l'ajout d'esters de phorbol, tel le PMA [219]. Le modèle THP-1 présente les avantages d'une lignée cellulaire, facilitant la culture et la reproductibilité des résultats obtenus dû à l'homogénéité du patrimoine génétique des cellules. De plus, les macrophages THP-1 présentent plusieurs similitudes avec des macrophages primaires, soit une morphologie similaire, l'expression de marqueurs membranaires typique des macrophages comme CD11b, CD14 et CD36, une augmentation de la résistance à l'apoptose et présentent aussi des fonctions typiques associées aux macrophages, dont la phagocytose et la présentation d'antigènes [220]. D'autre part, les macrophages de lignée THP-1, comme les PBMC, peuvent être polarisés en sous-types selon l'ajout de différents agents pro- et anti- inflammatoires au milieu de culture suite à leur différenciation [221]. Une autre similitude entre la lignée THP-1 et les cellules primaires est que les deux types cellulaires présentent une réponse inflammatoire suite à l'exposition au LPS et aux OxLDL que les THP-1 [220]. Plusieurs études mentionnées par Chanput et ses collègues présentent d'autres similitudes entre le modèle de macrophage THP-1 et des macrophages issus de PBMC dans la réponse au LPS. Dans ce sens, Sharif et ses collègues [222] ont montré que le traitement de macrophages THP-1 au LPS modulaient plusieurs gènes cibles de NF- κ B, de façon analogue aux macrophages issus de PBMC. Par ailleurs, plusieurs études sur les

mécanismes de capture des lipoprotéines et sur la capacité d'efflux de cholestérol des macrophages *in vitro* ont été réalisées à l'aide du modèle de macrophage THP-1 [140, 223], puisque ces cellules expriment les récepteurs et les transporteurs impliqués dans les mécanismes de transport du cholestérol, comme ABCA1, ABCG1, SR-BI, CD36 et SR-AI/AII [224]. Globalement, l'ensemble de ces facteurs indique que les macrophages différenciés des monocytes THP-1 sont un modèle approprié afin d'étudier le métabolisme du cholestérol dans les sous-types de macrophages M1 pro- et M2 anti-inflammatoires *in vitro*. De plus, certains ont montré que la polarisation en M1 peut être induite par de plus faibles doses de LPS dans les cellules THP-1, à des concentrations moins cytotoxiques [225]. Il serait alors possible de générer des macrophages de phénotype M1 représentant divers degrés d'inflammation, qui peuvent être étudiés au niveau des fonctions de transport du cholestérol.

5. Implication des différents sous-types de macrophages dans le transport du cholestérol

Malgré l'importance des macrophages dans le transport du cholestérol hors de la paroi vasculaire, via des mécanismes de capture des lipoprotéines infiltrées et la capacité d'efflux de cholestérol, peu d'études ont comparé les sous-types afin de déterminer l'implication relative des M1 et des M2 dans la formation de cellules spumeuses et la progression de l'athérosclérose. Il est important de noter que certains groupes ont montré que les stimuli pro-inflammatoires connus pour polariser les macrophages vers un sous-type M1 peuvent diminuer l'expression des transporteurs de cholestérol, indiquant un impact potentiel sur les fonctions de transport de cholestérol.

Des études ont montré que l'IFN γ et le LPS, des stimuli induisant la polarisation en sous-type M1 *in vitro*, diminuaient de gènes régulés par les LXR, comme les transporteurs ABCA1 et ABCG1 [226, 227], en plus de réduire l'expression de SR-BI[131], SR-A et CD36 [102, 228]. L'ensemble de ces études *in vitro* suggèrent que le phénotype M1 serait caractérisé par une expression réduite des transporteurs ABC et des récepteurs *scavengers* CD36 et SR-A, indiquant que la polarisation en M1 diminuerait la capacité d'efflux et la capture de lipoprotéines modifiées. À l'opposé, l'interleukine-4, une cytokine induisant la polarisation

des macrophages vers un phénotype M2, augmente l'expression du récepteur CD36 via une hausse de PPAR γ [116]. Aussi, l'expression protéique de SR-BI est régulée à la hausse par l'activation des facteurs de transcription PPAR γ et PPAR α [128], indiquant que les CD36 et SR-BI sont régulés de façon analogue. D'autre part, Chinetti et ses collègues [223] ont montré que l'activation des facteurs de transcription PPAR et LXR induisait une hausse d'expression d'ABCA1 dans des macrophages de lignée THP-1. La hausse d'expression des voies PPAR et LXR par les signaux M2, et l'augmentation en aval des récepteur *scavengers* et du transporteur ABCA1 présente le phénotype M2 comme un macrophage mieux défini pour le transport du cholestérol que le sous-type M1.

Nonobstant la caractérisation des effets des stimuli pro- et anti-inflammatoires sur l'expression des transporteurs de cholestérol, les études comparatives des sous-types M1 et M2 sur l'expression de ces protéines et sur les fonctions de transport du cholestérol des différents phénotypes restent limitées. La baisse d'expression des récepteur éboueurs SR-BI, CD36, SR-A et des transporteurs ABC par les stimuli pro-inflammatoires suggérerait que le phénotype M1 aurait des capacités de capture de lipoprotéines et d'efflux de cholestérol réduites par rapport au phénotype M2. À cet effet, Littlefield et ses collègues [224] ont montré que la polarisation en phénotype M1 par des stimuli inflammatoires dans le modèle de macrophage THP-1 diminuait l'expression d'ARNm et protéique d'ABCA1, de CD36 et de SR-A par rapport au sous-type M2. Par contre, les études comparant directement les fonctions de mobilisation de cholestérol (capture de lipoprotéines et efflux) des sous-types de macrophages M1 et M2 sont limitées. Oh et ses collègues [229] ont montré que la polarisation de macrophages de patients diabétiques en sous-type M2 avec l'IL-4, augmentait la capture de OxLDL et l'accumulation de cholestérol intracellulaire comparativement à des macrophages polarisés en M1 avec du LPS et de l'IFN γ l. L'étude d'Oh a aussi montré que les macrophages M2 présentaient une capacité d'efflux de cholestérol vers l'apo A-I réduite par rapport au sous-type M1. La portée des études ayant comparé les paramètres de mobilisation du cholestérol cellulaire des sous-types de macrophages reste limitée, puisque que l'étude d'Oh utilise un modèle de macrophages différenciés de PBMC de patients diabétiques, ce qui pourrait influencer le statut des macrophages avant même la polarisation *in vitro*, et que peu d'études ont comparé l'effet de la polarisation M1 et M2 sur les fonctions de transport du

cholestérol. Étant donné l'implication des macrophages dans la capture des lipoprotéines et l'efflux de cholestérol, et la présence des sous-types M1 et M2 dans la plaque, il est donc important de caractériser les fonctions de transport de cholestérol de ces sous-types afin de comprendre le rôle des phénotypes dans la formation et la progression de l'athérosclérose.

Objectifs du mémoire

Étant donné l'impact de l'inflammation et des macrophages dans la formation de l'athérosclérose et la diversité des signaux pro- et anti-inflammatoires présents au niveau de la plaque, il est primordial de mieux comprendre l'étendue de ces effets sur les mécanismes qui assurent la capture et l'efflux du cholestérol chez les sous-types de macrophages M1 et M2. Ainsi, nous voulions déterminer si les niveaux de capture et d'efflux du cholestérol différaient entre ces sous-types en vue de déterminer leur contribution relative dans la sortie du cholestérol de la plaque, ou leur susceptibilité à devenir des cellules spumeuses suite à la capture de LDL modifiées.

Nous avons d'abord évalué l'impact que le sérum pouvait avoir sur la polarisation des macrophages, l'expression des transporteurs de cholestérol et l'efflux du cholestérol vers l'apo A-I et les HDL₃, qui sont des accepteurs de cholestérol, puisque le sérum contient des lipoprotéines et autres facteurs pouvant moduler l'expression des fonctions de transport du cholestérol. De plus, nous avons généré deux sous-types de macrophages M1, soit M1C et M1A, représentant deux états inflammatoires, soit chronique (M1C) ou aigu (M1A), afin d'évaluer l'impact du niveau d'inflammation sur les mécanismes de transport du cholestérol. Pour répondre à ces objectifs généraux, nous avons entrepris de valider les sous-types M1C, M1A et M2 du modèle THP-1 comme représentatifs des phénotypes M1 et M2, par la caractérisation d'expression d'ARNm de marqueurs typiques des sous-types pro- (IL-6, IL-8, TNF- α) et anti- inflammatoires (DC-SIGN, MRC-1, PPAR γ). Suivant la validation du modèle, l'objectif central de ce projet était de caractériser les mécanismes de transport de cholestérol des sous-types M1C, M1A et M2 en évaluant les paramètres suivants :

- 1) Expression de l'ARNm des transporteurs de cholestérol
- 2) Expression protéique de ces transporteurs de cholestérol
- 3) Essais de transports du cholestérol incluant la capacité de capture des esters de cholestérol des HDL₃, LDL, AcLDL et d'efflux de cholestérol vers l'apo A-I et les HDL₃

4) Essais de formation de cellules spumeuses en présence d'AcLDL, évalué par la concentration de cholestérol cellulaire, afin d'identifier si un sous-type était plus enclin à l'accumulation de cholestérol intracellulaire

5) Effets de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), de l'agoniste LXR T090137 et de l'atorvastatine dans les différents sous-types de macrophages sur l'expression génique et protéique des récepteurs et transporteurs de cholestérol, ainsi que sur la capacité d'efflux de cholestérol dans les différents sous-types de macrophages

Article

Contribution de l'étudiant

Dans le cadre de mes travaux de maîtrise, j'ai effectué la majorité des expériences présentées dans ce mémoire. J'ai réalisé la mise au point des différents protocoles quant à la caractérisation des sous-types M1C, M1A et M2. J'ai aussi effectué les dosages protéiques et les immunobuvardages pour l'analyse protéique des transporteurs de cholestérol, les extractions d'ARNm ainsi que les techniques de RT-PCR et qPCR pour la mesure d'expression d'ARNm de ces transporteurs. De plus, j'ai procédé à la mesure de la masse de cholestérol des différents sous-types avec le kit Amplex Red. J'ai également effectué les tests de capture de lipoprotéines ainsi que les expériences d'efflux de cholestérol. En dernier lieu, j'ai majoritairement contribué à l'écriture de l'article présenté ci-après.

M2 macrophages from THP-1 cells display increased cholesterol handling capacity compared to pro-inflammatory M1 subtypes

Julien Renaud¹, Mathieu R. Brodeur¹, Daniel Charpentier¹, Eric Rhéaume^{1,2} David Rhains¹,
and Jean-Claude Tardif^{1,2*}

¹Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, Canada

²Faculty of Medicine, *Université de Montréal*, Quebec, Canada

Short title: THP-1 M1 M2 subtypes differ in their cholesterol handling capacities

*To whom correspondence should be addressed:

Jean-Claude Tardif, MD

Montreal Heart Institute Research Center,

5000 Belanger Street, Montreal, Canada, H1T 1C8.

Fax : 1-514-593-2500

Phone : 1-514-376-3330 ext.3604

e-mail : jean-claude.tardif@icm-mhi.org

Abstract

Atherosclerosis is characterized by monocyte infiltration and subsequent differentiation in macrophages. Various signals in the plaque prime macrophage polarization towards pro- and anti-inflammatory subtypes with different functions. Cholesterol handling, which consists in cholesterol uptake and export as well as intracellular cholesterol trafficking and storage, can be impaired in macrophages upon modified LDL uptake. This can lead to cholesterol accumulation and foam cells formation, which contributes to plaque buildup. However, the cholesterol transport and the susceptibility to accumulate cholesterol leading to foam cell formation in various macrophage subtypes remains unclear. This study investigated cholesterol transport functions in THP-1-derived macrophages polarized towards pro- and anti-inflammatory macrophage subtypes. mRNA and protein expression of cholesterol transport proteins ABCA1, SR-BI, CD36 as well as expression and secretion of apolipoprotein E, which also contributes to macrophage cholesterol efflux, were characterized as parameters defining cholesterol transport capacity. Cholesterol transport in subtypes was then assessed by measuring cholesterol efflux and cholesteryl ester uptake from lipoproteins in macrophage subtypes. Using PMA-differentiated THP-1 macrophages, polarization to M1 subtype with IFN γ and either a low dose of LPS (10 pg/mL, M1C) or an acute dose (1 μ g/mL, M1A) resulted in increased mRNA and protein expression of ABCA1, but decreased expression of scavenger receptors SR-BI and CD36, compared to IL-4 polarized M2 subtype. Apolipoprotein E secreted by M1C and M1A was 48% ($p=0.055$) and 34% ($p<0.05$) lower than M2. Cholesterol efflux to apo A-I was 21% ($p<0.05$) and 14% ($p<0.01$) lower in M1C and M1A versus M2, while HDL₃-mediated cholesterol efflux was reduced by 30% ($p<0.001$) in M1C compared to M2. Lipoprotein association of HDL₃, LDL and AcLDL was greatly reduced in both M1C and M1A subtypes. These findings highlight reduced cholesterol uptake and cholesterol efflux in pro-inflammatory M1 subtypes compared to M2. Thus, M2 macrophages may be the most relevant subtype in terms of cholesterol handling, suggesting being more effective in promoting cholesterol uptake as well as cholesterol egress from the plaque.

Introduction

The pathogenesis of atherosclerosis is characterized by increased monocyte migration and infiltration of the vascular endothelium followed by their differentiation in macrophages. In the plaque, exposure to various signals primes macrophage polarization to various subtypes, which influences the inflammatory response. The first to be characterized was the classically activated pro-inflammatory M1 macrophage. Pro-inflammatory cytokines, such as interferon gamma (IFN γ), tumoral necrosis factor alpha (TNF- α) and lipopolysaccharide (LPS), prime macrophage to the M1 subtype, leading to increased expression and secretion of inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-12. At the other end of the inflammatory spectrum is the alternatively activated M2 macrophage, which acts as regulator of the immune response, resolving inflammation through enhanced cell growth, tissue repair and secretion of cytokines and other molecules that can attenuate the inflammatory response, such as IL-10 or TGF- β [1, 2].

In the early stages of atherosclerosis, macrophages are implicated in the inflammatory response but progressively transform into foam cells following uptake of native and modified lipoproteins present in the arterial wall. Indeed, the presence of macrophage-derived foam cells in the atheroma plaque has been extensively demonstrated in vivo, both in animal and human models [3, 4]. Lipoprotein uptake by macrophages is mediated by scavenger receptors, which are abundantly expressed at their surface. Cluster of differentiation 36 (CD36) and scavenger receptor class A type I and II (SR-AI/AII) are known as mediators for modified LDL uptake [5, 6]. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) has also been identified as a receptor that binds and mediates the uptake of modified LDL species [7-9], but has been further characterized as the high-density lipoprotein (HDL) receptor [10, 11]. Uptake of lipoproteins by scavenger receptors can contribute to foam cell formation, as CD36 and SR-AI/AII expression are upregulated by modified LDL [12, 13]. However, SR-BI is downregulated by cholesterol loading [14]. To circumvent cholesterol accumulation, macrophages maintain cellular cholesterol homeostasis through cholesterol efflux, the first step of reverse cholesterol transport (RCT), a pathway by which excess cholesterol from the

periphery is transported back to the liver for catabolism [15]. Cholesterol efflux is mediated by transporters, such as ATP-binding cassette A1 (ABCA1), which induces efflux to apolipoprotein A-I (apo A-I) and small nascent HDL [16, 17]. ABCA1 is also implicated in cholesterol efflux to apolipoprotein E (apo E) that is secreted by macrophages [18, 19]. The HDL receptor SR-BI and ABCG1, another member of the ABC transporters family, promote cholesterol efflux to mature high-density lipoproteins [20, 21]. ABCA1 and ABCG1 are regulated transcriptionally by liver X receptor (LXR) and by upstream PPAR γ activation [22, 23]. LXR and PPAR γ are transcription factors that regulate the expression of genes linked to lipid storage and mobilisation, cholesterol and glucose metabolism, as well as the inflammatory response [24, 25].

Expression of pro- and anti-inflammatory markers associated with M1 and M2 macrophage subtypes has been reported in atherosclerotic plaques. Indeed, Stöger et al. [26] noted that M1 macrophages were localised in rupture-prone areas of the plaque, whereas alternatively activated M2 macrophages were more concentrated in vascular adventitial tissue and in stable plaques. Furthermore, Chinetti et al. [27] showed that mannose receptor positive macrophages in human plaques, associated with an M2 phenotype, contain smaller lipid droplets compared to mannose negative macrophages. These results suggest that the M2 subtype has increased cholesterol handling compared to the M1 subtype, making the M2 less susceptible to cholesterol accumulation and foam cell formation. However, present knowledge about cholesterol handling in M1 and M2 subtypes is still limited and conflicting. Indeed, some studies define the M2 macrophage as being more susceptible to foam cells formation compared to M1, because of increased cholesterol uptake and accumulation, as well as reduced cholesterol efflux capacity [28, 29]. Yet, other studies have shown increased cholesterol efflux associated with enhanced PPAR γ expression [22, 30], a known marker of M2 macrophages [31]. Although these studies only looked at either cholesterol efflux or uptake, they suggest that polarization has an impact on macrophage cholesterol metabolism.

Herein, cholesterol transport functions were compared between M1 and M2 macrophages to evaluate possible differences in cholesterol handling between these subtypes, which would give insight of how these macrophage subtypes contribute to foam cell formation and the

pathogenesis of atherosclerosis. To this end, THP-1 cells were used as a representative model, as they can be differentiated to macrophage-like cells [32, 33], can be polarized to different subtypes [34], and express proteins related to cholesterol metabolism [35-37]. Here, THP-1 macrophages were polarized to M1 by exposure to IFN γ and chronic (M1C) or acute (M1A) doses of LPS, generating M1 phenotypes to represent macrophages with different inflammatory profiles that could influence cholesterol handling functions. M2 subtype was obtained by stimulation with interleukin 4 (IL-4). M0 macrophages were also generated by differentiating THP-1 cells with PMA, but without adding polarization stimuli. M0 represent unpolarized macrophages, and was used as reference to compare and validate changes induced by polarization to M1 and M2. These subtypes were then compared to assess the differences between that pro- and anti-inflammatory stimuli induce on macrophage subtype markers, mRNA and protein expression, as well as cholesterol mobilization. Polarization to macrophage subtypes was confirmed by the measure of mRNA expression of IL-6, IL-8 and TNF α for M1A and M1C subtypes, and DC-SIGN, MRC-1 and PPAR γ for M2. Both M1 subtypes had increased ABCA1 protein expression levels, but decreased expression of SR-BI and CD36 compared to the M2 subtype. Levels of secreted apo E was lower in both M1 subtypes comparatively to M2. Measured cholesterol efflux capacity to apo A-I as cholesterol acceptor was lower in M1 subtypes than their M2 counterpart, which was discordant with higher ABCA1 expression in the M1 subtypes. Cholesterol efflux to HDL₃ was lower only in the M1C subtype comparatively to M1A and M2. Uptake of native HDL₃ and LDL, as well as acetylated LDL, was greatly reduced in both M1 subtypes. These results indicate that M2-polarized THP-1 subtype demonstrate better cholesterol handling capacities than M1-polarized macrophages.

Materials and methods

Reagents and Material

RPMI 1640 (#350-000-CL), DMEM without phenol red (#319-051-CL), penicillin/streptomycin 100x solution (#450-201-EL), fetal bovine serum (FBS) (#080150) and RPMI 1640 (#250-010-XK) were purchased from Wisent Bioproducts. Bovine serum albumin (BSA) (#A8806), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (#P1585), lipopolysaccharides from *E.coli* (#L2630), interferon-gamma (IFN γ) (#SRP3058) and protease inhibitor cocktail (#P2714) were bought from Sigma Aldrich. Interleukin-4 (#200-04) was acquired from Peprotech. RNeasy plus mini kit (#74136) was purchased from QIAGEN, Quant-IT RiboGreen RNA Assay Kit (#R11490) was obtained from ThermoFisher and High capacity cDNA reverse transcription Kit (#4368813) was obtained from Applied Biosystems. SSoAdvanced Universal SYBR green supermix (#1725275) and Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (#161-0374) were purchased from BioRad. Rabbit anti-ABCA1 antibody (#NB400-105), rabbit anti-SR-BI (#NB400-104) and rabbit anti-CD36 antibody (#NB400-145) were acquired from Novus Biologicals. Goat anti-LDLr antibody (#AF2148) was obtained from R&D systems. Rabbit anti- β -actin antibody (#Ab8227), Goat to rabbit HRP coupled secondary antibody (#Ab6721) and rabbit to goat HRP coupled secondary antibody (#Ab6741) were obtained from Abcam. Western lighting ECL pro chemiluminescence (#NEL121001EA), ^3H -cholesterol (#NET139005MC) and ^3H -cholesteryl oleate (#NET746L001MC) were purchased from PerkinElmer. Human apo E ELISA Kit (#STA-367) was acquired from Cell Biolabs, lipoprotein deficient serum (LPDS) (#J65516) was obtained from Alfa Aesar, Apolipoprotein A-I (#BT-927) was obtained from Biomedical Technologies and LXR agonist T0901317 (#2373) was purchased from Tocris. EcoLite(+)TM Liquid Scintillation Cocktail (#01882475) was obtained from MP Biomedicals. Human plasma (#HMPL EDTA) was obtained from Bioreclamation IVT.

Acetylation of LDL

LDL were acetylated using the method devised by Basu et al. [38]. In short, isolated LDL diluted in 0.15M sodium chloride were added to an equal volume of saturated sodium acetate in an ice bath. Whilst continuously stirring, a mass of acetic anhydride 1.5 times that of LDL

protein mass was added in 6 aliquots, one every 10 minutes. After the last aliquot was added, modified LDL were left stirring on the ice bath for an additional 30 minutes, followed by dialysis against Tris-buffered saline (TBS) pH 7.4. Acetylation of LDL resulted in a 2.5-fold increase in electrophoretic mobility compared to native LDL on a 0.75% agarose gel.

Cell culture

THP-1 cells were grown in suspension in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and penicillin (100 U/mL) plus streptomycin (100 µg/mL). For experiments, cells were plated at a density of 2×10^5 cells/cm² and then differentiated to a macrophage-like phenotype by treating cells with 100 nM PMA in the culture medium for 72h. Cells were further polarized to M1C (chronic) or M1A (acute) subtype by incubation with LPS (M1C : 10 pg/mL, M1A : 1 µg/mL) and IFN γ (20 ng/mL) for 6h (M1A) or 24h (M1C), or to M2 subtype by IL-4 treatment (20 ng/mL) for 24h. Samples for different assays were either collected immediately after polarization, or following an additional 24h period during which cells were treated.

Gene expression by RT-qPCR

Subsequently to subtype polarization in 6-wells-plate, THP-1 cells were washed 2x with PBS, followed by cell lysis and RNA extraction with RNeasy mini kit (Qiagen). RNA concentration of extracted samples was obtained by using a NanoDrop spectrophotometer (ND-1000). Complementary DNA was obtained by using 0.5 to 1 µg of RNA and the high capacity reverse transcription kit (Applied Biosystems). qPCR reaction was performed with 2.4 ng of cDNA and SSoAdvanced Universal SYBR green supermix using BioRad thermal cycler (CFX384). Primer sequences used for qPCR are shown in Table I. Reference genes for qPCR normalization were selected following GeNorm analysis performed on all samples, using BioRad CFX manager software. Selected reference genes were chosen according to the lower M value, which corresponds to the most stable pair of reference genes between samples assessed [39].

Protein expression by gel electrophoresis and immunoblotting

Differentiated and polarized THP-1 cells in a 6-well plate were washed twice with PBS, followed by cell lysis with RIPA (radioimmunoprecipitation assay) buffer and protease inhibitors. Protein concentration was measured by Lowry protein assay, and 35 µg of proteins were separated a 10% polyacrylamide gel, followed by transfer on PVDF membrane. Membranes were blocked with a solution of 5% non-fat milk powder in Tris-buffer saline with 0.1% Tween (TBS-T). Antibodies were prepared in TBS-T with 3% BSA: anti-ABCA1 (1/1000), anti SR-BI 1/10000, anti CD36 1/1000, anti β-actin (1/10000), goat anti-rabbit HRP, 1/10000. Primary and secondary antibodies were hybridized for 1h30. Enhanced chemiluminescence solution was added to membranes and luminescence was detected using BioRad ChemiDoc MP system. Protein expression was normalized to beta-actin expression and presented as a ratio of M0 expression.

ApoE concentration by ELISA

THP-1 differentiated macrophages were cultivated in a 6-well plate and polarized to M1C, M1A and M2 subtypes. Following polarization, medium was changed to RPMI 1% FBS, and cells were further incubated for 24h, after which the supernatant was collected. Apo E concentration was assessed in the supernatant by ELISA (Cell Biolabs), according to the manufacturer's instructions.

Radiolabeled cholesterol efflux assay

For ³H-cholesterol efflux, polarized THP-1 cells plated in a 24-well plate were washed once with PBS, and then cultured in RPMI containing 1% FBS plus 2 µCi/ml ³H-cholesterol, and incubated for 24h. Cells were then washed and equilibrated for an additional 2h in RPMI plus 0.2% BSA. Cholesterol acceptors, human apo A-I (10 µg/mL) or human HDL₃ (100 µg protein/mL), were added to cells in DMEM without phenol red and incubated for 4h at 37°C. Incubation medium was collected, followed by PBS washing of cells and cell lysis with NaOH 0.2N. Cell-free incubation medium and cell lysates were transferred to vials and 15 ml scintillation cocktail was added. Radioactivity (CPM) was measured in supernatant and cells by β-counting (Perkin-Elmer, Tri-Carb liquid scintillation counter). Percent cholesterol efflux from THP-1 cells was calculated as the ratio of radioactivity in supernatant to total

radioactivity (supernatant and cells) x 100. Background efflux obtained without cholesterol acceptors was subtracted from cholesterol efflux measured with acceptors.

Radioactive labeling of lipoproteins

³H-radiolabeled cholesteryl oleate in toluene was dried under nitrogen and resuspended in acetone. Lipoprotein deficient serum (LPDS) was added to the resuspended cholesteryl esters (CE), followed by the evaporation of acetone under nitrogen for 1h30. Lipoproteins were then added to the LPDS / CE mix and agitated at 4°C for 1h. Radiolabeled lipoproteins were then recovered by isopycnic density ultracentrifugation, adjusting the density of the lipoprotein solutions with potassium bromide to 1.063 g/mL for LDL and AcLDL, and to 1.21 g/mL for HDL₃ isolation. Specific activity of ³H-CE radiolabeled lipoproteins was expressed as CPM per µg of proteins.

Lipoprotein CE-association assays

THP-1 cells polarized to M1 and M2 in 12 well-plates were washed once with PBS 0.2% BSA, followed by the addition of RPMI 1640 with increasing concentrations of radiolabeled lipoproteins. Assay volume was completed to 250 µL with TBS and cells were incubated at 37°C for 4h then washed once with PBS 0.2% BSA and twice with PBS. Cells were lysed with NaOH 0.2 N, and lysate was transferred to vials and 15 mL scintillation mix was added, after which radioactivity was measured by β-counting (Perkin-Elmer, Tri-Carb liquid scintillation counter). To calculate specific CE-association, non-specific association was subtracted from total association. Non-specific association was measured by adding a 20-fold excess of unlabeled lipoproteins compared to the highest concentration of radiolabeled lipoproteins used. Association values are expressed as a ratio of radioactive lipoprotein CE divided by cellular protein. Specific association parameters K_d (dissociation constant) and B_{max} (maximal association) were calculated by non-linear regression using one-site specific binding model ($Y = B_{max} * X / K_d + X$).

Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism v7.0. Statistical difference between subtypes was assessed by one-way ANOVA for most data sets, with Fisher's LSD post-test. Two-way ANOVA was used for comparing lipoprotein CE-association curves, with Fisher's LSD post-test. Statistical significance threshold was established at $p < 0.05$.

RESULTS

Characterization of subtype markers in polarized THP-1 cells

We first characterized the phenotype of polarized macrophage subtypes by measuring the mRNA expression of pro- and anti-inflammatory genes expressed by M0, M1 and M2 macrophages, respectively. Results showed that macrophage polarization to M1 increased the expression of IL-6 by 400- (p=0.17) and 7000-fold (p=0.12), IL-8 by 28- (p=0.054) and 58-fold (p=0.09) and TNF α by 5-fold (p<0.01) and 10-fold (p<0.05) in M1C and M1A, respectively, compared to the unpolarised M0 subtype (Figure 1). These results suggest the M1A as a higher pro-inflammatory subtype than the M1C subtype, as seen by higher expression of IL-6 and IL-8, compared to the M0 and M2 subtypes. Expression of pro-inflammatory markers IL-6 and IL-8 was not different in M2 compared to M0, while TNF α expression was reduced by 70% (p<0.001) (Figure 1). DC-SIGN, MRC-1 and PPAR γ mRNA expression were increased by 18- (p<0.01), 8- (p<0.001) and 2-fold (p<0.05) respectively in M2 subtype compared to M0. mRNA expression of DC-SIGN and MRC-1 is similar to M0 for both M1 subtypes, whilst PPAR γ mRNA is reduced by 50 and 80% in M1C (p<0.05) and M1A (p<0.01) respectively compared to M0 (Figure 1).

Expression of cholesterol metabolism related proteins in THP-1 subtypes

To evaluate the capacity of each macrophage subtype to handle cholesterol, post polarization mRNA level of cholesterol transporters was measured by RT-qPCR in polarized cells (Figure 2). mRNA expression of efflux related proteins showed that ABCA1 mRNA expression was 3- and 3.75-fold (p<0.01) higher in M1C and M1A respectively compared to M2 subtype. Figure 2 also shows that ABCG1 mRNA expression in M1C was 14-fold higher than M1A (p<0.05) and 8-fold higher than M2 (p<0.05). Since apo E is also implicated in macrophage cholesterol efflux, apo E mRNA expression was also measured, but revealed no differences between THP-1 subtypes. mRNA expression of lipoprotein uptake proteins revealed that SR-BI mRNA expression was reduced by 66% (M1C) and 63% (M1A) relatively to M2 (p<0.05). CD36 mRNA expression was 54% and 57% lower in M1C and M1A compared to M2. There was no difference in SR-AI/AII mRNA expression between M1 and M2 subtypes.

ABCA1, SR-BI and CD36 protein levels were measured to evaluate if they were congruent with differences in mRNA expression observed between subtypes. Protein expression of ABCA1 was concordant with mRNA levels, as M1C and M1A had 2- and 2.5-fold increased ABCA1 expression (Figure 3) relatively to M2. Similarly to ABCA1, scavenger receptor protein levels were concordant with mRNA levels. SR-BI protein expression was 25% and 30% lower in M1C and M1A compared to M2, while CD36 was 33% and 39% lower in M1C and M1A compared to M2. Secreted apo E levels from pro- and anti-inflammatory macrophages subtypes were also evaluated. Results showed that secreted apo E levels were 48% and 34% lower in M1C ($p<0.0552$) and M1A ($p<0.05$) supernatants compared to M2 (Figure 4).

Cholesterol efflux capacity to apo A-I and HDL₃

Next, we evaluated if the differences of expression of cholesterol transporters in macrophage subtypes had an impact on cholesterol efflux from polarized THP-1 cells, since ABCA1 is majorly responsible for the efflux towards apo A-I. Figure 5 shows that efflux to apo A-I was 21% lower in M1C ($p<0.01$) and 14% ($p<0.05$) lower in M1A than M2, despite higher expression of ABCA1 in M1 cells. HDL₃-mediated cholesterol efflux was also 23% lower in M1C versus M2 ($p<0.001$), but no significant difference between M1A and M2 was observed.

Given the discrepancy between increased ABCA1 expression and lower apo A-I cholesterol efflux of M1 subtypes compared to M2, protein levels of cholesterol transporters ABCA1, SR-BI and CD36 were measured at the time of efflux to compare with levels of immediately after 24h of culture in polarizing conditions. This was done to assess if ABCA1 expression in M1 subtypes would be reduced at the time of efflux, reconciling ABCA1 expression and efflux to apo A-I. As seen in Figure 6, ABCA1 expression was still 20% higher in M1C ($p=0.1$) and 40% higher in M1A ($p<0.01$) than M2. Scavenger receptors expression also remained lower at the time of efflux assay. Indeed, SR-BI was 30% and 24% lower in M1C and M1A compared to M2 ($p<0.05$), while CD36 expression was 22% and 27% lower in M1C ($p=$) and M1A ($p<0.05$).

Stimulation of ABCA1 expression and cholesterol efflux by LXR activation

ABCA1 is upregulated transcriptionally by LXR [23]. In order to assess whether differences between LXR regulation of its target genes occurred in macrophage subtypes, mRNA and protein expression of ABCA1 was measured in basal state, following cholesterol loading with AcLDL (50 µg/ml) or after treatment with the synthetic LXR agonist T0901317 (1 µM). The LXR agonist or AcLDL loading affected ABCA1 mRNA expression in M0 and M2, but not in M1C and M1A. However, LXR agonist T0901317 and AcLDL loading increased ABCA1 protein expression and cholesterol efflux to apo A-I (Figure 7). Absence of ABCA1 mRNA induction in M1 but increase of ABCA1 protein expression by LXR activation might indicate that transcription was initiated following LXR activation, but mRNA levels were decreased by the time of cell lysis and qPCR (Figure 7).

Association of lipoprotein-derived cholesteryl esters in THP-1 macrophage subtypes

As SR-BI and CD36 expression levels differed between M1 and M2, which could result in lower lipoprotein cholesterol uptake from cells, lipoprotein-derived CE association for HDL₃, LDL and AcLDL were investigated in macrophage subtypes by a 4h association assay. Maximal association from the dose-response curves of HDL₃, LDL and AcLDL-derived CE were lower in both M1 subtypes as opposed to M2. Indeed, HDL₃-CE associations are 96% and 90% lower in M1C and M1A compared to M2 ($p < 0.0001$, two-way ANOVA) (Figure 8). CE-lipoproteins associations were also reduced by 74% ($p < 0.0001$) and 40% ($p < 0.001$), for native LDL, and by 74% and 58% ($p < 0.0001$, Comparison of fits) for AcLDL in M1C and M1A compared to M2.

Discussion

Macrophages are phagocytic cells that actively participate in the uptake of lipoproteins and cholesterol efflux to prevent cholesterol accumulation, foam cell formation and plaque buildup. Stimuli in the plaque can polarize macrophages to different functional subtypes. Not much is known about cholesterol transport in the functionally distinct M1 and M2 subtypes. Studies assessing cholesterol transport functions in macrophage subtypes tend to focus only on certain aspects of cholesterol transport, or on one macrophage subtype. To our knowledge, cholesterol transport functions of M1 and M2 subtypes has not been extensively compared *in vitro*, which could yield better understanding of how these subtypes behave *in vivo* and give better insight on how each subtypes contribute to atherogenesis. In this study, polarized THP-1 derived macrophages were used as representative of the M1 and M2 phenotypes, which have been characterized in human atherosclerotic plaques [26, 31]. Cholesterol transport parameters were studied in these cells by characterizing the expression of cholesterol transport proteins expression, lipoprotein CE uptake and cholesterol efflux assays, as well as assessing susceptibility to cholesterol accumulation.

Cholesterol transporters like ABCA1 are mediators of cholesterol efflux. ABCA1 has been shown to be the main transporter responsible for cellular cholesterol efflux to poorly lipidated apo A-I. Therefore, ABCA1 expression was measured to assess potential differences between subtypes, which could have major effects on cellular cholesterol levels and cholesterol efflux functions. We demonstrated that THP-1 cells polarized to either M1C or M1A had higher ABCA1 mRNA and protein expression compared to the M2 subtype. Accordingly, it was previously shown that differentiation of isolated human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) to M1 increased ABCA1 expression compared to M2 subtype [27]. Moreover, higher ABCA1 expression was colocalized with regions of the human atherosclerotic plaque labeled with M1 markers [40]. Therefore, these results suggest that in M1 macrophages, pathways implicated in the expression of ABCA1 are activated comparatively to M2 subtypes. However, other studies have demonstrated that inflammatory stimuli LPS and IFN γ reduced ABCA1 expression in macrophages [41, 42]. As Chinetti et al. [27] used different stimuli to induce M1

polarization, such as IL-1 β and TNF- α , it is possible that LPS effects are different than those stimuli on macrophage polarization and ABCA1 expression.

As such, Littlefield et al. [43] have shown that polarization of THP-1 cells to M1 reduces mRNA and protein expression of ABCA1 and other cholesterol transporters compared to the M2 subtype. These results are concordant with the literature, since ABCA1 expression is known to be transcriptionally regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and LXR [23, 24], and ABCA1 regulation pathways involving these transcription factors are downregulated by inflammatory stimuli [41, 44]. However, even though Littlefield's study was also conducted using THP-1 polarized cells and LPS, differences in macrophage differentiation and polarisation protocols between our study and theirs could account for the observed discrepancies on ABCA1 expression, such as shorter differentiation times with PMA, longer polarization periods, and a resting phase between differentiation and polarization. Increased ABCA1 expression levels in our M1 macrophages may indicate that other pathways compensate and prevent ABCA1 downregulation in M1 subtypes by pro-inflammatory stimuli. Alternatively, ABCA1 has been shown to be downregulated by micro RNA-33 [45]. It is thus possible that transcriptional silencing by miR-33 is decreased in our M1 subtypes compared to M2. Furthermore, *in vitro* macrophage polarization might not accurately represent what occurs *in vivo*. Hence, more studies will be required to validate how ABCA1 is regulated by stimuli that induce macrophage polarization to subtypes *in vitro*. These results should also be confirmed *in vivo* using more physiological models, such as isolating macrophage subtypes from animal models, characterize their phenotypes, and measure ABCA1 expression.

Given the difference in the expression of ABCA1 between subtypes, we assessed if cholesterol efflux to apo A-I differed among the M1 and M2-polarized cells. Interestingly, although ABCA1 expression was higher in M1, cholesterol efflux to apo A-I was lower compared to M2 subtype. To account for possible changes in protein expression occurring later after polarization, ABCA1 protein levels were measured at the time of efflux. However, both M1 subtypes still had higher ABCA1 protein levels compared to M2. Thus another mechanism must be involved to explain the lack of increased cholesterol efflux to apo A-1 in the M1

subtypes. Since M1 macrophages secreted lower levels of apo E than the M2 subtype, and because apo E promotes cholesterol efflux through interaction with ABCA1 [18], it is possible that lower secretion of apo E in M1C and M1A subtypes induces less cholesterol efflux from M1 subtypes in the presence of apo A-I despite increased ABCA1 expression. Higher secretion of apo E from M2 during the efflux period would lead to an increase measured efflux to Apo A-I, since the efflux measure does not discriminate lipoprotein subtypes but rather measures the radioactivity in the medium and cells. Another possible explanation for the discrepancy between increased expression and lower activity of ABCA1 in M1 subtypes would be that ABCA1 degradation is faster and/or that it is not correctly transported to the cell membrane. In both cases, this would reduce interactions between ABCA1 and apo A-I, therefore potentially lowering ABCA1 function in cholesterol efflux to apo A-I.

We demonstrated that cholesterol efflux to HDL₃ was lower in the M1C subtype compared with M2, which agrees with reduced mRNA and protein expression of SR-BI in M1 subtype. Cholesterol efflux to HDL is a process mainly mediated by interactions with receptors such as ABCG1 and SR-BI. In the case of M1C, lower mRNA and protein expression of SR-BI is concordant with the reduction of efflux to HDL. However, there are no differences in HDL₃-mediated cholesterol efflux between M1A and M2. Considering that ABCG1 also contributes to cholesterol efflux to HDL [20, 46], it is possible that higher expression of these transporters could account for the lack of differences in HDL-mediated efflux between M1A and M2 subtypes. mRNA expression of ABCG1 was not higher in M1A than the M2 subtype. However, protein levels should be measured to ascertain if ABCG1 expression is different between M1 and M2 subtypes.

Aside from cholesterol efflux, scavenger receptors present at the surface of macrophages promote lipoprotein uptake [47]. This process limits the cytotoxic and inflammatory effects [48, 49] of harmful lipids on other cells present in the plaque and their deposition in the extracellular matrix. The capacity of macrophage subtypes to uptake CE was evaluated as differences in scavenger receptors expression were observed between M1 and M2 subtypes. Reduction in lipoprotein association for HDL₃, native LDL and AcLDL were congruent with the lower SR-BI expression noted in M1C and M1A as SR-BI is implicated in the uptake of

these lipoproteins. Because CD36 also promotes lipoprotein uptake and was shown to be reduced in M1 subtypes, this further links lower scavenger receptor expression in M1 subtypes with reduced lipoprotein association capacity. Interestingly, the difference of AcLDL uptake between subtypes was smaller than for HDL or native LDL. Even though both SR-AI/AII and CD36 promote uptake of modified lipoproteins, Kunjathoor and colleagues [50] have suggested that AcLDL uptake was predominantly mediated by SR-A. mRNA expression of SR-AI/AII suggests no difference among subtypes, which could account for this smaller effect on CE uptake from AcLDL between M1 and M2. Globally, lower scavenger receptor expression and lipoprotein uptake capacity suggest that the M1 subtype has decreased cholesterol handling, or at least lower cholesterol uptake and cholesterol efflux than the M2 subtype. Cholesterol accumulation in M1 subtypes with lower cholesterol efflux could contribute to foam cell formation.

There are several limitations to macrophage *in vitro* models, as differentiation and polarization protocols can vary between studies, which could contribute to the diverging results on M1 and M2 cholesterol uptake and efflux and may or may not correctly reflect the situation of interest of macrophages present in atherosclerotic plaques. High variability in the effects of various stimuli on macrophage models also prompted us to evaluate two M1 subtypes to determine if the level of inflammation could have an impact on cholesterol metabolism in this class of subtype. Results showed that protein and mRNA expression of cholesterol transporters were also similar in both M1 subtypes. As others have shown that LPS is cytotoxic at doses used for polarization [51], M1C appears more suitable as an M1 model. However, even if lower doses of LPS polarize cells to an M1-like phenotype, differences of the dose on the level of inflammation could bring about many other cellular changes unaccounted for. Since LPS downregulates receptors that promote lipoprotein uptake and cholesterol efflux, differences in the level of inflammation could also modulate cholesterol transport functions. Therefore, using macrophage M1 models corresponding inflammation levels in the plaque could be more suited to evaluate cholesterol transport of macrophage subtypes in the context of atherosclerosis. Furthermore, whilst offering many advantages, THP-1-derived macrophages are immortalized cells that might not be as representative as primary macrophages. Hence, it is important to validate macrophage subtype models which are most representative of the pathology of

atherosclerosis, considering the diversity of stimuli implicated and their potential effects on cholesterol metabolism.

In conclusion, these findings suggest that M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells are representative models of macrophage pro- and anti-inflammatory phenotypes and also highlighted similarities between M1C and M1A as archetypal M1 subtypes. Differences between M1 and M2 in terms of lipoprotein uptake and cholesterol efflux in THP-1 model, summarized in Table II, further reinforces the hypothesis that polarized M2 macrophages are more suited for cholesterol handling. Multiple macrophage subtypes have been further characterized in atherosclerosis, thus making it crucial to better understand the mechanisms of cholesterol handling and the role of each subtype. This would give us insight on potential pharmacological targets in repolarizing macrophages to more beneficial phenotypes for plaque regression.

Acknowledgements

I would like to thank Aurélie Masurel for her knowledge about RT-qPCR and Marie Boulé for her knowledge of cholesterol efflux methods, as well as other laboratory staff members for their knowledge, support and insights.

References

1. Italiani, P. and D. Boraschi, *From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 514.
2. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
3. Aqel, N.M., et al., *Identification of macrophages and smooth muscle cells in human atherosclerosis using monoclonal antibodies*. J Pathol, 1985. **146**(3): p. 197-204.
4. Wilson, H.M., *Macrophages heterogeneity in atherosclerosis - implications for therapy*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(8): p. 2055-65
5. Krieger, M. and J. Herz, *Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP)*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 601-37.
6. Endemann, G., et al., *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11811-6.
7. Rhainds, D., et al., *The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters*. Biochemistry, 2003. **42**(24): p. 7527-38.
8. Bourret, G., et al., *In vivo cholesteryl ester selective uptake of mildly and standardly oxidized LDL occurs by both parenchymal and nonparenchymal mouse hepatic cells but SR-BI is only responsible for standardly oxidized LDL selective uptake by nonparenchymal cells*. Int J Biochem Cell Biol, 2006. **38**(7): p. 1160-70.
9. Acton, S.L., et al., *Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**(33): p. 21003-9.
10. Krieger, M., *Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems*. Journal of Clinical Investigation, 2001. **108**(6): p. 793-797.
11. Acton, S., et al., *Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor*. Science, 1996. **271**(5248): p. 518-20.
12. Han, J., et al., *Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36*. J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 21654-9.
13. Yoshida, H., et al., *Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macrosialin in resident mouse peritoneal macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(5): p. 794-802.
14. Yu, L., et al., *Sterol regulation of scavenger receptor class B type I in macrophages*. J Lipid Res, 2004. **45**(5): p. 889-99.
15. Glomset, J.A., *The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction*. J Lipid Res, 1968. **9**(2): p. 155-67.
16. Wang, N., et al., *Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABCA1*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 33053-8.
17. Du, X.M., et al., *HDL particle size is a critical determinant of ABCA1-mediated macrophage cellular cholesterol export*. Circ Res, 2015. **116**(7): p. 1133-42.
18. Krimbou, L., et al., *Molecular interactions between apoE and ABCA1: impact on apoE lipidation*. J Lipid Res, 2004. **45**(5): p. 839-48.

19. Zanotti, I., et al., *Macrophage, but not systemic, apolipoprotein E is necessary for macrophage reverse cholesterol transport in vivo*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011. **31**(1): p. 74-80.
20. Klucken, J., et al., *ABCG1 (ABC8), the human homolog of the Drosophila white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(2): p. 817-22.
21. Ji, Y., et al., *Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(34): p. 20982-5.
22. Chawla, A., et al., *A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis*. *Mol Cell*, 2001. **7**(1): p. 161-71.
23. Costet, P., et al., *Sterol-dependent transactivation of the ABCA1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(36): p. 28240-5
24. Lin, C.Y. and J.A. Gustafsson, *Targeting liver X receptors in cancer therapeutics*. *Nat Rev Cancer*, 2015. **15**(4): p. 216-24.
25. Chawla, A., *Control of macrophage activation and function by PPARs*. *Circ Res*, 2010. **106**(10): p. 1559-69.
26. Stoger, J.L., et al., *Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2012. **225**(2): p. 461-8.
27. Chinetti-Gbaguidi, G., et al., *Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRAalpha pathways*. *Circ Res*, 2011. **108**(8): p. 985-95.
28. Oh, J., et al., *Endoplasmic reticulum stress controls M2 macrophage differentiation and foam cell formation*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(15): p. 11629-41.
29. van Tits, L.J., et al., *Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Kruppel-like factor 2*. *Atherosclerosis*, 2011. **214**(2): p. 345-9.
30. Chinetti, G., et al., *PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway*. *Nat Med*, 2001. **7**(1): p. 53-8.
31. Bouhlel, M.A., et al., *PPARGamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties*. *Cell Metab*, 2007. **6**(2): p. 137-43.
32. Tsuchiya, S., et al., *Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester*. *Cancer Res*, 1982. **42**(4): p. 1530-6.
33. Daigneault, M., et al., *The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages*. *PLoS One*, 2010. **5**(1): p. e8668.
34. Chanput, W., J.J. Mes, and H.J. Wichers, *THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach*. *Int Immunopharmacol*, 2014. **23**(1): p. 37-45.
35. Matsumoto, A., et al., *Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(23): p. 9133-7.
36. Murao, K., et al., *Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(28): p. 17551-7.

37. Fernandez-Ruiz, I., et al., *Differential lipid metabolism in monocytes and macrophages: influence of cholesterol loading*. J Lipid Res, 2016. **57**(4): p. 574-86.
38. Basu, S.K., et al., *Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(9): p. 3178-82.
39. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. research0034 1-research0034 11.
40. de Gaetano, M., et al., *M1- and M2-Type Macrophage Responses Are Predictive of Adverse Outcomes in Human Atherosclerosis*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 275.
41. Hao, X.R., et al., *IFN-gamma down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXRA in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner*. Atherosclerosis, 2009. **203**(2): p. 417-28.
42. Zhao, G.J., et al., *Antagonism of betulinic acid on LPS-mediated inhibition of ABCA1 and cholesterol efflux through inhibiting nuclear factor-kappaB signaling pathway and miR-33 expression*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74782.
43. Littlefield, M., et al., *Polarization of Human THP-1 Macrophages: Link between Adenosine Receptors, Inflammation and Lipid Accumulation*. 2015.
44. Majdalawieh, A. and H.S. Ro, *LPS-induced suppression of macrophage cholesterol efflux is mediated by adipocyte enhancer-binding protein 1*. Int J Biochem Cell Biol, 2009. **41**(7): p. 1518-25.
45. Rayner, K.J., et al., *MiR-33 Contributes to the Regulation of Cholesterol Homeostasis*. Science, 2010. **328**(5985): p. 1570-3.
46. Wang, N., et al., *ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(26): p. 9774-9.
47. Moore, K.J. and M.W. Freeman, *Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): p. 1702-11.
48. Hessler, J.R., A.L. Robertson, Jr., and G.M. Chisolm, 3rd, *LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture*. Atherosclerosis, 1979. **32**(3): p. 213-29.
49. Hessler, J.R., et al., *Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity*. Arteriosclerosis, 1983. **3**(3): p. 215-22.
50. Kunjathoor, V.V., et al., *Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49982-8.
51. Genin, M., et al., *M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide*. BMC Cancer, 2015. **15**: p. 577.

Tables

Table I : Primer sequences for qPCR.

Primers	Direction	Sequence
ABCA1	Forward	5'-AGG CTG TGT CTC GTA TTG TC-3'
	Reverse	5'-CAG TAA GGA GTT GTA GAG TTG TC-3'
ABCG1	Forward	5'-AAC GAA GCC AAG AAG GTC-3'
	Reverse	5'-CCA GTA GTT CAG GTG TTC C-3'
ApoE	Forward	5'-GGA ACT GAG GGC GCT GAT-3'
	Reverse	5'-GGT CAG TTG TTC CTC CAG T-3'
CD36	Forward	5'-GAT GAA CAG CAG CAA CAT TC-3'
	Reverse	5'-CCA CAG CCA GAT TGA GAA C-3'
DC-SIGN (CD209)	Forward	5'-CTC TCC TTC ACG CTC TTG-3'
	Reverse	5'-TGG ATT GTT CCT GAC TTA TGG-3'
GAPDH	Forward	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'
	Reverse	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'
IL-6	Forward	5'-AGA GTA GTG AGG AAC AAG-3'
	Reverse	5'-GGT GGT TAT TGC ATC TAG-3'
IL-8	Forward	5'-TGT GTG AAG GTG CAG TTT-3'
	Reverse	5'-GGA AAG GTT TGG AGT ATG TCT-3'
MRC-1 (CD206, MMR)	Forward	5'-CTA CTA TGT CTT GGA ATG ATA T-3'
	Reverse	5'-TAA CTG GTG GAT TGT CTT-3'
PPARγ	Forward	5'-ACG AAG ACA TTC CAT TCA CAA G-3'
	Reverse	5'-TCT CCA CAG ACA CGA CAT TC-3'
18SrRNA	Forward	5'-GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT-3'
	Reverse	5'-CCA TCC AAT CGG TAG TAH CG-3'
SR-AI/AII (MSR)	Forward	5'-TCC AAG AGA ATA CCT TCA-3'
	Reverse	5'-CAG TCT GAG ATC ATT AGT G-3'
SR-BI	Forward	5'-CAA GCA GCA GGT CCT TAA-3'
	Reverse	5'-ATA GGG ATC TCC TTC CAC AT-3'
TNF-α	Forward	5'-CCA GGC AGT CAG ATC ATC-3'
	Reverse	5'-CTC AGC TTG AGG GTT TGC-3'

Table II : Table of changes induced by polarization relative to macrophage phenotype expression markers and cholesterol mobilization in THP-1 macrophages.

<u>Compared to M0</u>	<u>Cell phenotype</u>	<u>Cholesterol mobilization</u>
M1C	↑ TNF α ↑ IL-6 and IL-8 trend ↓ PPAR γ	↑ ABCA1 mRNA and protein ↑ ABCG1 mRNA ↑ SR-AI/AII mRNA ↓ SR-BI mRNA and protein ↓ HDL ₃ efflux
M1A	↑ TNF α trend ↑ IL-6 and IL-8 ↓ PPAR γ	↑ ABCA1 mRNA and protein ↓ ABCG1 mRNA ↑ SR-AI/AII mRNA ↓ CD36 mRNA ↓ SR-BI mRNA and protein
M2	↑ DC-SIGN ↑ MRC1 ↑ PPAR γ ↓ TNF α	= ABCA1 mRNA and protein ↓ ABCG1 mRNA = SR-BI mRNA and protein ↑ CD36 mRNA and protein ↑ Apo A-I efflux ↑ Secreted Apo E trend

Figure legend

Figure 1 : Expression of M1 and M2 differentiation markers. PMA differentiated THP-1 cells were cultivated in polarization medium for 6h to induce M1A and 24h to induce M1C or M2 subtype. mRNA expression of M1 markers IL-6, IL8 and TNF- α (A-C) and M2 markers DC-SIGN, MRC-1 and PPAR γ (D-F) were assessed by qPCR and normalized to housekeeping genes 18S rRNA and GAPDH. Results are expressed as mean \pm SD (n=5). Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA with Fisher's LSD post-test (paired data). Data presented as statistically different ($p < 0.05$) from M0 (a), M1C (b) or M1A (c).

Figure 2 : mRNA expression of cholesterol mobilization genes in THP-1 macrophages. PMA differentiated THP-1 cells were treated for 6-24h to induce M1 subtype polarization or M2 polarization. Following polarization, mRNA was extracted and purified, and cDNA was obtained by RT-PCR. mRNA expression of ABCA1 and ABCG1 (A-B), apolipoprotein E (C) and scavenger receptors SR-BI, CD36 and SR-AI/AII (D-F) were assessed by RT-qPCR and normalized to housekeeping genes 18SrRNA and GAPDH. Results are expressed as mean \pm SD (n=5). Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA with Fisher's LSD post-test (paired data). Data presented as statistically different ($p < 0.05$) from M0 (a), M1C (b).

Figure 3 : Protein expression of cholesterol transporters ABCA1, SR-BI and CD36 in THP-1 polarized subtypes. Following PMA differentiation and polarization to M1 and M2 subtypes, protein were extracted with lysis buffer and expression of ABCA1 (A), SR-BI (B) and CD36 (C) was assessed by Western blot. Results are expressed as mean \pm SD (n=4-7). Statistical analysis was carried out by One-way ANOVA with Fisher's LSD post-test (paired data). Data presented as statistically different ($p < 0.05$) from M0 (a), M1C (b) or M1A (c).

Figure 4 : ApoE secretion by THP-1 subtypes. Secreted ApoE was measured by ELISA assay in culture medium collected from unpolarized M0 and polarized M1 and M2 subtypes. Values are normalized to protein mass. Results are expressed as mean \pm SD (n=4-7). Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA with Fisher's LSD post-test (paired data). Data presented as statistically different ($p < 0.05$) from M0 (a), M1C (b) or M1A (c)

Figure 5 : Cholesterol efflux to ApoA-I and HDL₃ in M1 and M2 macrophages. THP-1 cells polarized to M1 and M2 were labeled with 2 μ Ci/mL of ³H-cholesterol for 24h, followed by an equilibrating period of 2h. Cholesterol acceptors ApoA-I (10 μ g/mL) or HDL₃ (100

$\mu\text{g/mL}$) were added to cell medium for 4h, succeeded by cell lysis and β -counting to measure radioactivity. Efflux to ApoA-I (A) or HDL₃ (B) was calculated as ratio of radioactivity in supernatant post-efflux to total radioactivity (supernatant and cells). Results are expressed as mean \pm SD (n=9). Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA with Fisher's LSD post-test (paired data). Data presented as statistically different ($p < 0.05$) from M0 (a), M1C (b) or M1A.

Figure 6 : Protein expression of ABCA1, SR-BI and CD36 at time of efflux. THP-1 M1 and M2 polarized cells were incubated to mimic cholesterol efflux protocol and protein expression of ABCA1 (A), SR-BI (B) and CD36 (C) were assessed by Western blot. Results are expressed as mean \pm SD (n=4). Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA with Fisher's LSD post-test (paired data). Data presented as statistically different ($p < 0.05$) from M0 (a), M1C (b) or M1A (c).

Figure 7 : Effect of cholesterol loading and LXR agonist on ABCA1 mRNA expression, protein expression and apoA-I mediated efflux in THP-1 subtypes. After PMA differentiation and polarization to M1 and M2 subtypes, control medium or medium containing either AcLDL (50 $\mu\text{g} / \text{mL}$) or LXR agonist T0901317 (1 μM) was added to cells and incubated for 24h. Following treatment, mRNA (A) and protein (B) were extracted and their expression were assessed by qPCR and western blot (n=4). Concomitant to AcLDL or LXR agonist treatment, polarized cells were loaded with 2 $\mu\text{Ci/mL}$ of ³H-cholesterol for 24h, followed by an equilibrating period of 2h. Cholesterol acceptors ApoA-I (10 $\mu\text{g/mL}$) was added to cell medium for 4h, followed by cell lysis and β -counting to measure radioactivity. Efflux is calculated to ApoA-I (C) as ratio of radioactivity in supernatant post-efflux to total radioactivity (supernatant and cells) (n=5). Results are expressed as mean \pm SD.

Figure 8 : ³H-CE HDL₃, LDL and AcLDL association of THP-1 subtypes. Differentiated and polarized THP-1 macrophages were incubated with different concentrations of radiolabeled HDL₃ (A), LDL (B) and AcLDL (C) (0-100 $\mu\text{g/mL}$) without or with unlabeled (cold) lipoproteins (2 mg/mL). Following 4h incubation at 37°C, cells were washed and radioactivity was measured by β -counting to assess lipoprotein association. Results are expressed as mean \pm SD (n=4). Statistical analysis was carried out by two-way ANOVA with Fisher's LSD post-test. Data presented as statistically different ($p < 0.05$) from M0 (a), M1C (b) or M1A (c).

Article Figure 1

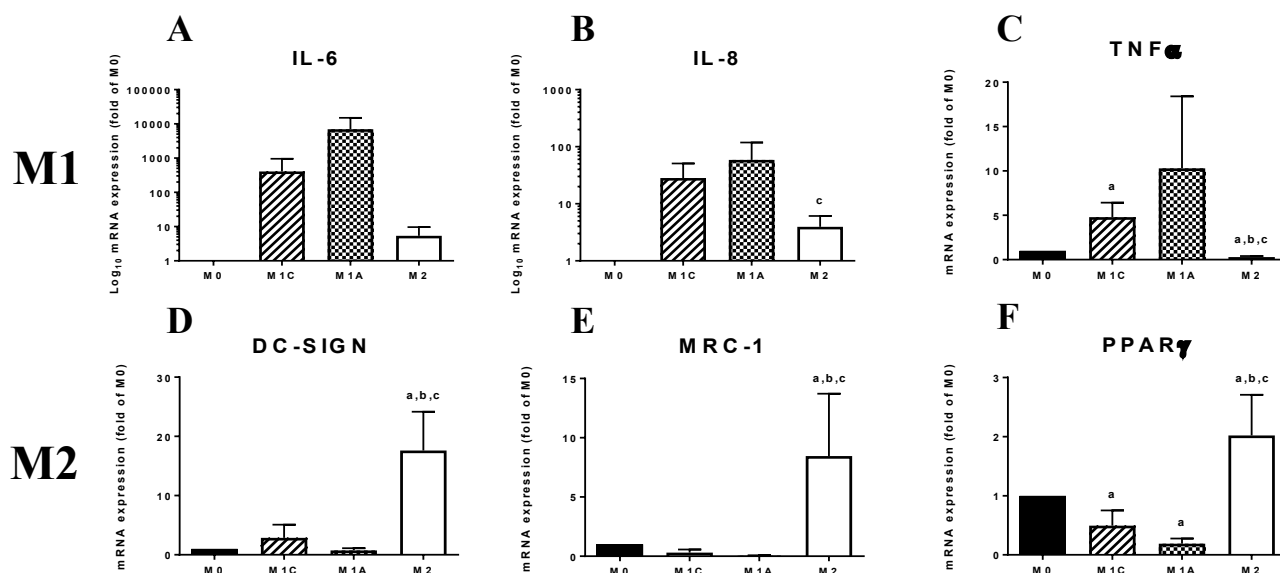


Figure 7. Expression of M1 and M2 representative markers.

PMA differentiated THP-1 cells were cultivated in polarization medium for 6h to induce M1A and 24h to induce M1C or M2 subtype. mRNA expression of M1 markers IL-6, IL8 and TNF- α (A-C) and M2 markers DC-SIGN, MRC-1 and PPAR γ (D-F) were assessed by qPCR and normalized to housekeeping genes 18S rRNA and GAPDH. Results are expressed as mean \pm SD (n=5). Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA with Fisher's LSD post-test (paired data). Data presented as statistically different ($p < 0.05$) from M0 (a), M1C (b) or M1A (c).

Article Figure 2

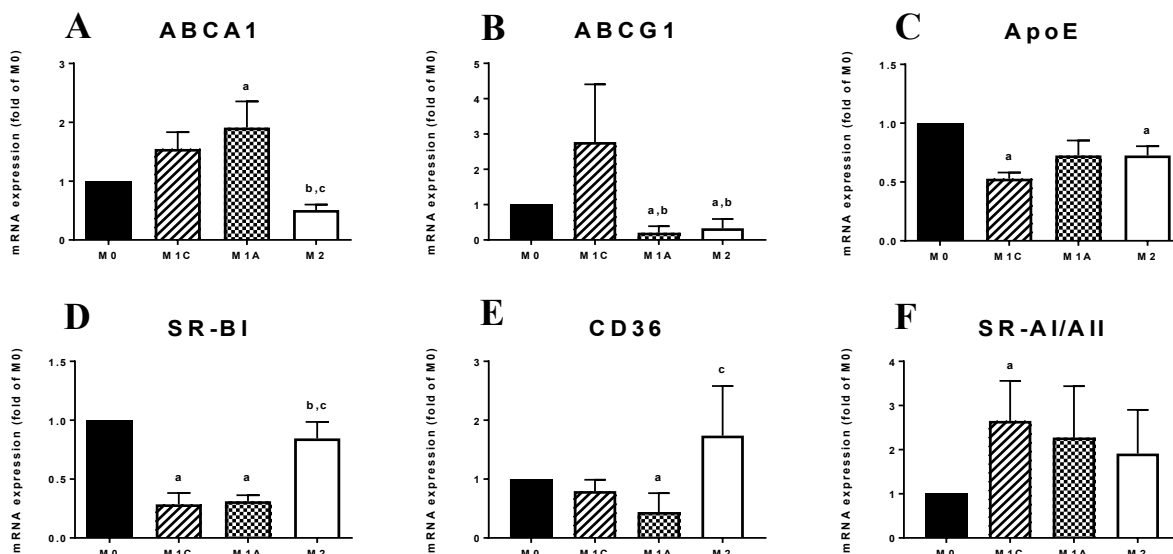


Figure 8. mRNA Expression of cholesterol mobilization related genes in THP-1 macrophage.

PMA differentiated THP-1 cells were treated for 6-24h to induce M1 subtype polarization or M2 polarization. Following polarization, mRNA was extracted and purified, and cDNA was obtained by RT-PCR. mRNA expression of ABCA1 and ABCG1 (A-B), apolipoprotein E (C) and scavenger receptors SR-BI, CD36 and SR-AI/AII (D-F) were assessed by RT-qPCR and normalized to housekeeping genes 18SrRNA and GAPDH. Results are expressed as mean \pm SD (n=5). Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA with Fisher's LSD post-test (paired data). Data presented as statistically different ($p < 0.05$) from M0 (a), M1C (b).

Article Figure 3

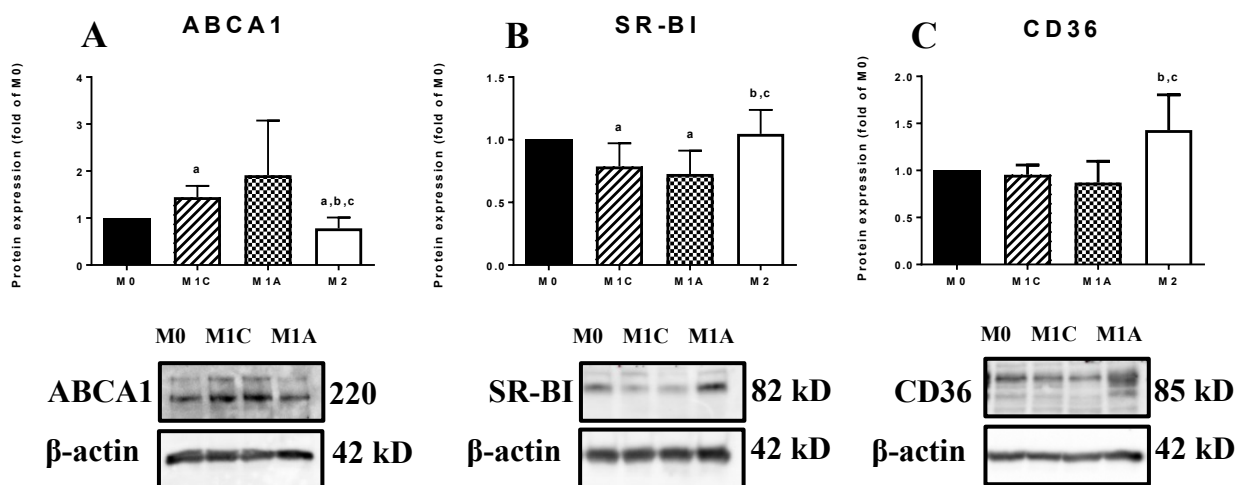


Figure 9. Protein expression of cholesterol transporters ABCA1, SR-BI and CD36 in THP-1 polarized subtypes.

Following PMA differentiation and polarization to M1 and M2 subtypes, protein were extracted with lysis buffer and expression of ABCA1 (A), SR-BI (B) and CD36 (C) was assessed by Western blot. Protein expression was normalized to Beta-actin and presented as ratio of M0. Results are expressed as mean \pm SD (n=4-7). Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA with Fisher's LSD post-test (paired data). Data presented as statistically different ($p < 0.05$) from M0 (a), M1C (b) or M1A (c).

Article Figure 4

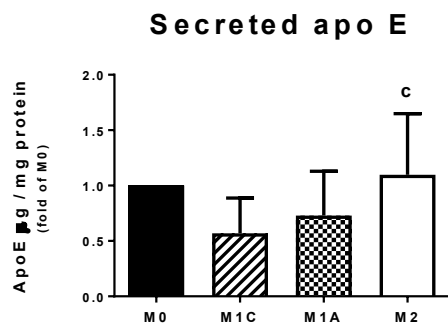


Figure 10. ApoE secretion by THP-1 subtypes.

Secreted ApoE was measured by ELISA assay in culture medium collected from unpolarized M0 and polarized M1 and M2 subtypes. Values are normalized to protein mass. Results are expressed as mean \pm SD (n=4). Statistical analysis was carried out by One-way ANOVA with Fisher's LSD post-test (paired data). Data presented as statistically different ($p < 0.05$) from M1A (c).

Article Figure 5

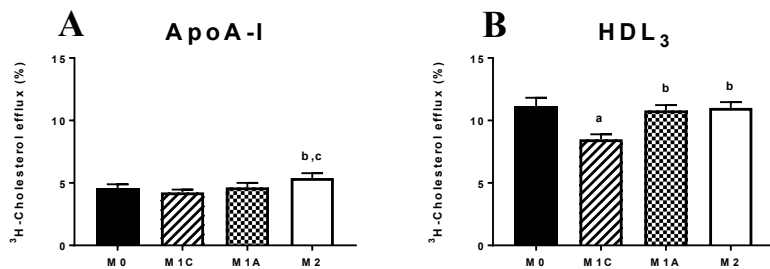


Figure 11 : Cholesterol efflux to ApoA-I and HDL₃ in M1 and M2 macrophages.

THP-1 cells polarized to M1 and M2 were labeled with 2 $\mu\text{Ci/mL}$ of ^3H -cholesterol for 24h, followed by an equilibrating period of 2h. Cholesterol acceptors ApoA-I (10 $\mu\text{g/mL}$) or HDL₃ (100 $\mu\text{g/mL}$) were added to cell medium for 4h, succeeded by cell lysis and β -counting to measure radioactivity. Efflux to ApoA-I (**A**) or HDL₃ (**B**) was calculated as ratio of radioactivity in supernatant post-efflux to total radioactivity (supernatant and cells). Results are expressed as mean \pm SD (n=9). Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA with Fisher's LSD post-test (paired data). Data presented as statistically different ($p < 0.05$) from M0 (a), M1C (b) or M1A (c).

Article Figure 6

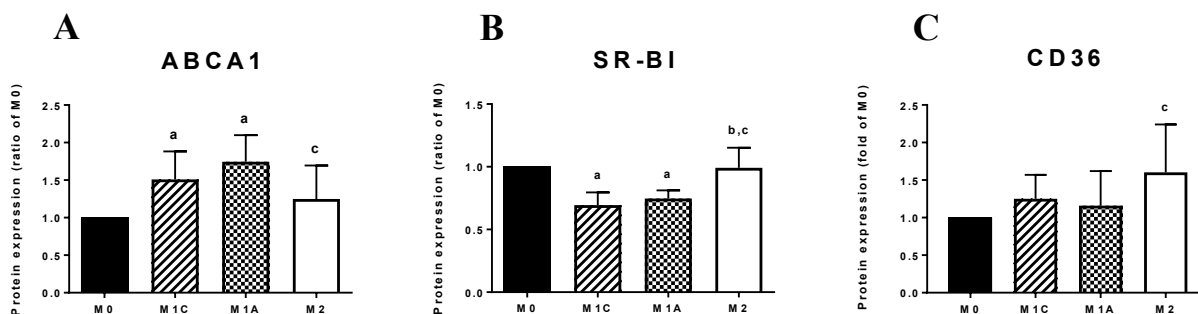


Figure 12 : Protein expression of ABCA1, SR-BI and CD36 at time of efflux.

THP-1 M1 and M2 polarized cells were incubated to mimic cholesterol efflux protocol and protein expression of ABCA1 (A), SR-BI (B) and CD36 (C) were assessed by Western blot. Protein expression was normalized to Beta-actin and presented as ratio of M0. Results are expressed as mean \pm SD (n=4). Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA with Fisher's LSD post-test (paired data). Data presented as statistically different ($p < 0.05$) from M0 (a), M1C (b) or M1A (c).

Article Figure 7

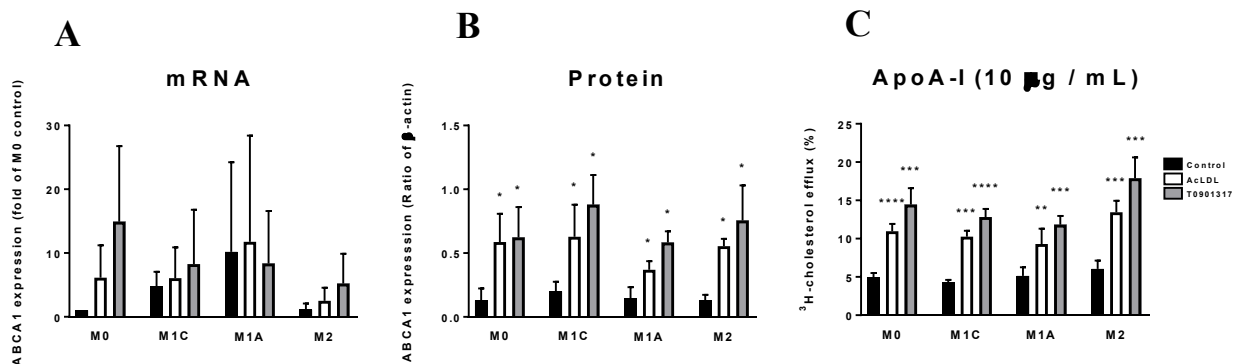


Figure 13. Effect of cholesterol loading and LXR agonist on ABCA1 mRNA expression, protein expression and apoA-I mediated efflux in THP-1 subtypes.

After PMA differentiation and polarization to M1 and M2 subtypes, control medium or medium containing either AcLDL (50 µg / mL) or LXR agonist T0901317 (1 µM) was added to cells and incubated for 24h. Following treatment, mRNA (**A**) and protein (**B**) were extracted and their expression were assessed by qPCR and western blot (n=4). Concomitant to AcLDL or LXR agonist treatment, polarized cells were loaded with 2 µCi/mL of ³H-cholesterol for 24h, followed by an equilibrating period of 2h. Cholesterol acceptors ApoA-I (10 µg/mL) was added to cell medium for 4h, followed by cell lysis and β-counting to measure radioactivity. Efflux is calculated to ApoA-I (**C**) as ratio of radioactivity in supernatant post-efflux to total radioactivity (supernatant and cells) (n=5). Results are expressed as mean ± SD. Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA with Fisher's LSD post-test (paired data). Data presented as statistically different than respective controls *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001, ****=p<0.0001

Article Figure 8

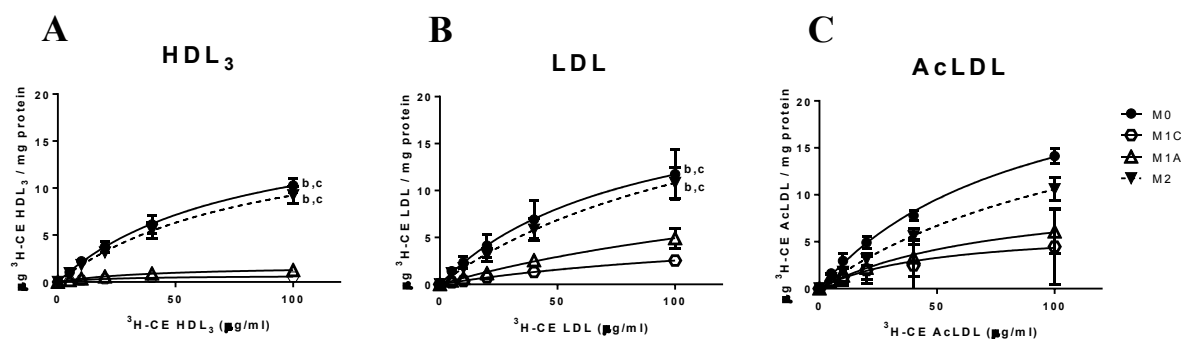


Figure 14. ³H-CE-HDL₃, -LDL and -AcLDL association of THP-1 subtypes.

Differentiated and polarized THP-1 macrophages were incubated with different concentrations of radiolabeled HDL₃ (A), LDL (B) and AcLDL (C) (0-100 µg/mL) without or with unlabeled (cold) lipoproteins (2 mg/mL). Following 4h incubation at 37°C, cells were washed and radioactivity was measured by β-counting to assess lipoprotein association. Results are expressed as mean ± SD (n=4). Statistical analysis was carried out by two-way ANOVA with Fisher's LSD post-test. Data presented as statistically different (p<0.05) than M0 (a), M1C (b) or M1A (c).

Matériel et méthodes supplémentaire

Cette section présentera exclusivement les détails expérimentaux qui n'ont pas été présentés et détaillés dans le manuscrit inclus dans ce mémoire. Ainsi, cette section traitera essentiellement du protocole utilisé pour évaluer le niveau de cholestérol des différents sous-types et également leur susceptibilité à devenir des cellules spumeuses.

Mesure du cholestérol total

Les cellules THP-1 différenciées en macrophages et polarisées en sous-types ont été collectées dans un tampon de lyse (0,2M potassium phosphate, 0,1 M NaCl, 10 mM d'acide cholique, 0,2% de Triton X-100, pH 7,4), suite à une incubation de 24 heures avec ou sans AcLDL (50 µg protéines/mL). La masse totale de cholestérol des échantillons a été quantifiée à l'aide d'une méthode enzymatique (Amplex Red, Invitrogen, #A12216). Les résultats sont rapportés par rapport à la masse de protéines totales, mesuré par la méthode de Lowry, en µg de cholestérol par mg de protéines cellulaires.

Résultats complémentaires

Les résultats qui seront présentés dans cette section proviennent d'expériences préliminaires qui ont servi à établir le protocole pour polariser les THP-1 en sous-types M1 et M2. Ainsi, nous avons évalué si la présence ou l'absence de sérum (*fetal bovine serum*, FBS) durant la polarisation des macrophages pouvait changer le degré de polarisation, ainsi que le niveau d'expression des principaux transporteurs de cholestérol. Nous présentons aussi des résultats supplémentaires portant sur la caractérisation de l'expression du rLDL dans les sous-types ainsi que l'effet de différents traitements modulateurs du LXR sur l'expression génique et protéique de transporteurs du cholestérol et des fonctions d'efflux de cholestérol. En dernier lieu, nous présentons aussi la susceptibilité des sous-types M1 et M2 à accumuler du cholestérol et former des cellules spumeuses suite à une incubation avec des AcLDL. Ces résultats sont considérés complémentaires puisqu'ils ne servent pas directement le propos de l'article, ou qu'ils constituent des résultats préliminaires à être validés ou complétés sous d'autres conditions.

1. Mise au point du modèle de polarisation

1.1. Impact du sérum sur les marqueurs de polarisation

Afin de sélectionner les conditions de culture cellulaire idéales pour induire la polarisation des macrophages, nous avons évalué l'impact de la présence du FBS (10%) pendant la période de polarisation sur l'expression des marqueurs de polarisation, l'expression des transporteurs et l'efflux de cholestérol des sous-types M1 et M2. Le FBS a induit une augmentation de l'expression d'ARNm de l'IL-8 de 2,3 fois ($p < 0,05$), 1,8 fois (n.s.) et 2,4 fois ($p < 0,01$) dans les M1C, M1A et M2, respectivement (Figure 15). De plus, les résultats ont montré une diminution légère de l'expression de DC-SIGN et de MRC-1 dans les M1 et les M2. Par contre, il est important de mentionner que peu importe la présence ou l'absence de FBS, les macrophages ont été polarisés en sous-types représentatifs M1 et M2 (Figure 7), puisque les sous-types M1A et M1C présentaient une expression fortement augmentée de marqueurs pro-inflammatoires IL-6, IL-8 et TNF- α par rapport au macrophage non-polarisé M0 et comparativement au M2. À l'opposé, la polarisation en M2 induit une hausse marquée des

marqueurs associés à ce phénotype, dont DC-SIGN, MRC-1 et PPAR γ relativement au M0, M1C et M1A.

1.2. Impact du sérum sur l'expression des transporteurs de cholestérol et la fonction d'efflux de cholestérol des sous-types de macrophages

Pour ce qui est de l'impact du sérum sur l'expression des protéines de transport de cholestérol, les résultats ont montré qu'en présence de FBS, l'expression protéique d'ABCA1 a été réduite de 29% ($p < 0,05$) dans les M1A (Figure 16A). Par contre, cet effet n'a pas été noté dans les autres sous-types. Les niveaux protéiques de SR-BI n'ont pas été modulés par la présence de FBS dans le milieu de culture pendant la polarisation (Figure 16B). Enfin, la polarisation avec le FBS n'a eu aucun impact sur la capacité d'efflux de cholestérol des différents sous-types vers l'apoA-I, mais a diminué de 10% et 11% l'efflux vers les HDL₃ dans les M1C ($p < 0,05$) et M1A ($p < 0,05$) par rapport aux cellules polarisées sans FBS (Figure 17).

1.3. Caractérisation complémentaire du modèle

Afin de compléter la caractérisation de l'expression des différents transporteurs de cholestérol, les niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine du rLDL ont été évalués dans les sous-types M1 et M2. La polarisation en phénotype M1A a causé une augmentation de l'expression de l'ARNm du rLDL de 2,5 fois ($p < 0,05$) par rapport à l'ensemble des autres sous-types (Figure 18A). Pour ce qui est de l'expression protéique du rLDL, les résultats ont montré que le phénotype M1C exprime 37% moins de rLDL que le M2 (Figure 18B). Par contre, aucune différence d'expression du rLDL entre M1A et M2 n'a été notée (Figure 18B), indiquant que la hausse d'expression d'ARNm dans les M1A n'est pas traduite au niveau protéique.

2. Expression des protéines de transport du cholestérol

Plusieurs protéines liées à la synthèse et au transport du cholestérol, dont l'ABCA1, l'ABCG1 et l'apo E, sont régulées par le récepteur nucléaire LXR. Ce facteur de transcription augmente l'expression de ces protéines afin de limiter l'accumulation de cholestérol cellulaire et de rétablir ainsi un état d'homéostasie. Étant donné l'importance du LXR dans la régulation de l'ABCA1, et le fait que l'expression de ce transporteur variait entre les sous-types M1 et M2,

nous avons évalué la réponse des macrophages à une stimulation de la voie LXR afin de comparer si cette réponse était différente entre les sous-types M1 et M2. Suite à la polarisation, les macrophages THP-1 M1 et M2 ont été incubés pendant une période de 24h avec 300 μ M d'AMP cyclique (AMPc) ou 1 μ M de T0901317 (un agoniste synthétique du LXR) ou 10 μ M d'atorvastatine, un inhibiteur de la synthèse du cholestérol et indirectement des oxystérols. L'expression d'ARNm a été quantifiée par RT-qPCR (Figure 19), tandis que l'expression protéique a été mesurée par immunobuvardage (Figure 20). Nous avons aussi évalué la capacité d'efflux de cholestérol par la méthode radioactive avec du cholestérol tritié (Figure 21).

Suite au traitement avec l'AMPc, seul le sous-type non polarisé (M0) montre une hausse d'expression de l'ARNm d'ABCA1, exprimant 5 fois plus d'ARNm que le contrôle non traité. Le T0901317 a entraîné une hausse d'expression de l'ARNm d'ABCA1 de 15 fois ($p < 0,0001$) et de 6 fois ($p < 0,05$) dans les sous-types M0 et M2, respectivement. Par contre, les deux sous-types M1C et M1A n'ont montré aucune augmentation d'ARNm d'ABCA1 par le même traitement (Figure 19A). L'ARNm de l'ABCG1 est aussi augmenté par le T0901317 de 100 fois dans les M0 ($p < 0,01$), 3 fois dans les M1C, 4 fois dans les M1A et 10 fois dans les M2. Une hausse d'expression de 13 et 2,5 fois d'ABCG1 (ARNm) est aussi observée dans les sous-type M0 et M2 respectivement (Figure 19B). L'atorvastatine a induit une baisse d'ARNm d'ABCA1 qui est importante, bien que non significative, dans tous les sous-types, soit une réduction de 67% dans les M0, de 90% dans les M1C, de 95% dans les M1A et de 66% dans les M2 (Figure 19A). Par contre, aucun des traitements n'a eu d'effet sur l'expression de l'ARNm des autres transporteurs de cholestérol : SR-BI, CD36, SR-AI/II et rLDL (Figure 19C-D-E-F).

Nous avons ensuite mesuré l'expression protéique d'ABCA1 suite aux différents traitements, afin d'établir si les modulations en ARNm se traduisaient sur les niveaux de la protéine. L'AMPc a augmenté l'expression protéique d'ABCA1, induisant une hausse de 2 à 2,5 fois dans tous les sous-types, mais qui est statistiquement significative dans les M1C seulement (Figure 20A). Le traitement avec l'agoniste LXR (T0901317) a induit une hausse d'expression protéique d'ABCA1 dans tous les sous-types de macrophages, soit une augmentation de 6 fois dans les M0 ($p < 0,05$), de 4,5 fois dans les M1C ($p < 0,01$), de 5,5 fois dans les M1A et de 6,5

fois dans les M2 (Figure 20A). À l'opposé, l'atorvastatine a réduit l'expression protéique d'ABCA1 dans tous les sous-types de 20% à 40%, mais seulement de façon significative dans les M1C ($p < 0,05$). L'expression du rLDL est augmentée de 2,5X dans le sous-type M0, de 3,2X et 4,5X dans les M1C ($p < 0,05$) et M1A ($p < 0,001$), respectivement et de 2X dans le M2 ($p < 0,01$) suite à l'incubation avec atorvastatine (Figure 20C). L'expression protéique des récepteurs SR-BI et CD36 n'a pas été influencée de manière notable par les traitements utilisés (Figure 20B et 20D).

Afin d'évaluer si la modulation de l'expression protéique des transporteurs de cholestérol se répercutait également sur leur fonction dans tous les sous-types de macrophages, nous avons mesuré la capacité d'efflux de cholestérol suite aux différents traitements. La stimulation avec T0901317 a induit une hausse d'efflux de cholestérol vers l'apo A-I de 3 fois dans les M0 ($p < 0,01$), de 2,5 fois dans les sous-types M1C ($p < 0,001$) et M1A ($p < 0,01$) et de 3,5 fois dans le phénotype M2 ($p < 0,01$) (Figure 21A). L'atorvastatine a diminué de 50%, 64%, 57% et 50% l'efflux qui est induit par l'apo A-I dans les macrophages M0 ($p < 0,05$), M1C ($p < 0,01$), M1A ($p < 0,05$) et M2 ($p < 0,01$), respectivement. De plus, le T0901317 entraînait une augmentation de l'efflux de cholestérol induit par les HDL₃ dans tous les sous-types, haussant l'efflux de 50% dans les sous types M0 ($p < 0,05$) et M1A ($p < 0,01$) et de 70% dans les M1C ($p < 0,001$) et M2 ($p < 0,01$) (Figure 21B). L'AMPc n'a eu aucun effet sur l'efflux vers l'apo A-I ou vers les HDL₃.

3. Susceptibilité des sous-types M1 et M2 à former des cellules spumeuses suite à l'incubation avec des LDL modifiées

Après avoir observé des différences d'expression des récepteurs *scavengers* SR-BI, CD36 et entre les sous-types, ainsi que des différences dans la capacité d'association des esters de cholestérol (CE) des HDL₃, LDL et AcLDL, nous voulions évaluer la susceptibilité des sous-types à l'accumulation de cholestérol. Nous avons donc mesuré la masse de cholestérol total des différents phénotypes suite à une incubation post-polarisation de 24 heures en absence ou en présence de AcLDL (50 µg de protéines/ml), connus pour induire l'accumulation de cholestérol cellulaire et la formation de cellules spumeuses. Suite à la solubilisation des cellules avec un détergent, nous avons quantifié la masse de cholestérol cellulaire à l'aide d'un

test enzymatique (Amplex Red). Les résultats ont montré que la présence d'AcLDL pendant l'incubation induit une hausse de 2 à 2,5 fois de la masse de cholestérol des différents sous-types. Par contre, aucune différence n'est observée entre la charge de cholestérol des sous-types avec ou sans LDL acétylées (Figure 22).

Résultats additionnels

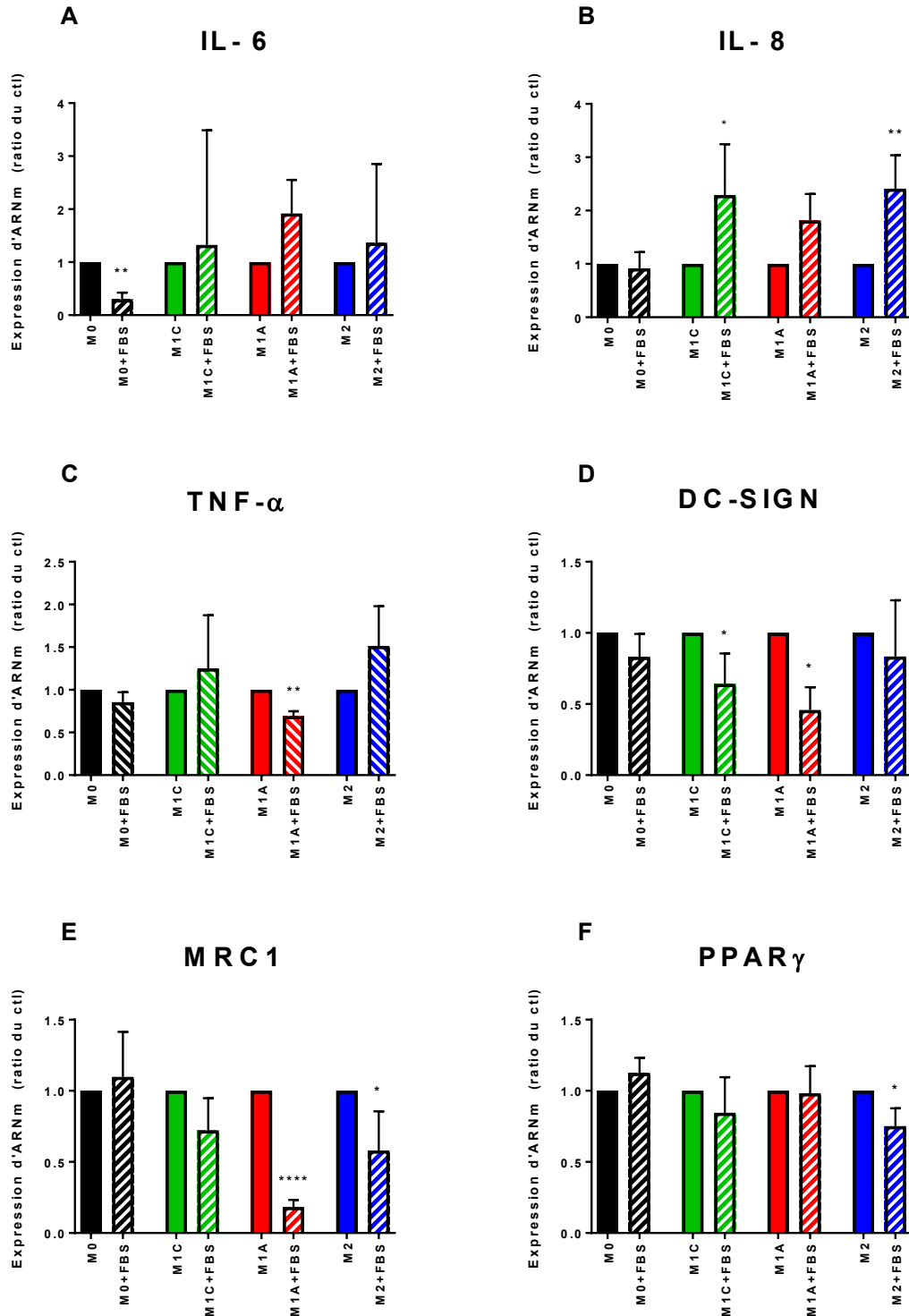


Figure 15. Effets du sérum sur l'expression d'ARNm des marqueurs de différenciation des sous-types de macrophages M0, M1C, M1A et M2.

L'expression de l'ARNm a été mesurée à partir de lysats cellulaires de macrophages THP-1 récoltés immédiatement après leur polarisation en sous-types M1 et M2. L'ADNc a été obtenu par transcription inverse (RT) à partir de l'ARNm purifié, puis a ensuite été utilisé pour analyser l'expression génique par qPCR des marqueurs de macrophages pro-inflammatoires IL-6 (A), IL-8 (B) et TNF- α (C) et anti-inflammatoires DC-SIGN (D), MRC-1 (E) et PPAR γ (F). L'expression des marqueurs de polarisation a été normalisée par rapport à l'expression des gènes rapporteurs ARN 18S et GAPDH, sélectionnés suite à une analyse geNorm. Les résultats sont présentés en ratio des échantillons polarisés avec FBS par rapport aux échantillons polarisés sans FBS du même phénotype (n=5, moyenne \pm écart type). Les différences statistiques ont été évaluées par ANOVA à un facteur (données paires), suivi d'un post-test de Fisher. Les données présentées sont statistiquement différentes de leur contrôle respectif selon la force statistique suivante : * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$.

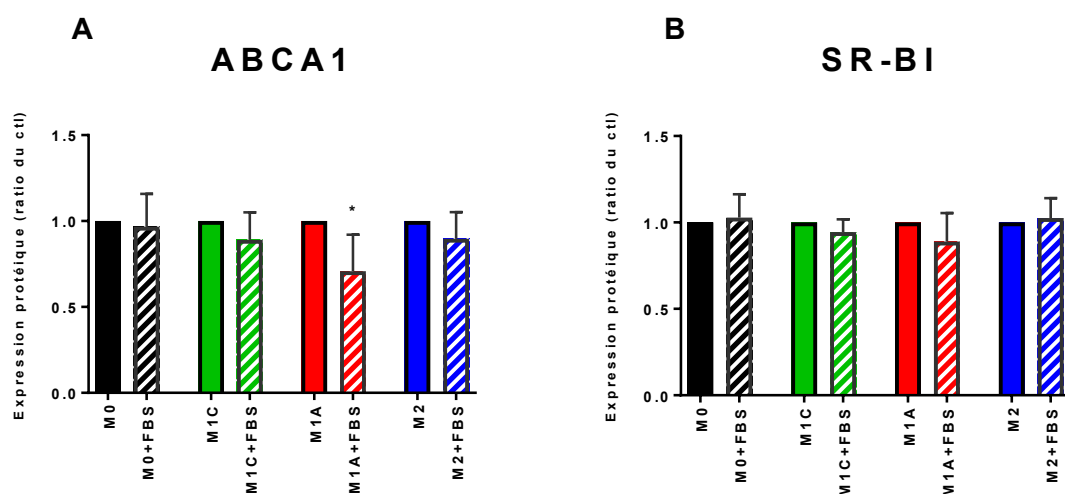


Figure 16. Effets du sérum sur l'expression protéique des transporteurs de cholestérol ABCA1 et SR-BI des sous-types de macrophages M0, M1C, M1A et M2.

Les cellules THP-1 ont été lysées suite à leur polarisation avec du milieu de culture contenant ou non du FBS. Par la suite, l'expression protéique d'ABCA1 (A) et de SR-BI (B) a été évaluée par immunobuvardage suite à une migration sur gel de polyacrylamide. L'expression protéique a été normalisée par rapport à l'expression de la protéine β -actine. Les résultats sont présentés en ratio des phénotypes polarisés avec FBS par rapport aux mêmes phénotypes polarisé sans FBS (n=6-7, moyenne \pm écart type). Les différences statistiques ont été évaluées par test de t de Student avec données paires. Les données présentées sont statistiquement différentes de leur contrôle respectif selon la force statistique suivante : * = $p < 0,05$.

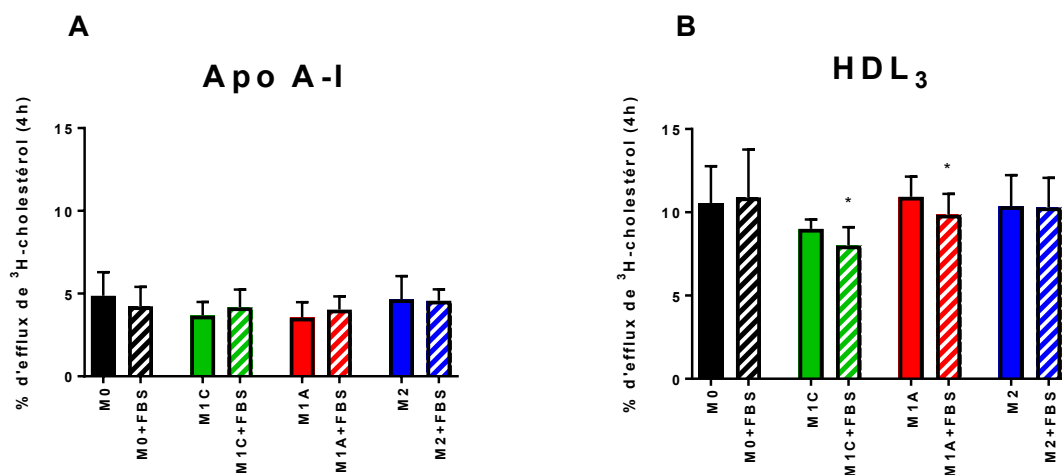


Figure 17. Effets du sérum sur la capacité d'efflux des macrophages M0, M1C, M1A et M2 de lignée THP-1.

Suite à la polarisation des macrophages en sous-types, les cellules ont été incubées 24h en présence de 2 $\mu\text{Ci/ml}$ de cholestérol tritié (^3H), suivi d'une période d'équilibration de 2h. Les cellules chargées en cholestérol radioactif ont ensuite été incubées avec 10 $\mu\text{g/ml}$ d'apolipoprotéine A-I (**A**) ou 100 μg de protéines/ml de HDL₃ (**B**) pendant une période de 4h, suivi d'une mesure de la radioactivité du milieu de culture et de la radioactivité dans les cellules à l'aide d'un compteur bêta. Les résultats sont présentés en % d'efflux de cholestérol, correspondant au compte de radioactivité en cpm (comptes par minute) dans le milieu de culture après l'efflux, divisés par la radioactivité totale du puits (cellules + milieu) (n=4, moyenne \pm écart type). Les différences statistiques ont été calculées par ANOVA à un facteur avec données paires, suivi d'un post-test de Fisher. Les données présentées sont statistiquement différentes de leur contrôle respectif selon la force statistique suivante : * = p < 0,05.

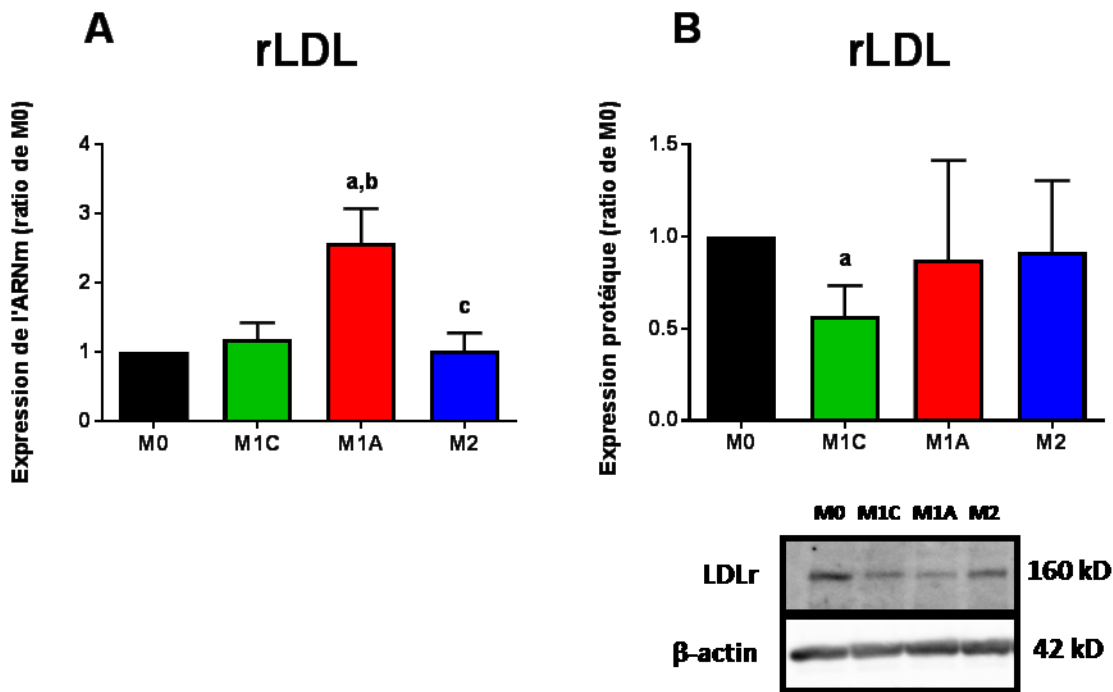


Figure 18. Expression d'ARNm et protéique du récepteur des LDL (rLDL) dans les sous-types de macrophages M0, M1C, M1A et M2 de lignée THP-1.

(A) L'expression de l'ARNm a été mesurée à partir de lysats cellulaires de macrophages THP-1 récoltés immédiatement après leur polarisation en sous-types M0, M1C, M1A et M2. L'ADNc obtenu par RT à partir de l'ARNm purifié a ensuite été utilisé pour analyser l'expression génique par qPCR du récepteur des LDL. (B) À partir de lysats cellulaires collectés après la polarisation des macrophages THP-1 en sous-types M0, M1C, M1A et M12, l'expression protéique du rLDL a été mesurée par immunobuvardage suite à une migration des lysats sur gel de polyacrylamide. Les résultats sont présentés en ratio du phénotype M0 (n=4-5, moyenne \pm écart type). Les différences statistiques ont été calculées par ANOVA à un facteur avec données paires, suivi d'un post-test de Fisher. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative comparée au sous-type M0 : a, M1C : b et M1A : c.

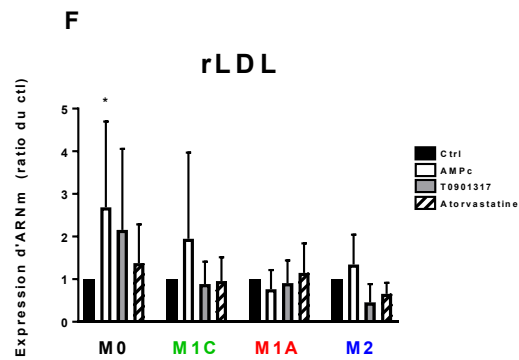
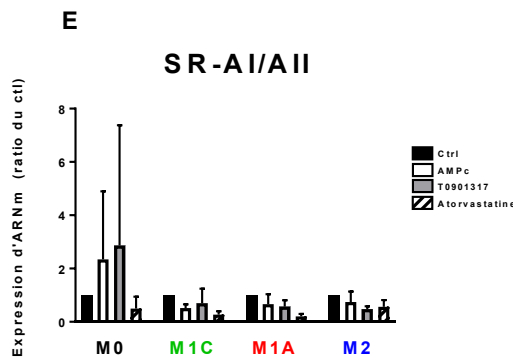
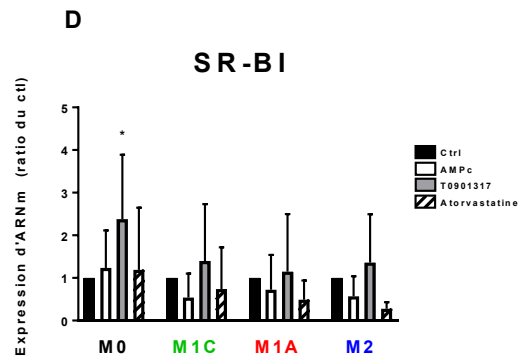
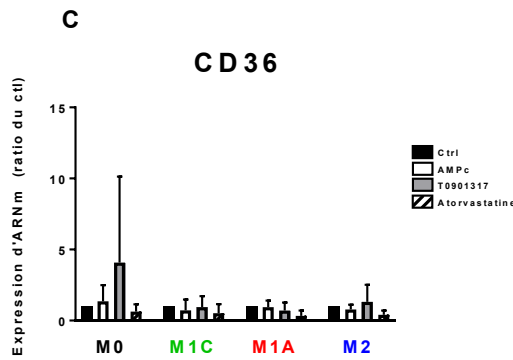
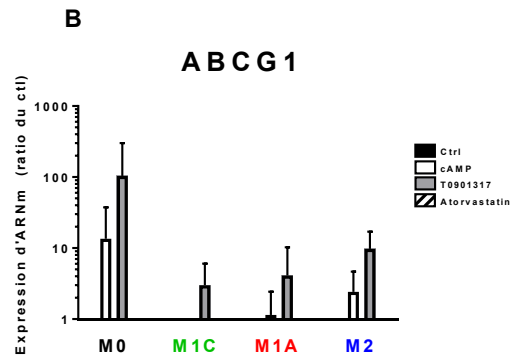
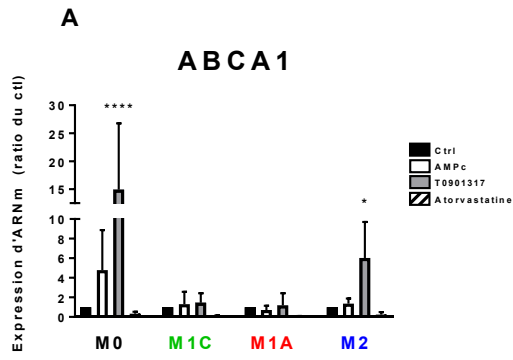


Figure 19. Effets de l'AMPc, de l'agoniste LXR T0901317 et de l'atorvastatine sur l'expression de l'ARNm des gènes impliqués dans le transport du cholestérol dans les sous-types de macrophages M0, M1C, M1A et M2.

Les cellules THP-1 polarisées en M1 et M2 ont été incubées pendant 24h en absence ou avec de l'AMPc (300 μ M), du T0901317 (1 μ M) ou de l'atorvastatine (10 μ M). Suite à la lyse et la purification, les niveaux d'ARNm des transporteurs ABCA1 (**A**) et ABCG1 (**B**), des récepteurs CD36 (**C**), SR-BI (**D**), et SR-AI/AII (**E**), et du rLDL (**F**) ont été mesurés par RT-qPCR. L'expression des marqueurs de polarisation a été normalisée par rapport à l'expression des gènes rapporteurs HBS1L et RPL19, sélectionnés suite à une analyse geNorm. Les résultats sont présentés selon un ratio des échantillons ayant été exposés à un traitement par rapport à l'échantillon contrôle du même phénotype (n=3-4, moyenne \pm écart type). Les différences statistiques ont été évaluées par ANOVA à un facteur (données non-pairées), suivi d'un post-test de Fisher. Les données présentées sont statistiquement différentes de leur contrôle respectif selon la force statistique suivante : * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$, **** = $p < 0,0001$.

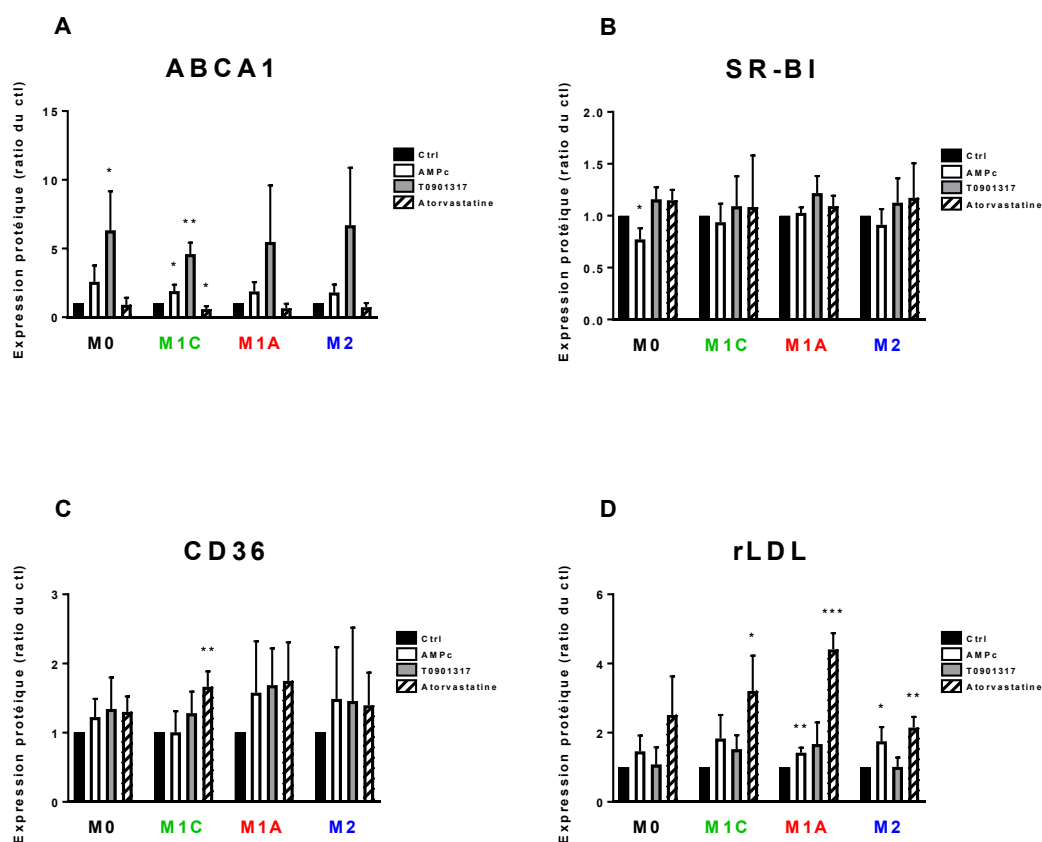


Figure 20. Effets de l'AMPc, de l'agoniste LXR T0901317 et de l'atorvastatine sur l'expression protéique des transporteurs de cholestérol ABCA1, SR-BI, CD36, et rLDL dans les phénotypes M0, M1C, M1A et M2.

Des cellules THP-1 polarisées en M1 et M2 ont été incubées pendant 24h en absence ou avec de l'AMPc (300 μ M), du T0901317 (1 μ M) ou de l'atorvastatine (10 μ M). Suite à la lyse cellulaire, l'expression protéique d'ABCA1 (A), de SR-BI (B), de CD36 (C) et du rLDL (D) a été évaluée par immunobuvardage et présentée en ratio du contrôle non-traité selon le sous-type, normalisée sur l'expression protéique de la β -actine. Les différences statistiques ont été calculées par ANOVA à un facteur avec données paires, suivi d'un post-test de Fisher. Les résultats sont présentés selon un ratio des échantillons avec traitement par rapport à l'échantillon contrôle du même phénotype (n=3-4, moyenne \pm écart type). Les différences statistiques ont été évaluées par ANOVA à un facteur avec données paires, suivi d'un post-test de Fisher. Les données présentées sont statistiquement différentes de leur contrôle respectif selon la force statistique suivante : * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$.

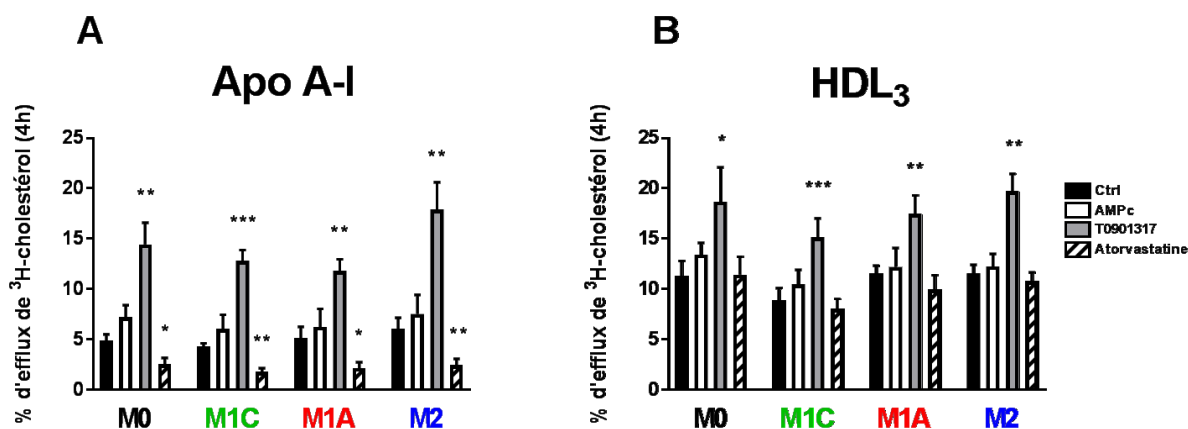


Figure 21. Effets de l'AMPc, de l'agoniste LXR T0901317 et de l'atorvastatine sur l'efflux de cholestérol médié par l'apo A-I ou les HDL₃ par les sous-types de macrophages M0, M1C, M1A et M2.

Après la polarisation de macrophages THP-1, les cellules ont été incubées 24h sans ou avec de l'AMPc (300 μ M), du T0901317 (1 μ M), ou de l'atorvastatine (10 μ M), en plus de 2 μ Ci/mL de ³H-cholestérol, suivi d'une période d'équilibration de 2h. Subséquemment, 10 μ g de protéines/ml d'apolipoprotéine A-I (A) ou 100 μ g de protéines/ml de HDL₃ (B) ont été ajoutés au milieu, et les cellules ont été incubées pour une période additionnelle de 4h. Les résultats sont présentés en % d'efflux de cholestérol, correspondant à la radioactivité dans le milieu de culture après l'efflux, divisé par la radioactivité totale du système (cellules + milieu) (n=4, moyenne \pm écart type). Les différences statistiques ont été calculées par ANOVA à un facteur avec données paires, suivi d'un post-test de Fisher. Les données présentées sont statistiquement différentes de leur contrôle respectif selon la force statistique suivante : * = p < 0.05, ** = p < 0.01, *** = p < 0.001.

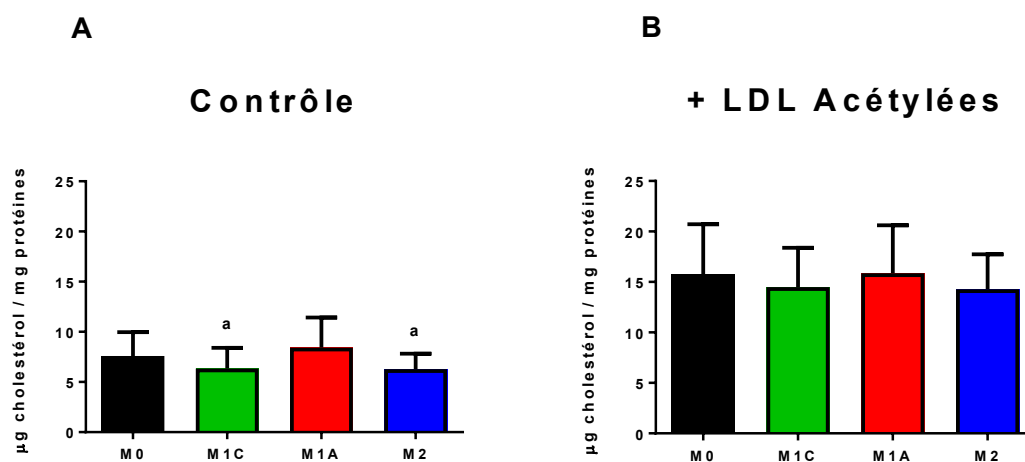


Figure 22. Concentration cellulaire de cholestérol total des sous-types de macrophages M0, M1C, M1A et M2 en présence ou en absence de AcLDL.

La mesure de cholestérol totale fût effectuée à partir de lysats cellulaires obtenus de macrophages THP-1 polarisés, puis incubés 24h additionnelles en absence (A) ou en présence (B) de 50 µg de protéines/mL d'AcLDL. La masse de cholestérol totale a été mesurée à l'aide d'une méthode enzymatique (Amplex Red) et a été rapportée sur la masse de protéines (n=5, moyenne ± écart type). Les différences statistiques ont été calculées par un ANOVA à un facteur avec données paires, suivi d'un post-test de Fisher. Les données présentées montrent une différence statistiquement significative comparée au sous-type M0 : a, M1C : b, M1A : c

Discussion

Les macrophages sont des cellules qui proviennent de la différenciation des monocytes par l'action de différents signaux qui entraînent un changement vers un type cellulaire morphologiquement et fonctionnellement distinct. De plus, les macrophages peuvent être polarisés vers différents phénotypes par des stimuli additionnels, ce qui leur permet d'assurer plusieurs rôles dans la promotion et la résorption de la réponse inflammatoire. Les signaux induisant la polarisation sont multiples et incluent plusieurs cytokines pro- et anti-inflammatoires, des lipides et lipoprotéines modifiées, des molécules d'origine bactérienne et virale, des fragments cellulaires et plusieurs autres. Par ailleurs, les fonctions de transport du cholestérol des macrophages ont aussi un rôle important dans la récupération du cholestérol des lipoprotéines et l'export du cholestérol hors des cellules via l'efflux. Puisque les informations concernant les mécanismes d'entrée et de sortie du cholestérol dans les sous-types de macrophages sont limitées, nous avons voulu comparer certains aspects des fonctions de transport du cholestérol entre les M1 et M2 afin d'identifier si l'un des phénotypes présentait un déséquilibre entre l'influx et l'efflux de cholestérol pouvant contribuer à l'accumulation de cholestérol et à la formation de cellules spumeuses. À cet effet, nous avons d'abord évalué l'impact du sérum sur la polarisation des macrophages, ainsi que sur l'expression des protéines de transport des lipoprotéines, et sur la capacité d'efflux de cholestérol. Par la suite, nous avons procédé à la caractérisation des sous-types M1C et M1A, des sous-types de macrophages représentant différents niveaux d'inflammation, ainsi que le phénotype M2 anti-inflammatoire, sur l'expression des ARNm et protéique des transporteurs de cholestérol et des récepteurs de lipoprotéines. Nous avons aussi mesuré la capacité d'efflux de cholestérol vers l'apo A-I et les HDL₃ des sous-types de macrophages, ainsi que l'association des esters de cholestérol des HDL, LDL et AcLDL avec ces sous-types. En dernier lieu, nous avons évalué l'accumulation de cholestérol dans les M1C, M1A et M2 suite à l'incubation avec des AcLDL, afin d'établir si un phénotype était plus susceptible d'accumuler du cholestérol.

Impact du sérum sur le transport du cholestérol des sous-types de macrophages

D'abord, nous avons évalué l'impact du sérum, un constituant important de la culture cellulaire représenté par le FBS, sur la polarisation et les fonctions de transport de cholestérol des différents sous-types de macrophages de la lignée THP-1, puisque la présence de FBS dans le milieu de polarisation pourrait avoir des effets modulateurs sur ces fonctions. En effet, il a été montré que le FBS pouvait contenir des endotoxines, dont certains produits bactériens comme le LPS, connus pour induire des changements phénotypiques des macrophages. Le groupe de Kirikae [230] a rapporté que jusqu'à 23% des lots de FBS vendus comme faible en endotoxines pouvaient contenir plus de 1 ng/ml de LPS [230]. Comme le phénotype M1C est polarisé avec aussi peu que 10 pg/ml de LPS, on peut donc penser que le FBS utilisé dans notre étude aurait pu être pro-inflammatoire, bien que ce dernier fût caractérisé et identifié comme étant faible en endotoxines. Toutefois, les résultats présentés à la figure 15 montrent que la présence du FBS entraîne des effets négligeables sur l'expression de l'ARNm des différents marqueurs de la polarisation des macrophages. Par contre, le FBS n'a pas modifié le phénotype induit par les stimuli utilisés. En effet, en présence ou absence de FBS, le LPS et l'IFN γ ont polarisé les macrophages en phénotype M1, caractérisé par une expression plus forte des marqueurs inflammatoires IL-6, IL-8 et TNF- α que le phénotype M2. À l'opposé, la polarisation avec IL-4 a induit une polarisation en sous-type M2, défini par une hausse d'expression de DC-SIGN, MRC-1 et PPAR γ par rapport aux M1C et M1A (Figure 7).

D'autre part, puisque le FBS constitue une source de cholestérol mesurable pour les cellules, son absence pourrait moduler l'expression des transporteurs de cholestérol et entraîner des variations additionnelles de leur expression, pouvant être problématiques dans une étude cherchant à caractériser les mécanismes de transport du cholestérol. Nous avons donc évalué l'impact du FBS pendant la polarisation sur l'expression de l'ABCA1 et du SR-BI, ainsi que l'influence du FBS sur les fonctions d'efflux de cholestérol étant donné l'implication de ces deux transporteurs dans ce mécanisme. À l'exception d'une baisse de 29% dans les M1A (Figure 16), l'expression protéique d'ABCA1 et de SR-BI n'a pas été modifiée par la présence de FBS. L'absence d'effet significatif sur l'expression de ces transporteurs s'est également transposée en une capacité d'efflux de cholestérol inchangée vers l'apo A-I et les HDL₃, reconnue pour être dépendant d'ABCA1 et de SR-BI, respectivement. Par ailleurs, beaucoup

d'études *in vitro* sur les différents phénotypes de macrophages utilisent du FBS lors de la polarisation. Le FBS contient aussi différents facteurs de croissance et signaux qui favorisent la prolifération et la survie des cellules. Ainsi, comme les effets du FBS sur l'expression des protéines du transport du cholestérol sont négligeables, et que les phénotypes M1 et M2 sont bien définis en présence ou absence de FBS, nous avons poursuivi la caractérisation du modèle THP-1 en utilisant du milieu de culture avec FBS lors de la polarisation.

Comparaison de la polarisation des sous-types inflammatoires M1C et M1A

Dans le cadre de notre étude, nous avons procédé à la caractérisation de deux sous-types de macrophages pro-inflammatoires, soit les M1C et les M1A, afin d'obtenir des phénotypes de macrophages représentant un état inflammatoire moins sévère mais chronique (M1C), ou un état inflammatoire aigu (M1A). Le premier a été polarisé par une concentration de LPS plus faible (10 pg/mL) sur une période d'incubation de 24h, tandis que le second sous-type est polarisé par incubation avec 1 µg/mL de LPS sur une période de 6h. Nous avons d'abord mesuré l'expression des marqueurs inflammatoires afin de valider si les deux phénotypes différaient dans leur niveau de réponse inflammatoire. La polarisation en M1C et M1A a induit une hausse d'expression de l'ARNm des marqueurs inflammatoires (IL-6, IL-8 et TNF- α), indiquant que les deux concentrations de LPS induisent bien la polarisation en phénotype M1 (Figure 7). Bien que l'expression de certains marqueurs d'ARNm utilisé pour valider la polarisation en sous-types M1C et M1A, dont l'IL-6 et l'IL-8, présente des différences d'expression non statistiquement significatives entre les M0, M1 et M2, une forte tendance à la hausse de l'expression de ces marqueurs est observée. De plus, la hausse d'expression de ces marqueurs est observée sur chacune des mesures comparatives (n=5), certaines différences entre les sous-types étant beaucoup plus prononcées que d'autres, mais montrant toujours une expression beaucoup plus forte des marqueurs inflammatoires dans les M1 (M1C et M1A). Des mesures d'expression additionnelles de ces marqueurs entre les sous-types de macrophages THP-1 viendraient renforcer l'analyse statistique comparatives et montreraient alors des différences significatives entre sous-types. Par ailleurs, nos résultats ont montré que les M1A correspondent à un sous-type de macrophage plus inflammatoire que les M1C, puisque l'expression de l'ARNm des marqueurs associés à l'inflammation, est plus élevée dans les premiers (M1A) même si les différences ne sont pas statistiquement significatives.

Puisque les deux sous-types représentent différents niveaux d'inflammation qui pourraient être induits au niveau de la plaque et favoriser le développement de l'athérosclérose, nous avons donc poursuivi la caractérisation du modèle THP-1 en incluant les deux sous-types M1C et M1A, afin de bien caractériser le phénotype M1 et d'évaluer si ces niveaux d'inflammation différents pourraient influencer les mécanismes du transport de cholestérol. Afin de s'assurer de la polarisation des sous-types de macrophages, l'expression de certains marqueurs devrait être confirmée par d'autres méthodes, soit par la mesure de marqueurs sécrétés comme l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α pour les sous-types M1C et M1A, mais aussi par la mesure d'autres marqueurs pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et l'IL-12, pour valider la polarisation en sous-types M1, ou l'IL-10 et le TGF- β pour le sous-type M2. Les niveaux d'expressions protéiques de ces marqueurs peuvent être mesurés par ELISA. D'autre part, l'expression de marqueurs exprimés à la surface cellulaire, comme CD80 et CD86 pour les M1, DC-SIGN et MRC-1 pour les M2, pourrait être validée par cytométrie en flux pour confirmer la polarisation des sous-types.

Par ailleurs, malgré que Carnevale et ses collègues [231] aient montré la présence de LPS dans les plaques athérosclérotiques de patients ayant subi une endartérectomie, le LPS bactérien utilisé pour polariser les macrophages en sous-type M1 *in vitro* n'est probablement pas le stimuli responsable de la polarisation de ce sous-type dans la majorité des patients développant l'athérosclérose. L'utilisation d'autres stimuli plus physiologiques pour la différenciation des macrophages en sous-types viendrait appuyer et renforcer nos résultats afin de confirmer le rôle des sous-populations de macrophages dans le transport du cholestérol et la formation de la plaque d'athérosclérose. Martinez et Gordon [61] ont rapporté certaines études ayant montré que l'exposition de macrophages au *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), une glycoprotéine produite par les macrophages et d'autres leucocytes, entraîne une hausse de la production de cytokine pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α de façon similaire mais moins prononcée que le LPS.

Expression et régulation différentielle d'ABCA1 dans les sous-types de macrophages

Malgré la présence de multiples phénotypes de macrophages dans la plaque d'athérosclérose et l'importance des fonctions de capture de lipoprotéines et d'efflux de cholestérol par ces cellules, peu d'informations ont été rapportées quant au rôle des différents phénotypes

relativement à la gestion du cholestérol au niveau de la plaque. Nous avons voulu déterminer si l'un des deux phénotypes pro-inflammatoires M1 ou anti-inflammatoire M2 était mieux adapté pour la gestion de cholestérol au niveau de la plaque. À cet effet, nous avons caractérisé l'expression des protéines responsables du transport du cholestérol cellulaire, principalement les récepteurs impliqués dans la capture de lipoprotéines et ceux connus pour participer à l'efflux de cholestérol cellulaire, dont l'ABCA1. Comme la hausse d'expression de la protéine ABCA1 a été associée à une augmentation de l'efflux induit par l'apo A-I [232], un sous-type exprimant moins d'ABCA1 pourrait donc avoir une capacité d'efflux de cholestérol réduite par rapport aux autres phénotypes de macrophages. Les mesures d'ARNm et d'expression protéique, par RT-pCR et immunobuvardage respectivement, ont montré que les deux sous-types pro-inflammatoires M1C et M1A exprimaient plus d'ABCA1 que le sous-type M2 immédiatement après la polarisation. De plus, l'expression d'ABCA1 a aussi été mesurée 24h après la période de polarisation, afin de valider si l'incubation additionnelle lors du chargement en cholestérol radioactif pour la mesure d'efflux pouvait influencer l'expression de ce récepteur. Les niveaux de la protéine et de l'ARNm d'ABCA1 étaient toujours plus élevés dans les sous-types M1, suite au temps d'incubation prolongé. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'une ou plusieurs voies impliquées dans la régulation du récepteur ABCA1 sont influencées de manière opposée par les stimuli pro- et anti-inflammatoires responsables de la polarisation des sous-types de macrophages.

Jusqu'à présent peu d'études ont fait la comparaison directe de l'expression d'ABCA1 entre les M1 et les M2 et ces études sont contradictoires. Bien que certaines études ont montré que les macrophages M1 (THP et macrophages péritonéaux de souris) exprimaient moins d'ABCA1 comparativement au sous-type M2 [224] [233], une étude a montré, similairement à nos résultats, que l'expression de l'ARNm d'ABCA1 était plus élevée dans les sous-types M1 que dans les M2, dans un modèle de macrophages différenciés de monocytes humains [77]. Cette étude a démontré que la différence d'expression d'ABCA1 entre les sous-types de macrophages est causée par une régulation distincte des voies transcriptionnelles LXR α et PPAR γ selon le phénotype. Ainsi, les macrophages M2 présentaient une activité de PPAR γ plus forte que les macrophages non polarisés, mais la polarisation en M2 réduisait l'expression de LXR α et des protéines impliquées dans l'efflux de cholestérol, dont ABCA1. Nos résultats

seraient consistants avec ceux obtenus par Chinetti-Gbaguidi présentés ci-haut [77], puisque la polarisation des cellules THP-1 en phénotype M2 est caractérisée par une hausse de l'ARNm PPAR γ , mais a aussi diminué l'expression d'ABCA1 par rapport aux phénotypes M0 et M1 (Figure 3). La mesure de l'expression et de l'activité des facteurs de transcription LXR α et PPAR γ , nous permettrait d'évaluer l'implication de ces récepteurs nucléaires dans la régulation d'ABCA1 des phénotypes de macrophages THP-1. L'activité promotrice des récepteurs nucléaires PPAR et LXR dans les sous-types de macrophages pourrait alors être déterminée à l'aide d'un test de luciférase ou un test d'immunoprécipitation de chromatine (*chromatin immunoprecipitation*, CHIP) pour démontrer si le promoteur d'ABCA1 est plus activé par les facteurs de transcription LXR et PPAR dans les sous-types M1 ou M2.

En plus d'être régulé transcriptionnellement par le LXR et PPAR, le transporteur ABCA1 est aussi régulé post-transcriptionnellement par des miARN qui vont dégrader ou déstabiliser l'ARNm d'ABCA1, réduisant ultimement les niveaux de la protéine. Il a été démontré que le miR-33 pouvait réduire l'expression d'ABCA1 dans les macrophages murins et humains [161]. Une étude de Lai et ses collègues [183] a révélé que l'activation du TLR4 par le LPS réduit l'expression de miR-33 dans des macrophages péritonéaux de souris, suivi d'une hausse d'expression de l'ARNm d'ABCA1. Une diminution de miR-33 dans les sous-types M1C et M1A dans notre modèle THP-1 pourrait donc expliquer la hausse de l'expression d'ABCA1 de ces phénotypes par rapport au M2. Afin d'établir le rôle de miR-33 et des autres miARN sur la régulation d'ABCA1 dans les différents phénotypes de macrophages, il faudrait procéder à la quantification de ces miARN dans les sous-types M1 et M2 suivant la polarisation des macrophages. Cette potentielle implication de miR-33 dans notre modèle pourrait permettre d'expliquer pourquoi nos résultats ne concordent pas avec les études sur les effets des stimuli pro et anti-inflammatoires sur l'expression d'ABCA1 qui montrent une régulation à la baisse de ce récepteur dans les sous-types M1. Toutefois, les résultats que nous avons obtenus sont à l'opposé, ce qui pourrait indiquer qu'une autre voie de régulation a pris le dessus dans le contrôle de l'expression d'ABCA1 de notre modèle THP-1. Littlefield et ses collègues [224] ont montré la baisse d'expression d'ARNm et protéique d'ABCA1 dans les sous-types M1 de lignée THP-1, mais il est possible que les différences entre nos résultats et

ceux de Littlefield soient occasionnées par la différence entre les protocoles de différenciation et de polarisation.

Réponse des sous-types M1 et M2 à la stimulation de la voie du récepteur nucléaire LXR

Nos résultats ont montré que l'expression d'ABCA1 (ARNm) est augmentée dans les sous-types M0 et M2 suite à l'incubation avec le T0901317, un agoniste des LXR (Figure 19A). Ces résultats pourraient indiquer que la voie LXR régule l'expression d'ABCA1 dans les M2, mais que la voie du LXR ne serait pas inductible dans les M1, puisque l'ARNm d'ABCA1 n'était pas augmenté dans les M1C et M1A suite au traitement. Cependant, comme l'expression d'ABCA1 est déjà plus élevée dans les sous-types M1C et M1A, il est possible que l'induction de LXR par le T0901317 soit plus difficilement observable dans les M1 que dans les phénotypes M0 et M2. De plus, comme la mesure de l'expression de l'ARNm d'ABCA1 a été effectuée à partir de lysats cellulaires obtenus 24h après le traitement au T0901317, il est possible que les différences d'expression d'ARNm entre les sous-types soit un artefact, puisque la mesure d'expression protéique par western blot nous montre une induction d'ABCA1 dans tous les sous-types par le T0901317 (Figure 20A). Par ailleurs, le T0901317 induit aussi une hausse de l'efflux de cholestérol vers l'apo A-I et les HDL₃ dans tous les sous-types (Figure 21A et 21B), ce qui correspond bien à l'augmentation protéique d'ABCA1. D'autre part, l'atorvastatine a réduit l'expression d'ARNm et protéique d'ABCA1 (Figure 19A et 20A), en plus de réduire l'efflux de cholestérol vers l'apo A-I des sous-types M1C, M1A et M2 (Figure 21A). À l'opposé du T0901317, il a été montré que l'atorvastatine pouvait aussi moduler l'expression du LXR, entraînant plutôt une baisse de son expression et des cibles du LXR, dont ABCA1 [234]. L'ensemble de ces résultats indiquerait que les sous-types de macrophages répondent de façon similaire à l'induction ou l'inhibition des voies de régulation dépendantes de LXR.

Différences dans la capacité d'efflux de cholestérol des sous-types de macrophages

Certaines études ont rapporté qu'une augmentation de l'activité du PPAR γ , caractéristique du phénotype M2, est associée à une hausse d'expression d'ABCA1 et de l'efflux de cholestérol vers l'apo A-I et les HDL [158, 223]. Toutefois, peu d'études ont jusqu'à présent comparé les capacités d'efflux des sous-types de macrophages. Une étude par Oh et ses collègues [229] a

montré que la capacité d'efflux vers l'apo A-I et les HDL ne différait pas entre les M1 et les M2. Par contre, cette étude a été effectuée à partir de macrophages issus d'individus diabétiques, ce qui pourrait influencer la réponse des macrophages. Étant donné ce manque de connaissance, il était donc important de mieux étudier cet aspect du métabolisme du cholestérol des sous-types M1 et M2 à partir d'un modèle représentatif de macrophages, comme les THP-1.

Nos résultats ont montré que l'expression d'ARNm et protéique du transporteur ABCA1 était réduite dans le sous-type M2 par rapport au M1C et M1A, ce qui indiquerait une capacité d'efflux de cholestérol réduite dans le sous-type M2. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré l'efflux de cholestérol vers l'apo A-I humaine, dépendant d'ABCA1. De façon surprenante, l'efflux induit par l'apolipoprotéine A-I était plus élevée dans le phénotype M2 que pour les sous-types inflammatoires M1C et M1A, à l'opposé de ce qui était attendu selon l'expression d'ABCA1. Cette dichotomie entre les niveaux d'ABCA1 et sa fonction dans l'efflux pourrait indiquer que l'ABCA1 des sous-types M1 du modèle THP-1 n'est pas disponible pour effectuer l'export du cholestérol cellulaire. Par exemple, l'ABCA1 pourrait être occupé par d'autres fonctions de transport et être indisponible pour l'efflux de cholestérol. À cet effet, Thompson et ses collègues [235] ont rapporté que l'ABCA1 pouvait aussi contribuer à l'efflux du LPS hors des macrophages. Il se pourrait donc que, dans les sous-types de macrophage M1, le LPS induise la production d'ABCA1 afin de diminuer l'inflammation de la cellule par la sortie du LPS. Pour vérifier si le LPS peut réduire la capacité d'efflux dépendant d'ABCA1 dans les sous-types M1C et M1A, il faudrait d'abord valider la présence de LPS dans les phénotypes M1 au moment de l'efflux pour confirmer si le LPS est encore dans les cellules. Ceci peut être effectué à l'aide de LPS radioactif ou par microscopie confocale avec du LPS associé à des molécules fluorescentes. Par la suite, des essais de compétition avec des doses croissantes de LPS et l'apo A-I pourraient nous indiquer si le LPS présent dans les sous-types M1 peut réduire l'efflux de cholestérol effectué par ABCA1.

Des différences de localisation cellulaire d'ABCA1 pourraient aussi expliquer les écarts d'efflux entre les sous-types M1 et M2, malgré l'expression plus élevée de ce transporteur dans les M2, puisque l'export du cholestérol vers l'apo A-I est induit par l'interaction à la

membrane entre ABCA1 et l'apo A-I présente dans le milieu extracellulaire. Il serait donc important de vérifier si de telles différences de localisation existent entre les sous-types par l'utilisation de la microscopie confocale afin de détecter et mesurer l'ABCA1 de la surface cellulaire dans les différents sous-types. La mesure d'expression protéique d'ABCA1 des différentes fractions cellulaires par immunobuvardage permettrait aussi d'évaluer les niveaux d'expression membranaire du transporteur. Une baisse d'expression d'ABCA1 à la membrane des phénotypes M1 pourrait expliquer la baisse d'efflux par rapport au M2, malgré une expression totale plus forte d'ABCA1, puisque seul l'ABCA1 membranaire peut interagir avec les accepteurs extracellulaires et favoriser l'efflux.

Les niveaux de sécrétion de l'apolipoprotéine E pourraient également expliquer l'efflux de cholestérol plus élevé dans les M2 malgré l'expression plus faible d'ABCA1 que dans les M1. En effet, il a été montré que l'apo E peut induire l'efflux de cholestérol par le transporteur ABCA1 [175]. De plus, il a été démontré que le LPS induit une réduction de l'expression d'apo E [236], ce qui suggère une sécrétion plus faible d'apo E dans les M1. Ainsi, l'expression et la sécrétion plus élevée de cette apolipoprotéine par les M2 pourraient induire plus d'efflux de cholestérol dans ces sous-types, et ce malgré une baisse protéique d'ABCA1. Afin d'évaluer l'implication de l'apo E dans les sous-types de macrophages, nous avons mesuré l'expression génique de l'apo E dans les macrophages THP-1, ce qui nous a révélé que les niveaux d'ARNm de l'apo E étaient similaires dans les sous types M1 et M2. Par contre, la mesure d'apo E sécrétée dans le milieu de culture par ELISA a montré que le phénotype M2 sécrète plus de cette apolipoprotéine que les sous-types M1C et M1A. La sécrétion plus élevée d'apo E dans les M2 vient donc appuyer l'hypothèse de l'implication de l'apo E sur l'efflux plus élevé dans ce sous-type malgré la baisse d'ABCA1. Dans le but de confirmer le rôle de l'apo E dans l'efflux des sous-types de macrophages, nous devrions aussi mesurer l'expression protéique cellulaire de l'apo E, pour déterminer si la hausse d'expression de l'apo E sécrétée provient d'une hausse d'expression protéique globale de l'apo E ou d'un autre mécanisme augmentant la sécrétion. Ces résultats confirmeraient ou infirmeraient alors si le phénotype M2 exprime plus de cette apolipoprotéine que les autres sous-types, et que l'apo E des M2 peut ainsi induire plus d'efflux de ce phénotype nonobstant l'expression réduite d'ABCA1 dans les M2. De plus, l'utilisation de modèles de macrophages apo E KO ou de siRNA pour

abolir ou interférer avec l'expression de cette apolipoprotéine pourrait nous renseigner sur son implication dans l'efflux des sous-types de macrophages. Une réduction plus importante de l'efflux dans les M2 suite à l'inhibition de l'apo E pourrait être indicatrice de l'implication de cette apolipoprotéine dans la capacité d'efflux du phénotype M2. Toutefois, l'apo E est régulée comme le récepteur ABCA1 par la voie du récepteur nucléaire LXR. Puisque notre modèle de macrophage M2 issu de lignée THP-1 exprime moins d'ABCA1, il serait paradoxal que ce sous-type exprime plus fortement l'apo E.

L'efflux de cholestérol vers les HDL₃ était aussi plus élevé dans les M2 par rapport au sous-type M1C, mais sans différence significative entre M1A et M2. Cette diminution d'efflux du phénotype M1C coïncide avec l'expression réduite du SR-BI dans les sous-types M1, puisque le récepteur SR-BI favorise l'efflux vers les HDL. L'absence de différence entre les M1A et les M2 au niveau de la capacité d'efflux vers les HDL₃ pourrait être expliquée par l'implication d'autres protéines membranaires. Comme le SR-BI participe à l'efflux vers les HDL, une hausse d'expression de ce récepteur dans les M1A et M2 expliquerait un efflux augmenté dans ces sous-types par rapport au M1C. Par contre, les résultats d'expression d'ARNm (Figure 8D) et protéique (Figure 9B) montre que l'expression du SR-BI est réduite dans les deux sous-types M1 comparativement au M2. Il a été montré que le transporteur ABCG1 pouvait aussi favoriser l'efflux vers les HDL. Une plus forte expression d'ABCG1 dans le sous type M1A pourrait compenser la baisse d'efflux occasionnée par la diminution de SR-BI dans ce sous-type. La mesure d'expression de l'ARNm d'ABCG1 n'a révélé aucune différence entre les phénotypes M1 et M2. À défaut d'avoir un anticorps anti-ABCG1 valide, nous n'avons pu mesurer l'expression de la protéine ABCG1 dans le modèle THP-1. L'expression protéique resterait donc à déterminer afin de clairement définir si des différences dans l'expression d'ABCG1 pourraient expliquer pourquoi l'efflux des M1A est plus élevé que celui des M1C et égal au M2. Si l'interférence ou la délétion d'ABCG1, par l'utilisation de siRNA ou de macrophages de souris déficientes en ABCG1, réduit l'efflux induit par les HDL dans les phénotypes M1A et M2, ceci pourrait aussi indiquer un rôle plus important de ce transporteur dans l'efflux vers les HDL dans ces sous-types plutôt que dans le M1C.

Disparité dans l'expression des récepteurs *scavengers* et la capture des esters de cholestérol des lipoprotéines par les sous-types M1 et M2

En plus de contribuer au transport inverse du cholestérol par les mécanismes d'efflux, les macrophages participent aussi à la capture de lipoprotéines natives et modifiées via les différents récepteurs *scavengers* qu'ils expriment. Afin d'évaluer la capacité de capture de cholestérol des lipoprotéines des sous-types M1 et M2, nous avons d'abord déterminé l'expression d'ARNm et protéique de SR-BI et de CD36 dans les sous-types de macrophages THP-1. L'analyse de l'ARNm par RT-qPCR et des protéines par immunobuvardage a montré que l'expression de SR-BI et de CD36 est réduite dans les sous-types M1C et M1A par rapport au M2. Cette différence d'expression entre M1 et M2 concorde avec les effets connus des différents agents impliqués dans la polarisation des macrophages. En effet, il a été montré que l'IL-4, un stimulus polarisant les macrophages vers le phénotype M2, induisait la production de ligands pour PPAR γ dans les macrophages et une hausse d'expression de CD36 [237]. À l'opposé, des études ont démontré que le LPS réprimait l'expression de SR-BI et de CD36 dans les macrophages, et que cette baisse d'expression était associée à une diminution de PPAR γ [131, 238, 239]. Ainsi, ces résultats suggèrent que la polarisation en M1 est associée avec une réduction de ces récepteurs *scavengers*, tandis que la polarisation en M2 augmente leur expression, ce qui concorde également avec nos données. Cette différence d'expression est aussi appuyée par d'autres études qui ont fait la comparaison entre M1 et M2. Effectivement, Littlefield et ses collègues [224] montrent que les macrophages M2 de lignée THP-1 expriment plus de SR-BI, de CD36 et de SR-AI que le phénotype M1.

Puisque les niveaux des récepteurs *scavengers* SR-BI et CD36 diffèrent entre les phénotypes, nous avons donc mesuré l'association des lipoprotéines afin d'évaluer si un phénotype était plus efficace dans la fonction de capture de cholestérol des lipoprotéines. Le phénotype M2 montrait une capacité d'association d'esters de cholestérol beaucoup plus élevée que les sous-types M1C et M1A, et ce pour tous les types de lipoprotéines utilisées, soit les HDL₃, les LDL et les AcLDL. Puisque l'expression des récepteurs SR-BI et CD36 était plus élevée dans les M2, et que ces récepteurs sont impliqués dans la capture des HDL et des LDL modifiées (AcLDL), ces résultats concilient l'expression et la fonction des récepteurs impliqués dans la capture des lipoprotéines. En plus des récepteurs *scavengers*, nous avons aussi évalué

l'expression du rLDL, puisqu'il participe à la capture et à l'internalisation des LDL natives. Son expression était aussi réduite dans les sous-types M1 relativement au M2, ce qui concorde aussi avec la diminution de capture des esters de cholestérol des LDL observée dans les M1C et M1A. Le phénotype M2 serait donc un sous-type de macrophage mieux adapté que les M1 pour la capture des lipoprotéines de l'environnement, qu'elles soient natives ou modifiées.

Il est important de noter que les différences entre M1 et M2 dans la capture des AcLDL sont moins prononcées qu'avec les LDL et les HDL₃. Cet effet moindre suggère que l'expression plus basse du récepteur CD36 dans les M1 pourrait être compensée par un autre récepteur impliqué dans l'association des AcLDL dans ce sous-type. Un des candidats potentiels pouvant expliquer cette différence plus faible est le SR-A, puisqu'il a été démontré que les récepteurs CD36 et SR-A sont principalement responsables de la capture et de la dégradation des lipoprotéines modifiées, dont les AcLDL. À cet effet, Kunjathoor et ses collègues [99] ont montré que des macrophages provenant de souris KO pour SR-A et CD36 présentaient une capacité de liaison et de dégradation de OxLDL et de AcLDL fortement réduite par rapport aux macrophages de souris contrôles, indiquant que les LDL acétylées et oxydées sont principalement captées et dégradées par ces récepteurs. Cependant, ils ont observé que la liaison des AcLDL et leur dégradation est plus fortement diminuée dans les macrophages de souris SR-A^{-/-} que les macrophages de souris CD36^{-/-}. De plus, Lougheed et ses collègues [240] ont montré que des macrophages péritonéaux isolés de souris SR-AI/AII^{-/-} avaient une capacité fortement réduite de dégradation des AcLDL, mais que la délétion de SR-A avait un effet moins important sur la capture et la dégradation des OxLDL. Ces résultats indiqueraient que le SR-A pourrait être le principal récepteur impliqué dans l'internalisation des AcLDL. Toutefois, l'expression du SR-A dans les sous-types de macrophages est contradictoire, puisque certains ont montré une expression plus élevée dans le sous-type M2 [91, 224], alors que d'autres ont observé des niveaux plus élevés de SR-A dans des macrophages exprimant des marqueurs M1 [241]. Dans notre modèle, les données indiquent que l'ARNm de SR-A est augmentée dans les sous-types M1 par rapport au M2. Comme ce récepteur est impliqué dans la capture des AcLDL, une hausse d'expression dans les M1 pourrait expliquer la moins grande différence d'association des AcLDL entre les sous-types M1 et M2. Nous devrions alors confirmer cette hypothèse par la mesure d'expression protéique du récepteur SR-A, bien

que les anticorps contre SR-A utilisés dans le cadre de notre étude n'aient pas donné de bons résultats. De plus, nous pourrions tester la capture d'esters de cholestérol des OxLDL par les sous-types M1 et M2. Une réduction plus marquée entre la capture des CE des OxLDL dans les M1 par rapport aux M2 comparativement à la capture des CE des AcLDL pourrait indiquer que le SR-A intervient plus dans la capture des AcLDL et moins pour les OxLDL.

Certaines études mentionnées précédemment ont montré à l'aide de modèle *in vitro* et *in vivo* que le récepteur CD36 lierait et capturerait plus les lipoprotéines modérément oxydées, tandis que le récepteur SR-A participerait plus à la capture d'autres types de lipoprotéines modifiées, dont les AcLDL. Par contre, ces études n'ont pas évalué l'implication relative de ces récepteurs dans les sous-types de macrophages M1 et M2. Puisque le CD36 et le SR-A participent à la capture des lipoprotéines oxydées pouvant entraîner l'accumulation de cholestérol et la formation de la plaque, il serait donc important d'évaluer l'implication de ces récepteurs dans les différents phénotypes de macrophages. Pour ce faire, nous pourrions obtenir des macrophages provenant de souris CD36^{-/-} ou SR-A^{-/-}, polarisés en M1 et M2 et procéder à la mesure de l'association et de dégradation des AcLDL, mais aussi de lipoprotéines modifiées plus physiologiques comme les OxLDL ou les AgLDL, par les sous-types M1C, M1A et M2.

Susceptibilité d'accumulation de cholestérol des phénotypes M1 et M2

La caractérisation des mécanismes d'efflux et de capture de lipoprotéines des sous-types de lignée THP-1 démontre deux phénotypes à l'opposé dans leur capacité de transport de cholestérol. En effet, les M1C et M1A ont montré une capacité réduite d'efflux de cholestérol comparée au macrophage M2, mais aussi une capacité réduite de capture de CE provenant des HDL₃, de LDL et des AcLDL. Ces résultats présentent les M1 comme un sous-type qui est moins impliqué dans le transport du cholestérol que le sous-type M2. Afin de déterminer si un sous-type de macrophage internaliserait et accumulerait plus de cholestérol provenant de lipoprotéines pouvant contribuer à la formation de cellules spumeuses, nous avons mesuré la masse de cholestérol total corrigée pour les protéines dans les sous-types M1 et M2 après une incubation avec des AcLDL. Tous les sous-types ont été chargés en cholestérol également par cette incubation. Ces résultats sont surprenants, puisque l'expression des récepteurs SR-BI et CD36, impliqués dans la capture des LDL modifiées, est fortement réduite dans les deux sous-

types M1 comparé au M2, ce qui suggère une capacité réduite de capture des lipoprotéines et donc une moins grande susceptibilité à devenir des cellules spumeuses. Pour expliquer ce résultat, il faut envisager que la mesure d'accumulation de cholestérol à l'aide de AcLDL n'ait pas permis de bien mesurer les différences entre les sous-types de macrophages qui correspondent au profil d'expression des récepteurs *scavengers* dans l'accumulation de cholestérol dans notre modèle THP-1. Tel que mentionné précédemment, il se pourrait que le récepteur SR-A soit exprimé plus fortement dans le sous-type M1. Comme ce récepteur est fortement impliqué dans l'internalisation des AcLDL, une plus forte expression du SR-A dans les M1C et M1A pourrait expliquer la différence moins marquée de la capture d'esters de cholestérol des AcLDL entre les M1 et M2. Nos résultats montrent que la capture de cholestérol de ce type de lipoprotéines est plus forte dans les M2 après 4h, mais que le chargement de cholestérol des M1 et M2 est équivalent suite à 24h d'incubation avec AcLDL. Il se pourrait que la capture des AcLDL soit d'abord plus efficace dans les M2, puisqu'ils expriment plus de CD36, mais que le SR-A prenne la relève dans les M1, favorisant une entrée de cholestérol équivalente dans les phénotypes après 24h. À cet effet, nous pourrions procéder à des essais de capture d'esters de cholestérol des AcLDL sur une période de 24h. Une capture de CE équivalente dans les M1 et M2 pourrait indiquer que le SR-A est plus exprimé dans les M1 et faire en sorte que l'accumulation de cholestérol des AcLDL est égale dans les deux sous-types après 24h. Par ailleurs, nous devrions aussi valider l'expression protéique du récepteur SR-A dans les M1 et M2 du modèle THP-1, afin d'évaluer l'implication de ce récepteur pour la captation du cholestérol des lipoprotéines dans les sous-types de macrophages. Par la suite, l'inactivation ou la délétion du SR-A par l'utilisation d'anticorps bloquants anti-SR-A, de siRNA contre l'ARN de ce récepteur, ou des modèles de cellules déficientes en SR-A nous permettraient de conclure sur le rôle de ce transporteur dans la capture des AcLDL dans les phénotypes de macrophages THP-1. De plus, des mesures d'accumulation de cholestérol suite à l'incubation avec d'autres types de lipoprotéines modifiées, moins dépendantes du SR-A, comme les LDL oxydées et les LDL agrégées seraient à considérer pour bien discriminer la susceptibilité des différents sous-types à former des cellules spumeuses.

Conclusion

Les macrophages THP-1 sont largement utilisés dans le domaine de la recherche, puisqu'ils représentent un modèle de monocytes facilement différenciables en cellules ayant un phénotype de macrophages et offrant plusieurs avantages d'une lignée cellulaire. Les macrophages THP-1 peuvent de plus être polarisés par l'ajout de différents stimuli, afin d'obtenir des modèles représentatifs de plusieurs phénotypes de macrophages qui ont été retrouvés dans la plaque d'athérosclérose. À cet effet, nous avons montré que différentes concentrations de LPS induisaient bien la polarisation vers des phénotypes M1 (M1C et M1A) représentant différents stades de l'inflammation. Ces deux sous-types sont caractérisés par une baisse d'expression de l'ARNm et protéique des récepteurs *scavengers* SR-BI et CD36, et une hausse d'expression du transporteur ABCA1. Par contre, malgré une hausse d'expression d'ABCA1, les sous-types M1A et M1C ont montré une capacité d'efflux de cholestérol réduite et une plus faible association de cholestérol des HDL, LDL et AcLDL comparativement au phénotype M2.

L'ensemble de ces résultats dépeint le phénotype M2 comme étant mieux adapté pour la gestion du cholestérol, puisqu'il exprime plus de récepteurs *scavengers* et de transporteurs responsables de l'efflux de cholestérol, ce qui se traduit par une plus grande capacité d'efflux de cholestérol et une plus forte association des esters de cholestérol (EC) des lipoprotéines que les sous-types M1. Cette plus forte capacité d'efflux pourrait indiquer que le phénotype M2 favorise l'élimination du cholestérol au niveau de la plaque, réduisant ainsi l'accumulation de cholestérol et la progression de la plaque. La plus forte captation d'esters de cholestérol des lipoprotéines par le sous-type M2 aurait pu rendre ceux-ci plus susceptibles de former des cellules spumeuses et contribuer à la formation de la plaque. Toutefois, nos résultats obtenus suite à l'incubation des sous-types de macrophages avec des AcLDL n'ont pas permis de noter de différences dans l'accumulation de cholestérol par les phénotype M1 et M2, indiquant que le sous-type M1 accumule probablement autant ou plus de cholestérol des lipoprotéines en exprimant moins de récepteurs membranaires. La capacité d'efflux plus basse des M1 par rapport au sous-type M2, et l'absence de différence entre les M1 et les M2 sur le chargement en cholestérol pourrait indiquer une susceptibilité accrue des M1 à former des cellules

spumeuses. Puisqu'un débalancement de l'homéostasie du cholestérol des cellules peut contribuer à la formation de cellules spumeuses, il est donc important de bien évaluer les fonctions de transport de cholestérol des sous-types de macrophages afin d'identifier si un phénotype est plus à risque de former des cellules spumeuses et de contribuer à l'athérosclérose. À cet effet, nous devrions reproduire les expériences d'accumulation de cholestérol avec d'autres types de lipoprotéines modifiées, comme des LDL agrégées ou oxydées, puisque les AcLDL utilisés dans le cadre de notre étude ne représentent pas des lipoprotéines physiologiques. En l'absence de tels résultats nous pouvons présumer que les M2 sont plus adaptés à capter et ensuite sortir le cholestérol des cellules, puisqu'ils montrent une meilleure capacité d'efflux, ce qui pourrait favoriser le transport inverse du cholestérol. De plus, comme le LPS utilisé pour la polarisation de macrophages *in vitro* n'est probablement pas un des stimuli majoritairement impliqués dans la polarisation des macrophages de la plaque, l'utilisation de macrophages polarisés par des stimuli physiologiques, comme le GM-CSF, serait plus appropriés pour confirmer nos résultats et mesurer les fonctions de transport du cholestérol des sous-types M1 et M2. Ces informations permettraient alors d'évaluer si la polarisation des macrophages vers un phénotype particulier serait bénéfique afin de prévenir l'athérosclérose. Puisque les macrophages THP-1 restent un modèle de macrophages issus d'une lignée cellulaire, les résultats de notre étude devront être confirmés par d'autres études à partir de cellules primaires, afin de démontrer que notre modèle se rapproche le plus de la réalité.

Bibliographie

1. Organisation Mondiale de la Santé. *Maladies Cardiovasculaires*. 2015; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/>.
2. Dhingra, R. and R.S. Vasan, *Age as a Cardiovascular Risk Factor*. *Med Clin North Am*, 2012. **96**(1): p. 87-91.
3. Lerner, D.J. and W.B. Kannel, *Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population*. *Am Heart J*, 1986. **111**(2): p. 383-90.
4. Matthews, K.A., et al., *Menopause and risk factors for coronary heart disease*. *N Engl J Med*, 1989. **321**(10): p. 641-6.
5. Gasevic, D., E.S. Ross, and S.A. Lear, *Ethnic Differences in Cardiovascular Disease Risk Factors: A Systematic Review of North American Evidence*. *Can J Cardiol*, 2015. **31**(9): p. 1169-79.
6. Khera, A.V. and S. Kathiresan, *Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation*. *Nat Rev Genet*, 2017. **18**(6): p. 331-344.
7. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Familial Hypercholesterolemia: Defective Binding of Lipoproteins to Cultured Fibroblasts Associated with Impaired Regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1974. **71**(3): p. 788-92.
8. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis*. *Circulation*, 1987. **76**(3): p. 504-7.
9. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis*. *Annu Rev Biochem*, 1977. **46**: p. 897-930.
10. Tybjaerg-Hansen, A., et al., *Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease*. *N Engl J Med*, 1998. **338**(22): p. 1577-84.
11. Leren, T.P., *Sorting an LDL receptor with bound PCSK9 to intracellular degradation*. *Atherosclerosis*, 2014. **237**(1): p. 76-81.
12. Leren, T.P., *Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia*. *Clin Genet*, 2004. **65**(5): p. 419-22.
13. Timms, K.M., et al., *A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree*. *Hum Genet*, 2004. **114**(4): p. 349-53.
14. Cohen, J., et al., *Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9*. *Nat Genet*, 2005. **37**(2): p. 161-5.
15. Kotowski, I.K., et al., *A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol*. *Am J Hum Genet*, 2006. **78**(3): p. 410-22.
16. Cohen, J.C., et al., *Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(12): p. 1264-72.
17. Eichner, J.E., et al., *Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review*. *Am J Epidemiol*, 2002. **155**(6): p. 487-95.
18. Schiele, F., et al., *Apolipoprotein E serum concentration and polymorphism in six European countries: the ApoEurope Project*. *Atherosclerosis*, 2000. **152**(2): p. 475-88.

19. Schmidt, K., et al., *Structure, function, and genetics of lipoprotein (a)*. J Lipid Res, 2016. **57**(8): p. 1339-59.
20. Nelson, R.H., *Hyperlipidemia as a Risk Factor for Cardiovascular Disease*. Prim Care, 2013. **40**(1): p. 195-211.
21. Anderson, T.J., et al., *2016 Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Management of Dyslipidemia for the Prevention of Cardiovascular Disease in the Adult*. Can J Cardiol, 2016. **32**(11): p. 1263-1282.
22. Carmena, R., P. Duriez, and J.C. Fruchart, *Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III2-7.
23. Siri-Tarino, P.W., et al., *Saturated Fatty Acids and Risk of Coronary Heart Disease: Modulation by Replacement Nutrients*. Curr Atheroscler Rep, 2010. **12**(6): p. 384-90.
24. American Heart Association. *Alcohol as a cardiovascular risk factor*. 2015-2018]; Available from: http://www.heart.org/HEARTORG/HealthyLiving/HealthyEating/Nutrition/Alcohol-and-Heart-Health_UCM_305173_Article.jsp#.WnxQbCXOW70.
25. Shiroma, E.J. and I.M. Lee, *Physical activity and cardiovascular health: lessons learned from epidemiological studies across age, gender, and race/ethnicity*. Circulation, 2010. **122**(7): p. 743-52.
26. Kannel, W.B., W.P. Castelli, and P.M. McNamara, *Cigarette smoking and risk of coronary heart disease. Epidemiologic clues to pathogenesis. The Framingham Study*. Natl Cancer Inst Monogr, 1968. **28**: p. 9-20.
27. Wharton, S., et al., *Weight Management in Diabetes*. Can J Diabetes, 2018. **42 Suppl 1**: p. S124-s129.
28. Kannel, W.B. and D.L. McGee, *Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study*. Jama, 1979. **241**(19): p. 2035-8.
29. Nerenberg, K.A., et al., *Hypertension Canada's 2018 Guidelines for Diagnosis, Risk Assessment, Prevention, and Treatment of Hypertension in Adults and Children*. Can J Cardiol, 2018. **34**(5): p. 506-525.
30. Feingold, K.R. and C. Grunfeld, *Introduction to Lipids and Lipoproteins*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000, MDText.com, Inc.: South Dartmouth (MA).
31. Sacks, F.M. and H. Campos, *Low-Density Lipoprotein Size and Cardiovascular Disease: A Reappraisal*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2003. **88**(10): p. 4525-4532.
32. Kannel, W.B., et al., *Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. The Framingham study*. Ann Intern Med, 1971. **74**(1): p. 1-12.
33. Endo, A., *The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors*. J Lipid Res, 1992. **33**(11): p. 1569-82.
34. Collins, R., et al., *Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy*. Lancet, 2016. **388**(10059): p. 2532-2561.
35. Castelli, W.P., et al., *HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study*. Circulation, 1977. **55**(5): p. 767-72.
36. Rader, D.J. and A.R. Tall, *The not-so-simple HDL story: Is it time to revise the HDL cholesterol hypothesis?* Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1344-6.
37. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, *C-reactive protein: a critical update*. J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1805-12.

38. Lubrano, V. and S. Balzan, *Consolidated and emerging inflammatory markers in coronary artery disease*. World J Exp Med, 2015. **5**(1): p. 21-32.
39. Ridker, P.M., et al., *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease*. N Engl J Med, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.
40. Kramer, F., et al., *Interleukin-1beta stimulates acute phase response and C-reactive protein synthesis by inducing an NFkappaB- and C/EBPbeta-dependent autocrine interleukin-6 loop*. Mol Immunol, 2008. **45**(9): p. 2678-89.
41. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**: p. 233.
42. Deanfield, J.E., J.P. Halcox, and T.J. Rabelink, *Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance*. Circulation, 2007. **115**(10): p. 1285-95.
43. Majed, B.H. and R.A. Khalil, *Molecular Mechanisms Regulating the Vascular Prostacyclin Pathways and Their Adaptation during Pregnancy and in the Newborn*. Pharmacol Rev, 2012. **64**(3): p. 540-82.
44. Mundi, S., et al., *Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors-a review*. Cardiovasc Res, 2018. **114**(1): p. 35-52.
45. Chappell, D.C., et al., *Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium*. Circ Res, 1998. **82**(5): p. 532-9.
46. Zarins, C.K., et al., *Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress*. Circ Res, 1983. **53**(4): p. 502-14.
47. Singh, R.B., et al., *Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process*. Exp Clin Cardiol, 2002. **7**(1): p. 40-53.
48. Bobryshev, Y.V., *Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis*. Micron, 2006. **37**(3): p. 208-22.
49. Rosenfeld, M.E., et al., *Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans*. Am J Pathol, 1992. **140**(2): p. 291-300.
50. Napoli, C., F. de Nigris, and W. Palinski, *Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall*. J Cell Biochem, 2001. **82**(4): p. 674-82.
51. Steinberg, D., *Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance*. J Biol Chem, 1997. **272**(34): p. 20963-6.
52. Allahverdian, S., P.S. Pannu, and G.A. Francis, *Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation*. Cardiovasc Res, 2012. **95**(2): p. 165-72.
53. Libby, P., *Inflammation and Atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(9): p. 1135-1143.
54. Bentzon, J.F., et al., *Mechanisms of Plaque Formation and Rupture*. Circulation Research, 2014. **114**(12): p. 1852.
55. Stary, H.C., *Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(5): p. 1177-8.
56. Amento, E.P., et al., *Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells*. Arterioscler Thromb, 1991. **11**(5): p. 1223-30.
57. Dollery, C.M. and P. Libby, *Atherosclerosis and proteinase activation*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 625-35.
58. Hansson, G.K. and P. Libby, *The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(7): p. 508-19.

59. Mantovani, B., M. Rabinovitch, and V. Nussenzweig, *Phagocytosis of immune complexes by macrophages. Different roles of the macrophage receptor sites for complement (C3) and for immunoglobulin (IgG)*. J Exp Med, 1972. **135**(4): p. 780-92.
60. Chawla, A., *Control of macrophage activation and function by PPARs*. Circ Res, 2010. **106**(10): p. 1559-69.
61. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 13.
62. McLaren, J.E. and D.P. Ramji, *Interferon gamma: a master regulator of atherosclerosis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2009. **20**(2): p. 125-35.
63. Xu, X.H., et al., *Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL*. Circulation, 2001. **104**(25): p. 3103-8.
64. Yang, K., et al., *Toll-Like Receptor 4 Mediates Inflammatory Cytokine Secretion in Smooth Muscle Cells Induced by Oxidized Low-Density Lipoprotein*. PLoS One, 2014. **9**(4).
65. Chinetti-Gbaguidi, G., S. Colin, and B. Staels, *Macrophage subsets in atherosclerosis*. Nat Rev Cardiol, 2015. **12**(1): p. 10-7.
66. Tak, P.P. and G.S. Firestein, *NF- κ B: a key role in inflammatory diseases*. J Clin Invest, 2001. **107**(1): p. 7-11.
67. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. J Exp Med, 1992. **176**(1): p. 287-92.
68. Roszer, T., *Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 816460.
69. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
70. Jetten, N., et al., *Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo*. Angiogenesis, 2014. **17**(1): p. 109-18.
71. Mahdavian Delavary, B., et al., *Macrophages in skin injury and repair*. Immunobiology, 2011. **216**(7): p. 753-62.
72. Kadl, A., et al., *Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2*. Circ Res, 2010. **107**(6): p. 737-46.
73. Marques, L., et al., *Iron gene expression profile in atherogenic Mox macrophages*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1862**(6): p. 1137-46.
74. Moreno, P.R., et al., *Neovascularization in human atherosclerosis*. Curr Mol Med, 2006. **6**(5): p. 457-77.
75. Erbel, C., et al., *Prevalence of M4 macrophages within human coronary atherosclerotic plaques is associated with features of plaque instability*. Int J Cardiol, 2015. **186**: p. 219-25.
76. de Gaetano, M., et al., *M1- and M2-Type Macrophage Responses Are Predictive of Adverse Outcomes in Human Atherosclerosis*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 275.
77. Chinetti-Gbaguidi, G., et al., *Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRAalpha pathways*. Circ Res, 2011. **108**(8): p. 985-95.
78. Stoger, J.L., et al., *Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2012. **225**(2): p. 461-8.

79. Chang, T.Y., et al., *Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2*. *Curr Opin Lipidol*, 2001. **12**(3): p. 289-96.
80. Martin, S. and R.G. Parton, *Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(5): p. 373-8.
81. Schaffer, J.E., *Lipotoxicity: when tissues overeat*. *Curr Opin Lipidol*, 2003. **14**(3): p. 281-7.
82. Tabas, I., *Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(7): p. 905-11.
83. Okazaki, H., et al., *Elimination of cholesterol ester from macrophage foam cells by adenovirus-mediated gene transfer of hormone-sensitive lipase*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(35): p. 31893-9.
84. Zhao, B., et al., *Identification of a novel intracellular cholesteryl ester hydrolase (carboxylesterase 3) in human macrophages: compensatory increase in its expression after carboxylesterase 1 silencing*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012. **303**(4): p. C427-35.
85. Jonas, A., *Lecithin cholesterol acyltransferase*. *Biochim Biophys Acta*, 2000. **1529**(1-3): p. 245-56.
86. Barter, P.J., et al., *Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(2): p. 160-7.
87. Acton, S., et al., *Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor*. *Science*, 1996. **271**(5248): p. 518-20.
88. Mahley, R.W., Y. Huang, and K.H. Weisgraber, *Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(5): p. 1226-9.
89. Goldstein, J.L. and M.S. Brown, *The LDL receptor*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(4): p. 431-8.
90. Jeong, H.J., et al., *Sterol-dependent regulation of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 expression by sterol-regulatory element binding protein-2*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(2): p. 399-409.
91. Canton, J., D. Neculai, and S. Grinstein, *Scavenger receptors in homeostasis and immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(9): p. 621-34.
92. Krieger, M., *The other side of scavenger receptors: pattern recognition for host defense*. *Curr Opin Lipidol*, 1997. **8**(5): p. 275-80.
93. Miller, Y.I., et al., *Oxidation-Specific Epitopes Are Danger-Associated Molecular Patterns Recognized by Pattern Recognition Receptors of Innate Immunity*. *Circulation Research*, 2011. **108**(2): p. 235.
94. Hessler, J.R., et al., *Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity*. *Arteriosclerosis*, 1983. **3**(3): p. 215-22.
95. Goldstein, J.L., et al., *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(1): p. 333-7.
96. Kodama, T., et al., *Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils*. *Nature*, 1990. **343**(6258): p. 531-5.
97. Emi, M., et al., *Structure, organization, and chromosomal mapping of the human macrophage scavenger receptor gene*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(3): p. 2120-5.

98. Doi, T., et al., *Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 2126-33.
99. Kunjathoor, V.V., et al., *Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49982-8.
100. de Winther, M.P.J., et al., *Macrophage Scavenger Receptor Class A*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2000. **20**(2): p. 290.
101. Gough, P.J., et al., *Analysis of macrophage scavenger receptor (SR-A) expression in human aortic atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(3): p. 461-71.
102. Geng, Y.J. and G.K. Hansson, *Interferon-gamma inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages*. J Clin Invest, 1992. **89**(4): p. 1322-30.
103. Hsu, H.Y., A.C. Nicholson, and D.P. Hajjar, *Inhibition of macrophage scavenger receptor activity by tumor necrosis factor-alpha is transcriptionally and post-transcriptionally regulated*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7767-73.
104. Draude, G. and R.L. Lorenz, *TGF-beta1 downregulates CD36 and scavenger receptor A but upregulates LOX-1 in human macrophages*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000. **278**(4): p. H1042-8.
105. Ricote, M., et al., *The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation*. Nature, 1998. **391**(6662): p. 79-82.
106. Freeman, M., et al., *Expression of type I and type II bovine scavenger receptors in Chinese hamster ovary cells: lipid droplet accumulation and nonreciprocal cross competition by acetylated and oxidized low density lipoprotein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991. **88**(11): p. 4931.
107. de Winther, M.P., et al., *Macrophage specific overexpression of the human macrophage scavenger receptor in transgenic mice, using a 180-kb yeast artificial chromosome, leads to enhanced foam cell formation of isolated peritoneal macrophages*. Atherosclerosis, 1999. **147**(2): p. 339-47.
108. Park, Y.M., *CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis*. Exp Mol Med, 2014. **46**(6): p. e99-.
109. Febbraio, M., D.P. Hajjar, and R.L. Silverstein, *CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 785-91.
110. Silverstein, R.L. and M. Febbraio, *CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior*. Sci Signal, 2009. **2**(72): p. re3.
111. Calvo, D., et al., *Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL*. J Lipid Res, 1998. **39**(4): p. 777-88.
112. Endemann, G., et al., *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein*. J Biol Chem, 1993. **268**(16): p. 11811-6.
113. Podrez, E.A., et al., *Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species*. J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. 1095-108.

114. Huh, H.Y., et al., *Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation*. *Blood*, 1996. **87**(5): p. 2020-8.
115. Hayden, J.M., et al., *Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol*. *J Lipid Res*, 2002. **43**(1): p. 26-35.
116. Feng, J., et al., *Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma*. *J Lipid Res*, 2000. **41**(5): p. 688-96.
117. Tontonoz, P., et al., *PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL*. *Cell*, 1998. **93**(2): p. 241-52.
118. Acton, S.L., et al., *Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(33): p. 21003-9.
119. Murao, K., et al., *Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(28): p. 17551-7.
120. Krieger, M., *Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems*. *Journal of Clinical Investigation*, 2001. **108**(6): p. 793-797.
121. Krieger, M., *Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI*. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 523-58.
122. Webb, N.R., et al., *SR-BII, an isoform of the scavenger receptor BI containing an alternate cytoplasmic tail, mediates lipid transfer between high density lipoprotein and cells*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(24): p. 15241-8.
123. Rhains, D. and L. Brissette, *The role of scavenger receptor class B type I (SR-BI) in lipid trafficking*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2004. **36**(1): p. 39-77.
124. Ji, A., et al., *Scavenger receptor SR-BI in macrophage lipid metabolism*. *Atherosclerosis*, 2011. **217**(1): p. 106-12.
125. Yu, L., et al., *Sterol regulation of scavenger receptor class B type I in macrophages*. *J Lipid Res*, 2004. **45**(5): p. 889-99.
126. Malerod, L., et al., *Oxysterol-activated LXRA/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. **299**(5): p. 916-23.
127. Ma, A.Z.S., Z.Y. Song, and Q. Zhang, *Cholesterol efflux is LXRA isoform-dependent in human macrophages*. *BMC Cardiovasc Disord*, 2014. **14**: p. 80.
128. Chinetti, G., et al., *CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors*. *Circulation*, 2000. **101**(20): p. 2411-7.
129. Bouhrel, M.A., et al., *PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties*. *Cell Metab*, 2007. **6**(2): p. 137-43.
130. Hu, Y.W., et al., *TGF-beta1 up-regulates expression of ABCA1, ABCG1 and SR-BI through liver X receptor alpha signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells*. *J Atheroscler Thromb*, 2010. **17**(5): p. 493-502.

131. Park, Y., T.X. Pham, and J. Lee, *Lipopolysaccharide represses the expression of ATP-binding cassette transporter G1 and scavenger receptor class B, type I in murine macrophages*. *Inflamm Res*, 2012. **61**(5): p. 465-72.
132. Vinals, M., et al., *Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(7): p. 5325-32.
133. Rhains, D., et al., *The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters*. *Biochemistry*, 2003. **42**(24): p. 7527-38.
134. Rigotti, A., et al., *A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(23): p. 12610-5.
135. Varban, M.L., et al., *Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(8): p. 4619-24.
136. Webb, N.R., et al., *Overexpression of SR-BI by adenoviral vector promotes clearance of apoA-I, but not apoB, in human apoB transgenic mice*. *J Lipid Res*, 2002. **43**(9): p. 1421-8.
137. Brodeur, M.R., et al., *Physiological importance of SR-BI in the in vivo metabolism of human HDL and LDL in male and female mice*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(4): p. 687-96.
138. Neculai, D., et al., *Structure of LIMP-2 provides functional insights with implications for SR-BI and CD36*. *Nature*, 2013. **504**(7478): p. 172-6.
139. Sun, B., et al., *Quantitative analysis of SR-BI-dependent HDL retroendocytosis in hepatocytes and fibroblasts*. *J Lipid Res*, 2006. **47**(8): p. 1700-13.
140. Marsche, G., et al., *Class B scavenger receptors CD36 and SR-BI are receptors for hypochlorite-modified low density lipoprotein*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(48): p. 47562-70.
141. Sun, B., et al., *Distinct mechanisms for OxLDL uptake and cellular trafficking by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI*. *J Lipid Res*, 2007. **48**(12): p. 2560-70.
142. Bourret, G., et al., *In vivo cholesteryl ester selective uptake of mildly and standardly oxidized LDL occurs by both parenchymal and nonparenchymal mouse hepatic cells but SR-BI is only responsible for standardly oxidized LDL selective uptake by nonparenchymal cells*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006. **38**(7): p. 1160-70.
143. Moore, K.J. and M.W. Freeman, *Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(8): p. 1702-11.
144. Kruth, H.S., et al., *Macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(37): p. 34573-80.
145. Kruth, H.S., et al., *Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(3): p. 2352-60.
146. Asmis, R., et al., *Lipoprotein aggregation protects human monocyte-derived macrophages from OxLDL-induced cytotoxicity*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(6): p. 1124-32.
147. Schrijvers, D.M., et al., *Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability*. *Cardiovasc Res*, 2007. **73**(3): p. 470-80.

148. Sakr, S.W., et al., *The uptake and degradation of matrix-bound lipoproteins by macrophages require an intact actin Cytoskeleton, Rho family GTPases, and myosin ATPase activity.* J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37649-58.
149. Moore, K.J., F.J. Sheedy, and E.A. Fisher, *Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(10): p. 709-21.
150. Phillips, M.C., *Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux.* J Biol Chem, 2014. **289**(35): p. 24020-9.
151. Dean, M., A. Rzhetsky, and R. Allikmets, *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.* Genome Res, 2001. **11**(7): p. 1156-66.
152. Qian, H., et al., *Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1.* Cell, 2017. **169**(7): p. 1228-1239 e10.
153. Langmann, T., et al., *Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABCI): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages.* Biochem Biophys Res Commun, 1999. **257**(1): p. 29-33.
154. Remaley, A.T., et al., *Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter.* Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(3): p. 818-23.
155. Janowski, B.A., et al., *Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR α and LXR β .* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): p. 266-71.
156. Denis, M., et al., *Expression, regulation, and activity of ABCA1 in human cell lines.* Mol Genet Metab, 2003. **78**(4): p. 265-74.
157. Kliewer, S.A., et al., *Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors.* Nature, 1992. **358**(6389): p. 771-4.
158. Chawla, A., et al., *A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis.* Mol Cell, 2001. **7**(1): p. 161-71.
159. Wang, N., et al., *A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I.* J Clin Invest, 2003. **111**(1): p. 99-107.
160. Rechsteiner, M. and S.W. Rogers, *PEST sequences and regulation by proteolysis.* Trends Biochem Sci, 1996. **21**(7): p. 267-71.
161. Rayner, K.J., et al., *MiR-33 Contributes to the Regulation of Cholesterol Homeostasis.* Science, 2010. **328**(5985): p. 1570-3.
162. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.* Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
163. Hara, H. and S. Yokoyama, *Interaction of free apolipoproteins with macrophages. Formation of high density lipoprotein-like lipoproteins and reduction of cellular cholesterol.* J Biol Chem, 1991. **266**(5): p. 3080-6.
164. Francis, G.A., R.H. Knopp, and J.F. Oram, *Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease.* J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 78-87.
165. Wang, S. and J.D. Smith, *ABCA1 and nascent HDL biogenesis.* Biofactors, 2014. **40**(6): p. 547-54.
166. Du, X.M., et al., *HDL particle size is a critical determinant of ABCA1-mediated macrophage cellular cholesterol export.* Circ Res, 2015. **116**(7): p. 1133-42.
167. Vedhachalam, C., et al., *Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles.* J Biol Chem, 2007. **282**(34): p. 25123-30.

168. Yvan-Charvet, L., N. Wang, and A.R. Tall, *Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. **30**(2): p. 139-43.
169. Trigueros-Motos, L., et al., *ABCA8 Regulates Cholesterol Efflux and High-Density Lipoprotein Cholesterol Levels*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017. **37**(11): p. 2147-2155.
170. Fu, Y., et al., *ABCA12 regulates ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages and the development of atherosclerosis*. *Cell Metab*, 2013. **18**(2): p. 225-38.
171. Smyth, I., et al., *A mouse model of harlequin ichthyosis delineates a key role for Abca12 in lipid homeostasis*. *PLoS Genet*, 2008. **4**(9): p. e1000192.
172. McNeish, J., et al., *High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(8): p. 4245-50.
173. Brunham, L.R., et al., *Tissue-specific roles of ABCA1 influence susceptibility to atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(4): p. 548-54.
174. Bi, X., et al., *Liver ABCA1 deletion in LDLrKO mice does not impair macrophage reverse cholesterol transport or exacerbate atherogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. **33**(10): p. 2288-96.
175. Krimbou, L., et al., *Molecular interactions between apoE and ABCA1: impact on apoE lipidation*. *J Lipid Res*, 2004. **45**(5): p. 839-48.
176. Zhu, X., et al., *Increased Cellular Free Cholesterol in Macrophage-specific Abca1*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(34): p. 22930-41.
177. Wang, M.D., V. Franklin, and Y.L. Marcel, *In vivo reverse cholesterol transport from macrophages lacking ABCA1 expression is impaired*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(8): p. 1837-42.
178. Tarling, E.J., *Expanding roles of ABCG1 and sterol transport*. *Curr Opin Lipidol*, 2013. **24**(2): p. 138-46.
179. Wang, N., et al., *ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(26): p. 9774-9.
180. Nakamura, K., et al., *Expression and regulation of multiple murine ATP-binding cassette transporter G1 mRNAs/isoforms that stimulate cellular cholesterol efflux to high density lipoprotein*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(44): p. 45980-9.
181. Engel, T., et al., *Expression and functional characterization of ABCG1 splice variant ABCG1(666)*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(18): p. 4551-9.
182. Akiyama, T.E., et al., *Conditional Disruption of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gene in Mice Results in Lowered Expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in Macrophages and Reduced Cholesterol Efflux*. *Molecular and Cellular Biology*, 2002. **22**(8): p. 2607-2619.
183. Lai, L., et al., *MicroRNA-33 Regulates the Innate Immune Response via ATP Binding Cassette Transporter-mediated Remodeling of Membrane Microdomains*. *J Biol Chem*, 2016. **291**(37): p. 19651-60.
184. Vaughan, A.M. and J.F. Oram, *ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(34): p. 30150-7.

185. Xie, Q., et al., *Cell surface localization of ABCG1 does not require LXR activation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(11): p. e143-4; author reply e145.
186. Tarling, E.J. and P.A. Edwards, *ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011. **108**(49): p. 19719-19724.
187. Sankaranarayanan, S., et al., *Effects of acceptor composition and mechanism of ABCG1-mediated cellular free cholesterol efflux*. *J Lipid Res*, 2009. **50**(2): p. 275-84.
188. Baldan, A., et al., *Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldlr^{-/-} and ApoE^{-/-} mice transplanted with Abcg1^{-/-} bone marrow*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(10): p. 2301-7.
189. Ranalletta, M., et al., *Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with Abcg1^{-/-} bone marrow*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(10): p. 2308-15.
190. Out, R., et al., *Macrophage ABCG1 Deletion Disrupts Lipid Homeostasis in Alveolar Macrophages and Moderately Influences Atherosclerotic Lesion Development in LDL Receptor-Deficient Mice*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2006. **26**(10): p. 2295.
191. Meurs, I., et al., *The effect of ABCG1 deficiency on atherosclerotic lesion development in LDL receptor knockout mice depends on the stage of atherogenesis*. *Atherosclerosis*, 2012. **221**(1): p. 41-7.
192. Schou, J., et al., *Genetic variation in ABCG1 and risk of myocardial infarction and ischemic heart disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(2): p. 506-15.
193. Ji, Y., et al., *Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(34): p. 20982-5.
194. Gu, X., K. Kozarsky, and M. Krieger, *Scavenger receptor class B, type I-mediated [³H]cholesterol efflux to high and low density lipoproteins is dependent on lipoprotein binding to the receptor*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(39): p. 29993-30001.
195. Thuahnai, S.T., et al., *Scavenger receptor class B type I-mediated cholesteryl ester-selective uptake and efflux of unesterified cholesterol. Influence of high density lipoprotein size and structure*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(13): p. 12448-55.
196. Röhrli, C. and H. Stangl, *HDL endocytosis and resecretion()*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1831**(11): p. 1626-33.
197. Mulcahy, J.V., D.R. Riddell, and J.S. Owen, *Human scavenger receptor class B type II (SR-BII) and cellular cholesterol efflux*. *Biochem J*, 2004. **377**(Pt 3): p. 741-7.
198. Zhang, W., et al., *Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice*. *Circulation*, 2003. **108**(18): p. 2258-63.
199. Covey, S.D., et al., *Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(9): p. 1589-94.
200. Zaroni, P., et al., *Rare variant in scavenger receptor BI raises HDL cholesterol and increases risk of coronary heart disease*. *Science*, 2016. **351**(6278): p. 1166-71.
201. Nishi, K., et al., *Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(10): p. 1649-54.

202. Carr, A.C., M.R. McCall, and B. Frei, *Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(7): p. 1716-23.
203. Ryu, B.H., et al., *Cholesteryl ester accumulation in macrophages treated with oxidized low density lipoprotein*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1995. **59**(9): p. 1619-22.
204. Hazell, L.J. and R. Stocker, *Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages*. *Biochem J*, 1993. **290**(Pt 1): p. 165-72.
205. Podrez, E.A., et al., *Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro*. *J Clin Invest*, 1999. **103**(11): p. 1547-60.
206. Linton, M.F., et al., *The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis*, in *Endotext*, L.J. De Groot, et al., Editors. 2000, MDText.com, Inc.: South Dartmouth MA.
207. Weinstein, D.B., T.E. Carew, and D. Steinberg, *Uptake and degradation of low density lipoprotein by swine arterial smooth muscle cells with inhibition of cholesterol biosynthesis*. *Biochim Biophys Acta*, 1976. **424**(3): p. 404-21.
208. Basu, S.K., et al., *Degradation of low density lipoprotein . dextran sulfate complexes associated with deposition of cholesteryl esters in mouse macrophages*. *J Biol Chem*, 1979. **254**(15): p. 7141-6.
209. Nagy, L., et al., *Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma*. *Cell*, 1998. **93**(2): p. 229-40.
210. Han, J., et al., *Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(34): p. 21654-9.
211. Yoshida, H., et al., *Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macroscialin in resident mouse peritoneal macrophages*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(5): p. 794-802.
212. Suzuki, H., et al., *A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection*. *Nature*, 1997. **386**(6622): p. 292-6.
213. Febbraio, M., et al., *Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(8): p. 1049-56.
214. Manning-Tobin, J.J., et al., *Loss of SR-A and CD36 Activity Reduces Atherosclerotic Lesion Complexity Without Abrogating Foam Cell Formation in Hyperlipidemic Mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(1): p. 19-26.
215. Khoo, J.C., et al., *Enhanced macrophage uptake of low density lipoprotein after self-aggregation*. *Arteriosclerosis*, 1988. **8**(4): p. 348-58.
216. Dhaliwal, B.S. and U.P. Steinbrecher, *Cholesterol delivered to macrophages by oxidized low density lipoprotein is sequestered in lysosomes and fails to efflux normally*. *J Lipid Res*, 2000. **41**(10): p. 1658-65.
217. Yuan, X.M., et al., *The toxicity to macrophages of oxidized low-density lipoprotein is mediated through lysosomal damage*. *Atherosclerosis*, 1997. **133**(2): p. 153-61.
218. Favari, E., et al., *Impaired ATP-binding cassette transporter A1-mediated sterol efflux from oxidized LDL-loaded macrophages*. *FEBS Lett*, 2005. **579**(29): p. 6537-42.
219. Tsuchiya, S., et al., *Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester*. *Cancer Res*, 1982. **42**(4): p. 1530-6.

220. Chanput, W., J.J. Mes, and H.J. Wichers, *THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach*. *Int Immunopharmacol*, 2014. **23**(1): p. 37-45.
221. Chanput, W., et al., *Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds*. *Food Funct*, 2013. **4**(2): p. 266-76.
222. Sharif, O., et al., *Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages*. *BMC Immunol*, 2007. **8**: p. 1.
223. Chinetti, G., et al., *PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway*. *Nat Med*, 2001. **7**(1): p. 53-8.
224. Littlefield, M., et al., *Polarization of Human THP-1 Macrophages: Link between Adenosine Receptors, Inflammation and Lipid Accumulation*. 2015.
225. Genin, M., et al., *M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide*. *BMC Cancer*, 2015. **15**: p. 577.
226. Hao, X.R., et al., *IFN-gamma down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXRA in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner*. *Atherosclerosis*, 2009. **203**(2): p. 417-28.
227. Khovidhunkit, W., et al., *Endotoxin down-regulates ABCG5 and ABCG8 in mouse liver and ABCA1 and ABCG1 in J774 murine macrophages: differential role of LXR*. *J Lipid Res*, 2003. **44**(9): p. 1728-36.
228. Nakagawa, T., et al., *Oxidized LDL increases and interferon-gamma decreases expression of CD36 in human monocyte-derived macrophages*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(8): p. 1350-7.
229. Oh, J., et al., *Endoplasmic reticulum stress controls M2 macrophage differentiation and foam cell formation*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(15): p. 11629-41.
230. Kirikae, T., et al., *Endotoxin contamination in fetal bovine serum and its influence on tumor necrosis factor production by macrophage-like cells J774.1 cultured in the presence of the serum*. *Int J Immunopharmacol*, 1997. **19**(5): p. 255-62.
231. Carnevale, R., et al., *Localization of lipopolysaccharide from Escherichia Coli into human atherosclerotic plaque*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 3598.
232. Wang, N., et al., *Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABCA1*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(42): p. 33053-8.
233. Higashi, Y., et al., *Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor Deficiency in Macrophages Accelerates Atherosclerosis and Induces an Unstable Plaque Phenotype in Apolipoprotein E-Deficient Mice*. *Circulation*, 2016. **133**(23): p. 2263-78.
234. Qiu, G. and J.S. Hill, *Atorvastatin inhibits ABCA1 expression and cholesterol efflux in THP-1 macrophages by an LXR-dependent pathway*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2008. **51**(4): p. 388-95.
235. Thompson, P.A., et al., *ABCA1 promotes the efflux of bacterial LPS from macrophages and accelerates recovery from LPS-induced tolerance*. *J Lipid Res*, 2010. **51**(9): p. 2672-85.
236. Gafencu, A.V., et al., *Inflammatory signaling pathways regulating ApoE gene expression in macrophages*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(30): p. 21776-85.
237. Huang, J.T., et al., *Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase*. *Nature*, 1999. **400**(6742): p. 378-82.

238. Buechler, C., et al., *Lipopolysaccharide inhibits the expression of the scavenger receptor Cla-1 in human monocytes and macrophages*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **262**(1): p. 251-4.
239. Feingold, K.R., et al., *Mechanisms of triglyceride accumulation in activated macrophages*. *J Leukoc Biol*, 2012. **92**(4): p. 829-39.
240. Lougheed, M., et al., *High affinity saturable uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages from mice lacking the scavenger receptor class A type I/II*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(20): p. 12938-44.
241. Grewal, T., et al., *Identification of a gamma-interferon-responsive element in the promoter of the human macrophage scavenger receptor A gene*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(5): p. 825-31.

