

Université de Montréal

**Étude des effets anti-athérosclérotiques d'analogues aza-GHRP-6 en tant que ligands du récepteur CD36 chez un modèle murin déficient en apolipoprotéine E**

*Par*

Geneviève Fréreau

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la aux Études supérieures et postdoctorales  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc.) en sciences pharmaceutiques  
option pharmacologie

**Décembre 2020**

© Geneviève Fréreau, 2020

Université de Montréal

Études supérieures et postdoctorales

---

*Ce mémoire intitulé*

**Étude des effets anti-athérosclérotiques d'analogues aza-GHRP-6 en tant que ligands du récepteur CD36 chez un modèle murin déficient en apolipoprotéine E**

*Présenté par*

**Geneviève Frégeau**

*a été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Céline Fiset**

Président-rapporteur

**Sylvie Marleau**

Directeur de recherche

**Marc Servant**

Membre du jury

## Résumé

L'athérosclérose est un important facteur de risque des maladies cardiovasculaires ischémiques. Cette pathologie est caractérisée par la formation de plaques lipidiques dans l'intima des vaisseaux sanguins. Le récepteur éboueur cluster de différentiation-36 (CD36) est impliqué dans l'internalisation et l'accumulation de lipoprotéines au sein des macrophages qui vont devenir des cellules spumeuses, ce qui est à l'origine de la formation de lésions athérosclérotiques. Notre hypothèse est que les azapeptides, dérivés du peptide de relâche de l'hormone de croissance 6 (GHRP-6), vont interférer avec l'internalisation des lipoprotéines par les macrophages et ainsi réduire la progression des lésions. Nous avons utilisé des souris déficientes en apolipoprotéine E (*apoE<sup>-/-</sup>*) qui ont été traitées quotidiennement par une injection sous-cutanée de 300 nmol/kg de MPE-001 ou de MPE-003. Les effets des azapeptides ont été étudiés sous deux régimes alimentaires, soit le maintien d'une diète enrichie en lipides et en cholestérol (HFHC) pendant la durée de l'étude, ou par une diète HFHC suivie d'une diète normale pendant la période de traitement. Nos résultats montrent que les azapeptides ont réduit la progression des lésions à différents sites aortiques et artériels et induit leur régression au niveau des sinus aortiques du coeur. Ces effets ont été associés à une diminution de médiateurs pro-inflammatoires au niveau plasmatique et à une augmentation des marqueurs caractéristiques des macrophages anti-inflammatoires (M2). Nos travaux ont montré que l'effet athéroprotecteur des azapeptides dépend de la présence du récepteur CD36. Ces résultats appuient le développement de ligands sélectifs du récepteur CD36 dans le traitement de l'athérosclérose.

**Mots-clés :** CD36, azapeptides, athérosclérose, macrophage, régression



## **Abstract**

Atherosclerosis is an important risk factor for the development of ischemic heart disease. This pathology is characterized by the formation of lipid plaques in the intima of the blood vessels. The receptor cluster of differentiation 36 (CD36) is involved in the internalization and retention of lipoproteins within macrophages that will become foam cells, which induce the formation of atherosclerotic lesions. Our hypothesis is that azapeptides, derived from growth hormone release peptide-6 (GHRP-6), will interfere with the internalization of lipoproteins by macrophages and thereby reduce the progression of lesions. We used apolipoprotein E-deficient mice ( $apoE^{-/-}$ ) which were treated daily with a subcutaneous injection of 300 nmol / kg of MPE-001 or MPE-003. The effects of azapeptides were studied under two diets regimen, the mice were either maintained under a diet enriched in fat and cholesterol (HFHC) for the duration of the study or were given a HFHC diet followed by a normal diet during the treatment period. Our results show that azapeptides reduced the progression of lesions at different aortic and arterial sites and induced their regression in the aortic sinuses of the heart. These effects have been associated with a decrease in pro-inflammatory mediators in plasma and an increase in markers characteristic of anti-inflammatory macrophages (M2). Our work has shown that the atheroprotective effect of azapeptides depends on the presence of the CD36 receptor. These results support the development of selective ligands for the CD36 receptor in the treatment of atherosclerosis.

**Keywords :** CD36, azapeptides, atherosclerosis, macrophage, regression



## **Table des matières**

<b>Résumé .....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>5</b>
<b>Table des matières.....</b>	<b>7</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>12</b>
<b>Liste des sigles et abréviations.....</b>	<b>13</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>21</b>
<b>Chapitre 1 – Introduction et hypothèse de recherche.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1. Athérosclérose.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1.1. Maladies cardiovasculaires.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1.2. Facteurs de risque de l’athérosclérose .....</b>	<b>25</b>
<b>1.1.3. Progression des plaques d’athérosclérose .....</b>	<b>30</b>
1.1.3.1. Athérogenèse.....	30
1.1.3.1.1. Dysfonction endothéliale .....	30
1.1.3.1.2. Recrutement des leucocytes sanguins.....	32
1.1.3.1.3. Accumulation et oxydation du LDL dans l’intima .....	33
1.1.3.1.4. Formation de cellules spumeuses et stries lipidiques .....	35
1.1.3.1.5. Plaques fibreuses .....	38
1.1.3.1.6. Rupture de la plaque et autres complications .....	40

1.1.3.2.	Réponse inflammatoire .....	43
1.1.3.2.1.	Rôle de l'immunité innée/adaptative .....	43
1.1.3.2.2.	Inflammation chronique .....	46
<b>1.2.</b>	<b>Métabolisme des lipides .....</b>	<b>48</b>
<b>1.2.1.</b>	<b>Lipoprotéines .....</b>	<b>49</b>
1.2.1.1.	LDL modifié .....	50
1.2.1.2.	HDL .....	51
<b>1.2.2.</b>	<b>Apolipoprotéines.....</b>	<b>53</b>
<b>1.3.</b>	<b>Traitements actuels et en développement .....</b>	<b>53</b>
<b>1.3.1.</b>	<b>Inhibiteurs de la synthèse du cholestérol .....</b>	<b>54</b>
<b>1.3.2.</b>	<b>Inhibiteurs de la dégradation du récepteur au LDL.....</b>	<b>55</b>
<b>1.3.3.</b>	<b>Anti-inflammatoires .....</b>	<b>56</b>
<b>1.4.</b>	<b>Contribution des macrophages dans l'athérosclérose .....</b>	<b>57</b>
<b>1.4.1.</b>	<b>Hétérogénéité des monocytes.....</b>	<b>57</b>
<b>1.4.2.</b>	<b>La polarisation des macrophages dans l'athérosclérose.....</b>	<b>61</b>
<b>1.4.3.</b>	<b>Phénotypes des macrophages dérivés des monocytes .....</b>	<b>62</b>
1.4.3.1.	M1 .....	63
1.4.3.2.	M2 (a, b, c).....	65
1.4.3.3.	Autres .....	66
<b>1.4.4.</b>	<b>Homéostasie du cholestérol .....</b>	<b>68</b>



1.4.5.	Efférocytose.....	70
1.5.	Modèles animaux de l'athérosclérose.....	74
1.6.	Récepteur SR-B2/CD36 .....	76
1.6.1.	Structure et expression .....	76
1.6.2.	Rôles et voies de signalisation du récepteur CD36.....	78
1.7.	Ligands synthétiques du CD36.....	82
1.7.1.	Le GHRP-6.....	82
1.7.2.	Le EP80317 .....	84
1.7.3.	Le potentiel thérapeutique des azapeptides .....	87
1.8.	Hypothèse de recherche et objectifs spécifiques.....	89
Chapitre 2 – Article scientifique : Atheroprotective and atheroregressive potential of azapeptide derivatives of GHRP-6 as selective CD36 ligands in apolipoprotein E deficient mice.....		
		93
	Abstract .....	95
1.	Introduction .....	97
2.	Materials and methods.....	98
2.1.	Experimental protocols.....	98
2.2.	Azapeptides .....	99
3.	Results .....	100

3.1.	Aza-peptides reduce atherosclerotic lesions below the baseline level in aortic sinuses of <i>apoe</i> <sup>-/-</sup> mice after switching diet from HFHC to normal chow .....	100
3.2.	Aza-peptides reduced macrophage content and the relative numbers of pro-inflammatory macrophages in the brachiocephalic artery of <i>apoe</i> <sup>-/-</sup> mice after switching from HFHC to normal chow diet.....	101
3.3.	In <i>apoe</i> <sup>-/-</sup> <i>cd36</i> <sup>-/-</sup> mice, no anti-atherosclerotic effects of MPE-001 and MPE-003 were observed .....	102
3.4.	Aza-peptides MPE-001 and MPE-003 reduced atherosclerotic lesions progression in <i>apoe</i> <sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet throughout the study.....	103
3.5.	Aza-peptides promoted aerobic metabolic shift in bone marrow-derived monocytes.....	104
4.	Discussion.....	105
4.1.	Conclusion.....	110
	References .....	112
	Figures .....	118
	Appendix A. Supplemental materials.....	127
	Chapitre 3 – Discussion.....	151
3.1.	Conclusion.....	164
3.2.	Perspectives futures.....	164
	Références bibliographiques .....	167



## Liste des figures

<b>Figure 1</b> – Métabolisme des lipides.....	49
<b>Figure 2</b> – Voies de signalisation des macrophages dans l'athérosclérose .....	57
<b>Figure 3</b> – Polarisation et rôles des macrophages .....	63

## Liste des sigles et abréviations

A $\beta$  : Peptide amyloïde bêta

ABCA-1 : *ATP-binding cassette A1*

ABCG-1 : *ATP-binding cassette G1*

AMPK : *Adenosine monophosphate-activated protein kinase*

ApoB : Apolipoprotéine B

ApoE : Apolipoprotéine E

ApoA : Apolipoprotéine A

ApoB : Apolipoprotéine B

Arg-1 : Arginase-1

AVC : Accidents vasculaires cérébraux

CCL-2 : Chimiokine motif c-c ligand 2

CCL-5 : Chimiokine motif c-c ligand 5

CCL-7 : Chimiokine motif c-c- ligand 7

CCR-2 : Récepteur aux chimiokines de type CC 2

CD4 : *Cluster* de différenciation 4

CD14 : *Cluster* de différenciation 14

CD16 : *Cluster* de différenciation 16

CD36 : *Cluster* de différenciation 36

CD40L : Ligand du *cluster* de différenciation 40,

CD47 : *Cluster* de différenciation 47

CD68 : *Cluster* de différenciation 68

CD86 : *Cluster* de différenciation 86

CD206 : *Cluster* de différenciation 206

CETP : Protéine de transfert des esters de cholestérol

Chil3, YM-1 : *Chitinase-like 3*

CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II

COX-2 : Cyclooxygénase-2

CRP : Protéine C-réactive

Cu-LDLox : LDL oxydées par une molécule de cuivre

CV : Cardiovasculaire

CX3CR-1 : Récepteur aux chimiokines de type CX3C1

CXCR-1 : Récepteur aux chimiokines de type CXC1

CXCR-2 : Récepteur aux chimiokines de type CXC2

CXCR-4 : Récepteur aux chimiokines de type CXC4

DAMP : *Danger-associated molecular pattern*

eNOS : Oxyde nitrique synthase endothéliale

ERK-1 : *Extracellular signal-regulated kinase-1*

ERK-2 : *Extracellular signal-regulated kinase-2*

GAG : Glycosaminoglycanes

Gas6 : *Growth arrest-specific 6*

GHRP-6 : Peptide de relâche de l'hormone de croissance 6

HDL : Lipoprotéines de haute densité

HFHC : *High fat high cholesterol*

HMG-CoA : Hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A

HMGCR : Hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A reductase

HMOX-1 : Hème oxygénase 1

HODE : *Hydroxyoctadecadienoic acid*

IFN $\gamma$  : Interféron gamma

IgG : Immunoglobuline G

IDL : Lipoprotéines de densité intermédiaire

IL-10 : Interleukine-10

IL-12 : Interleukine-12

IL-13 : Interleukine-13

IL-18 : Interleukine-18

IL-1R : Récepteur à l'interleukine-1

IL-4 : Interleukine-4

IL-6 : Interleukine-6

iNOS : Oxyde nitrique synthase induite

IRAK : *Interleukin-1 receptor-associated kinases*

JAK-1 : *Janus kinase-1*

JAK-2 : *Janus kinase-3*

LCAT : *lecithin-cholesterol acyltransferase*

LDL : Lipoprotéines de faible densité

LDLac : Lipoprotéines de faible densité acétylée

LDLox : Lipoprotéines de faible densité oxydée

LDLR : Récepteur au LDL

LOX-1 : *Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor 1*

Lp(a) : Lipoprotéines a

LPL : Lipoprotéine lipase

LPS : Lipopolysaccharides

LXR $\alpha$  : *LiverX receptor alpha*



LXR $\alpha$  : *Liver X receptor bêta*

Ly6C : Antigène lymphocytaire 6C

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MD2 : *Myeloid differentiation factor 2*

MerTK : Tyrosine kinase Mer

MMP : Métalloprotéinases matricielles

MPO : Myélopéroxydase

MyD88 : *Myeloid differentiation primary response protein*

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NET : Pièges extracellulaires à neutrophiles

NF- $\kappa$ B : *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NO : Oxyde nitrique

PAMP : *Pathogen-associated molecular pattern*

PCSK-9 : Pro-protéine convertase subtilisine/kexine de type 9

PDGF : Facteurs de croissance dérivés des plaquettes

PGJ<sub>2</sub> : Prostaglandines J2

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PKB, AKT : Protéine kinase B

PPAR $\alpha$  : Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes alpha

PPAR $\gamma$  : Récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes gamma

PRR : Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires

PtdSer : Phosphatidylserine

RELM $\alpha$ , Fizz-1 : *Resistin-like molecule alpha*

RTC : Transport inverse du cholestérol

sCD40L : Forme soluble du ligand du *cluster* de différenciation 40

SR : Récepteur éboueur

SREBP : *Sterol regulatory element binding protein*

STAT-1 : *Signal transducer and activator of transcription 1*

STAT-2 : *Signal transducer and activator of transcription 2*

STAT-3 : *Signal transducer and activator of transcription 3*

Syk : *Spleen tyrosine kinase*

TGF $\beta$  : Facteur de croissance transformant bêta

Th : T auxiliaire

Th1 : T auxiliaire de type 1

TIMP : Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases matricielles

TLR : *Toll-like receptor*

TLR4 : *Toll-like receptor 4*

TNF $\alpha$  : Facteur de nécrose tumorale alpha

TRAM : *Translocation associated membrane proteins*

TRIF : *TIR domain-containing adaptor protein-inducing interferon bêta*

TSP-1 : Thrombospondine-1

VCAM-1 : Molécule d'adhérence cellulaire de type 1

VLDL : Lipoprotéines de très faible densité

*Je dédie ce mémoire*

*À ma famille, mes amis*

*et bien sûr, à Sylvie*

## **Remerciements**

D'abord un grand merci à ma directrice Sylvie Marleau, pour son soutien, ses encouragements, sa disponibilité et son expertise scientifique. Merci pour les nombreuses opportunités que vous m'avez offertes tout au long de ma maîtrise, et pour les nombreux gâteaux que nous avons partagés avec les gens du laboratoire. Je me rappellerai toujours de nos congrès, dont celui de l'EAS, et des vacances qui ont suivi.

Merci au Dr Ong pour son appui, son esprit critique et sa contribution à l'article scientifique inclus dans ce mémoire. Merci également aux Dr Lubell et Dre Febbraio pour leur implication. Merci aux autres coauteurs de l'article, principalement Roger, Hanan, Cloé, Katia, Liliane et Silas.

Une mention particulière aux membres du laboratoire, surtout Liliane, David, Dilan et Cloé, qui m'ont permis d'évoluer dans un milieu chaleureux et enrichissant. Merci encore à Liliane et David pour leur patience et pour m'avoir tout appris. Un autre merci à Cloé pour ses encouragements, sa contribution à mon article et son efficacité légendaire.

Merci aux membres de l'association étudiante, surtout Fatéma et Stéphanie. J'ai bien aimé m'impliquer et vous côtoyer.

Merci aux stagiaires que j'ai la chance d'encadrer lors de ma maîtrise, soit Selsabil, Yasmine, Jean-Christophe, Marie-Ève et Arielle. J'espère avoir réussi à vous transmettre mon intérêt pour la recherche.

Je remercie également de tout cœur mes amis et ma famille pour leur soutien constant. Je vous aime! Merci à ma mère d'avoir cru en moi depuis le premier jour, et encore aujourd'hui.



## **Chapitre 1 – Introduction et hypothèse de recherche**

### **1.1. Athérosclérose**

#### **1.1.1. Maladies cardiovasculaires**

À l'échelle mondiale, les maladies cardiovasculaires (CV) sont à l'origine de plus de décès que toutes autres maladies depuis plus de 30 ans (Ritchie H 2016). Bien que les principales causes de décès varient grandement selon les pays et groupes d'âge, les maladies CV et divers cancers dominent : en 2017, 31% des décès résultent de MCV et 17% de cancers. Il y a toutefois une évolution dans les causes de décès observées dans les pays à revenus élevés, où les décès dus aux cancers prédominent à présent, tandis que pour les pays à revenus moyens et faibles, les maladies CV dominent encore (Dagenais *et al.*, 2019). Cela s'explique notamment par une meilleure compréhension des facteurs de risques non modifiables, tels que l'âge, le sexe, la race et l'histoire familiale, et un meilleur contrôle des facteurs de risques modifiables comme l'usage du tabac, le diabète, l'hypertension artérielle et l'hypercholestérolémie dans les pays où l'accès aux services de santé est plus répandu (Wexler *et al.*, 2009).

L'ensemble des maladies de l'appareil circulatoire impose un lourd fardeau économique à la société. En effet, en 2010 au Canada, les coûts directs comme les dépenses en médicaments et les soins hospitaliers et indirects tels la valeur de la perte de production, y sont évalués à un peu plus de 13 milliards de dollars (GouvernementduCanada 2010), soit près de 10% de l'ensemble des dépenses annuelles en santé au pays.

Parmi les types de maladies CV les plus répandues, on compte les cardiopathies coronariennes (ischémiques), les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et les cardiomyopathies non ischémiques

L'incidence de maladies CV ischémiques est fortement alimentée par l'athérosclérose, une maladie inflammatoire des vaisseaux artériels (Sitia *et al.*, 2010). Définie comme une association entre une sténose (réduction de la taille de la lumière) et une perte d'élasticité des vaisseaux sanguins touchés, cette maladie multifactorielle est stimulée par des dommages causés à l'endothélium, l'oxydation et l'accumulation de lipides et une réaction inflammatoire au niveau de la paroi vasculaire (Salamat 2010).

Les athéromes sont des lésions dynamiques constituées de cellules endothéliales dysfonctionnelles, de cellules musculaires lisses prolifératives, de lymphocytes, de macrophages, de lipides et de cellules mortes. L'ensemble de ces cellules peut libérer des médiateurs inflammatoires, des *danger-associated molecular pattern* (DAMP), qui guideront l'évolution de la pathologie (Salamat 2010). Ces derniers sont discutés au point 1.1.3.2.

Plusieurs théories de l'athérogénèse ont été proposées au fil des années. Il a d'abord été avancé que les lipoprotéines plasmatiques pénètrent dans l'intima des vaisseaux en traversant l'endothélium, ce qui mène à la formation de dépôts lipidiques dans la paroi vasculaire (Virchow 1856), puis il a été découvert que la dysfonction endothéliale était à l'origine de l'infiltration des lipides; l'endothélium garde en effet son intégrité structurale, mais promeut l'inflammation par divers mécanismes (Ross *et al.*, 1977). Plus récemment, l'athérosclérose a été qualifiée de maladie inflammatoire chronique (Ross 1999, Libby 2002) ayant comme principal moteur l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (Steinberg *et al.*, 1989).

Les manifestations aiguës comme l'angine de poitrine et l'infarctus du myocarde (ou arrêt cardiovasculaire) se déclarent suivant la formation d'un caillot sanguin. En cas d'occlusion thrombotique d'un vaisseau épocardique, la zone non irriguée par le flot sanguin entre en ischémie : les cellules du muscle cardiaque sont alors privées d'oxygène et meurent par nécrose (Crowther 2005).



La formation d'un thrombus dans un vaisseau sanguin peut également provoquer un AVC lorsque l'embolie est transportée jusqu'au cerveau. Le flot sanguin doit être rapidement rétabli pour éviter la mort des cellules neuronales. Les AVC peuvent toutefois être d'origine hémorragique, quoique plus rarement (Crowther 2005).

D'autres organes peuvent être atteints et provoquer une dysfonction rénale, des anévrismes (gonflement de la paroi artérielle) au niveau de l'aorte abdominale, de l'hypertension, une ischémie critique des membres inférieurs (Hansson *et al.*, 2006) ou autre maladie vasculaire périphérique (Salamat 2010).

Les cardiomyopathies non ischémiques vont quant à elles causer un dysfonctionnement de la pompe cardiaque. Cette insuffisance cardiaque se produit lorsque le cœur est incapable de pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins en nutriments et oxygène de l'organisme. Cela peut être causé entre autres par un élargissement du ventricule gauche (cardiomyopathie dilatée), une hypertrophie du ventricule gauche (cardiomyopathie restrictive ou hypertrophique) ou une pathologie arythmogène. L'origine des cardiomyopathies non ischémiques est souvent inconnue. Celles-ci peuvent être dues à un défaut génétique (forme congénitale) ou être développées parallèlement à une autre pathologie (p. ex. diabète, syndrome métabolique, infection virale) (Maron *et al.*, 2006).

### **1.1.2. Facteurs de risque de l'athérosclérose**

L'athérosclérose se développe progressivement avec l'âge et de nombreux facteurs accélérant son déploiement ont été identifiés. Toutefois, les manifestations cliniques ne se déclarent que lorsque les lésions athérosclérotiques atteignent un certain seuil. Il est donc difficile de dépister les personnes qui y sont sujettes avant l'apparition de ces symptômes.

Les facteurs de risque constitutionnels ou non modifiables incluent l'histoire familiale, l'âge et le sexe (Salamat 2010). En effet, l'hypercholestérolémie familiale et le sexe masculin sont associés à un risque accru de maladies CV. Le sexe féminin est relativement protégé puisque les œstrogènes ont des propriétés anti-athérosclérotiques : elles stimulent la production de prostacycline et d'oxyde nitrique (*nitric oxide*, NO), deux substances vasodilatatrices dont la sécrétion par l'endothélium est diminuée au niveau des lésions d'athéroscléroses (Nathan *et al.*, 1997).

Les principaux facteurs de risque modifiables incluent les dyslipidémies, l'hypertension et diverses sources d'inflammation chronique comme le tabagisme, le diabète de type 2 et la sédentarité (Salamat 2010). La combinaison de plusieurs facteurs de risque accrut grandement le développement de lésion et ainsi le risque de complications cardiovasculaires.

#### **1.1.2.1. Dyslipidémies et athérosclérose**

Les dyslipoprotéïnémies font partie des facteurs de risques identifiés. Les lipides sont transportés dans la circulation sanguine liés à des apoprotéines spécifiques, formant des complexes de lipoprotéines. Les dyslipoprotéïnémies incluent l'augmentation du cholestérol LDL, diminution du cholestérol HDL et augmentation des lipoprotéines a (Lp(a)) modifiées. (Salamat 2010).

L'hypercholestérolémie est la dyslipidémie la plus prévalente. Elle est caractérisée par une augmentation des lipoprotéines de faible densité (*low density lipoproteins*, LDL) dans la circulation sanguine. Le rôle des LDL est de livrer le cholestérol aux tissus périphériques, par opposition aux lipoprotéines de haute densité (*high density lipoproteins*, HDL) qui mobilisent le cholestérol périphérique vers le foie. La forme familiale peut être causée par une mutation causant une perte de fonction dans le gène codant pour le récepteur au LDL (LDLR), une

mutation au niveau du gène codant pour l'apolipoprotéine B (apoB) exprimée par les molécules de LDL ou plus rarement, un gain de fonction au niveau du gène codant pour la pro-protéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK-9). Suivant son autoclivage, le rôle de cette convertase est de médier la dégradation du LDLR, limitant ainsi le recyclage de ce récepteur à la surface de la membrane cellulaire (Soutar *et al.*, 2007). La contribution de l'hypercholestérolémie dans l'athérosclérose a été démontrée sur plusieurs plans : le cholestérol et les esters de cholestérol sont les formes dominantes de lipides dans les plaques d'athéromes, l'hypercholestérolémie causée par le diabète est également associée à l'accélération de la progression de la maladie et la sévérité de l'athérosclérose corrèle avec les niveaux plasmatiques de cholestérol (Salamat 2010).

### **1.1.2.2. Hypertension et athérosclérose**

Le facteur de risque le plus souvent associé aux maladies CV est l'hypertension. La mesure de la pression artérielle prend deux phénomènes en compte : les pressions systolique et diastolique. La période où le cœur se contracte et pompe ainsi le sang vers les artères se nomme systole, alors que la partie du cycle où le cœur se relaxe suivant une contraction et où le sang remplit les ventricules est la diastole (Kannel *et al.*, 1971). Étant donné qu'en conditions homéostasiques la pression artérielle est largement plus élevée que la pression veineuse, 120/80 mmHg (pression systolique/diastolique) (Nerenberg *et al.*, 2018) comparé à 5-10 mmHg de pression veineuse centrale moyenne (Gelman 2008), les artères sont fortement plus affectées que les veines. Conséquemment, une augmentation de la pression artérielle induira plusieurs changements dans le système circulatoire (Beever *et al.*, 2001). En effet, il peut y avoir une hypertrophie du ventricule gauche, un épaississement du muscle cardiaque, une augmentation de la vasoconstriction, un dérèglement du transport d'ions (e.g., sodium, calcium) et une

prolifération de cellules musculaires lisses. De plus, l'hypertension augmente le stress mécanique et les forces de cisaillement que subit l'endothélium, ce qui contribue à son dysfonctionnement. L'hypertension est définie comme étant une élévation de la pression artérielle au-delà de 140/90 mmHg. Passé ce seuil, la relaxation musculaire est moins efficace à chaque battement et l'efficacité de la pompe cardiaque est significativement diminuée (Nerenberg *et al.*, 2018).

### **1.1.2.3. Inflammation systémique chronique et athérosclérose**

L'inflammation systémique chronique de bas grade est un facteur de risque additionnel important (Galkina *et al.*, 2009). L'expression de plusieurs marqueurs inflammatoires dans la circulation sanguine, dont la protéine C-réactive (*c-reactive* protein, CRP), corrèle avec le risque de développer une maladie cardiovasculaire ischémique. Produite par le foie, l'expression de CRP est augmentée par plusieurs cytokines, dont l'interleukine-6 (IL-6). La CRP augmente la réponse immunitaire innée en activant la cascade du complément (Salamat 2010) en plus de stimuler l'inflammation vasculaire. En effet, la fonction endothéliale corrèle inversement avec les niveaux de CRP dans le sérum (Fichtlscherer *et al.*, 2000).

D'autres marqueurs cliniques de l'inflammation ont été identifiés, soit le fibrinogène, les Lp(a) et l'homocystéine (Ridker *et al.*, 2001). Le fibrinogène est un facteur de coagulation qui sera converti par l'enzyme thrombine en fibrine, une composante majeure des caillots sanguins. La Lp(a) est une forme altérée du LDL comportant une portion de l'apoB associée à une apolipoprotéine (a) et contribue à l'accumulation de cholestérol dans l'intima des vaisseaux sanguins (Grainger *et al.*, 1994), alors que l'homocystéine endommage l'endothélium et stimule la prolifération des cellules musculaires lisses (Gerhard *et al.*, 1999). Ces substances

alimentent l'athérosclérose et perpétuent le cycle d'inflammation chronique caractéristique de la pathologie.

Le diabète de type II, caractérisé par une augmentation du glucose sanguin, est un facteur de risque important qui accélère le développement de l'athérosclérose (Beckman *et al.*, 2002). Par exemple, le diabète est associé à une augmentation de la formation de produits finaux de glycation avancée (advanced glycation end products, AGE). Ceux-ci vont contribuer à l'inflammation chronique de plusieurs façons. Entre autres, les AGE vont augmenter le stress oxydatif par la production d'espèces réactives d'oxygène et aggraver le dysfonctionnement endothélial en altérant la production de NO. De plus, l'hyperglycémie active la signalisation dépendante de la protéine kinase C (Gerald *et al.*, 2010). Cette dernière est associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire, de l'adhésion leucocytaire, de l'apoptose cellulaire et de la synthèse de matrice extracellulaire. Tous ces phénomènes contribuent à nourrir la pathologie d'athérosclérose.

Quant à l'usage de tabac, il diminue les taux circulants de HDL, reconnu pour son activité athéroprotectrice (détails au point 1.2.1.1.5).

Le syndrome métabolique, défini comme une combinaison de la résistance à l'insuline, l'hypertension, la dyslipidémie, l'hypercoagulabilité et un état inflammatoire) est un facteur de risque additionnel de l'athérosclérose. (Salamat 2010).

### **1.1.3. Progression des plaques d'athérosclérose**

#### **1.1.3.1. Athérogénèse**

Les premières stries lipidiques caractéristiques de l'athérosclérose apparaissent dès l'enfance (McGill *et al.*, 2000). Bien qu'elles ne soient pas cliniquement significatives, elles sont les précurseurs de lésions plus complexes et symptomatiques.

De nombreux mécanismes jouent un rôle dans la genèse de cette pathologie. Une dysfonction endothéliale provoquant une augmentation de la perméabilité vasculaire et facilitant l'accumulation de lipides dans l'intima des vaisseaux sanguins est l'un des éléments déclencheurs. L'endothélium exprime alors un grand nombre de molécules d'adhérence à sa surface, ce qui facilite le recrutement de monocytes présents dans la circulation. Les monocytes vont migrer dans l'espace sous-endothélial et s'y différencier en macrophages. Ces derniers vont internaliser les lipoprotéines gorgées de cholestérol présent dans l'intima via des récepteurs éboueurs (*scavenger receptor*, SR) et devenir des cellules spumeuses. Ces plaques athérosclérotiques vont se complexifier avec la progression de la maladie. En effet, des lymphocytes T et des cellules musculaires lisses vont être recrutés en réponse à l'état inflammatoire de l'athérome. Les cellules musculaires lisses vont proliférer et produire de la matrice extracellulaire qui sera à l'origine de la chape fibreuse délimitant un noyau nécrotique riche en cholestérol et débris cellulaires (Salamat 2010, Libby *et al.*, 2011).

##### **1.1.3.1.1. Dysfonction endothéliale**

Un endothélium vasculaire sain consiste en une monocouche de cellules endothéliales formant une barrière perméable entre le sang et les tissus. L'espace sous-endothélial comprend une tunique de cellules musculaires lisses impliquée dans le tonus et le remodelage vasculaire (Gimbrone 1999). Il répond à de nombreux stimuli vasoconstricteurs, comme l'endothéline et

l'angiotensine II, de même qu'à des substances vasodilatatrices telles le NO et la prostacycline (Davignon *et al.*, 2004).

Un des premiers signes de l'athérosclérose est une diminution de NO produit par les cellules endothéliales associées à un durcissement de la paroi vasculaire. C'est l'oxyde nitrique synthase endothéliale (*endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) qui forme le NO à partir de son précurseur, la L-arginine. Le NO a un effet relaxant sur les cellules musculaires lisses, ce qui le rend essentiel à la régulation de l'homéostasie de la paroi vasculaire (Sitia *et al.*, 2010). Une diminution de NO favorisera la vasoconstriction et l'épaississement du vaisseau sanguin, contribuant ainsi au développement de maladies coronariennes (Fichtlscherer *et al.*, 2000).

Les perturbations hémodynamiques et l'hypercholestérolémie sont les principales causes de dysfonction endothéliale (Salamat 2010). Il est répertorié que les premières lésions athérosclérotiques se développent au niveau des bifurcations et coudes que forment les artères, là où le flot sanguin est non-laminaire, et la pression plus grande. Les vaisseaux les plus touchés sont la partie inférieure de l'aorte, les artères coronaires, les artères poplitées, la carotide interne et le polygone de Willis au niveau cervical (Salamat 2010). Ce sont les forces de cisaillement, parallèles au flot sanguin, qui influencent la forme et la structure des cellules endothéliales. Là où le flot est laminaire et uniforme, les cellules sont de forme allongées et orientées vers la lumière, tandis que lorsque les contraintes de cisaillement sont élevées, les cellules sont de formes polygonales et non orientées (Nagel *et al.*, 1999). Un endothélium dysfonctionnel aura une expression génique altérée et une adhérence leucocytaire augmentée. En effet, une large quantité de molécules d'adhérences cellulaires vasculaires de type 1 (*vascular cell adhesion molecule 1*, VCAM-1) est exprimée, un élément essentiel au recrutement des monocytes en circulation (Crowther 2005, Ohashi *et al.*, 2005).

D'autre part, les mécanismes sous-jacents à l'hypercholestérolémie contribuent également à l'athérosclérose : l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène induit la dysfonction de l'endothélium, accélère la dégradation du NO et promeut l'oxydation du LDL (Salamat 2010).

Ainsi, une variété de phénomènes vont endommager l'endothélium, ce qui va augmenter sa perméabilité, l'agrégation plaquettaire, l'adhésion de leucocytes mononucléés et la sécrétion de cytokines (Davignon *et al.*, 2004), en plus d'augmenter le stress oxydatif.

#### **1.1.3.1.2. Recrutement des leucocytes sanguins**

Les leucocytes polymorphonucléaires (PMN) jouent un rôle important dans la réponse initiale de l'inflammation. Bien que les neutrophiles sont les leucocytes polymorphonucéaires les plus abondants dans la circulation sanguine, ils sont rarement détectés au niveau des plaques d'athérosclérose (Baetta *et al.*, 2010). Cela est principalement dû à leur courte demi-vie, contrairement aux macrophages dont la durée de vie est beaucoup plus grande (Summers *et al.*, 2010). Toutefois, ils contribuent grandement à l'inflammation des vaisseaux puisqu'ils sécrètent des granules riches en enzymes qui vont activer monocytes, macrophages et cellules dendritiques. De plus, il a été démontré que la taille des lésions et la sévérité de la dysfonction de l'endothélium corrélient avec l'augmentation des neutrophiles circulants (Soehnlein 2012). Mis à part la sécrétion de médiateurs inflammatoire, les neutrophiles facilitent également l'entrée des monocytes dans l'intima des artères (Soehnlein *et al.*, 2009). L'infiltration des monocytes dans la paroi vasculaire est non seulement médiée par des molécules d'adhérence, mais également par les facteurs chimiotactiques sécrétés par les lymphocytes T, macrophages, neutrophiles et cellules endothéliales (Tabas *et al.*, 2017).



La première étape dans l'adhérence leucocytaire au vaisseau sanguin est leur roulement à la surface endothéliale. Ce phénomène est médié par une interaction entre les sélectines P et E de l'endothélium et le *p-selectin glycoprotein ligand 1* (PSGL-1) exprimés par les monocytes (Dong *et al.*, 1998). L'adhérence des monocytes à l'endothélium est ensuite orchestrée par la liaison d'intégrines leucocytaires, dont le *very late antigen 4* (VLA-4), avec VCAM-1 et les fibronectines de l'endothélium (Shih *et al.*, 1999). Une autre molécule de la superfamille des immunoglobulines, la molécule d'adhérence intercellulaire de type 1 (*intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) joue également un rôle dans cet adhérence lâche en se liant à l'intégrine *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) (Collins *et al.*, 2000). D'autres interactions, incluant la liaison de la chimiokine motif c-c-ligand 2 (CCL-2, MCP-1) avec son récepteur chimiokine motif c-c-récepteur 2 (CCR-2) et la chimiokine motif c-c-ligand 5 (CCL-5, RANTES) avec son récepteur chimiokine motif c-c-récepteur 5 (CCR-5), vont contribuer à l'activation et l'adhérence ferme des monocytes à la surface du vaisseau sanguin (Boring *et al.*, 1998, Gu *et al.*, 1998). Les leucocytes vont ensuite pouvoir transmigrer entre les cellules endothéliales par diapédèse dans l'intima du vaisseau sanguin (Shaw *et al.*, 2001).

Au sein du sous-endothélium, le facteur stimulant les colonies de macrophages (M-CSF) et le facteur stimulant les colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) vont stimuler la prolifération et la différenciation des PMN et des monocytes recrutés en macrophages (Smith *et al.*, 1995) (Haghighat *et al.*, 2007). Les macrophages activés vont adapter leur phénotype en fonction de leur environnement. Ce point est détaillé à la section 1.3.2.

#### **1.1.3.1.3. Accumulation et oxydation du LDL dans l'intima**

Le LDL présent dans la circulation sanguine va diffuser de façon passive entre les jonctions des cellules endothéliales. Ce phénomène est d'autant plus important en condition

d'hypercholestérolémie et lorsque l'endothélium est dysfonctionnel, puisque sa perméabilité s'en trouve augmentée. La rétention du LDL dans l'intima implique la liaison des LDL avec les protéoglycanes de la matrice extracellulaire du vaisseau sanguin (Lusis 2000). Cela est dû aux interactions entre les résidus lysine et arginine de l'apoB-100 du LDL et les groupements carboxyles chargés négativement des glycosaminoglycanes constituant les protéoglycanes (Boren *et al.*, 1998). Le LDL ainsi retenu va subir des modifications chimiques, principalement de l'oxydation, mais également de la lipolyse ou protéolyse. L'oxydation peut être orchestré par plusieurs enzymes, incluant les 12/15-lipoxygénases, les myéloperoxydases (MPO), les nicotinamides adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydases, et l'oxyde nitrique synthase induite (*induced nitric oxide synthase*, iNOS) provenant des cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et macrophages (Li *et al.*, 2002). De plus, la présence d'espèces réactives de l'oxygène sécrétées par les cellules inflammatoires accumulées dans l'endothélium dysfonctionnel contribue à la formation de LDLox. En effet, les macrophages vont libérer diverses espèces réactives de l'oxygène antimicrobiennes lors d'une activation de l'immunité innée (Babior 2000). Les LDLox présentes dans la circulation sanguine peuvent également pénétrer l'endothélium via le récepteur *Lectin-like Oxidized LDL receptor 1* (LOX-1). Ce stimulus pro-inflammatoire contribue à l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence et de chimiokines, perpétuant ainsi le cycle de recrutement de leucocytes mononucléés (Hansson *et al.*, 2006).

La forme oxydée du LDL est particulièrement athérogène puisqu'elle est rapidement internalisée par les SR des cellules environnantes, en plus d'être un stimulus chimiotactique pour le recrutement et l'activation de monocytes (Cushing *et al.*, 1990). Une hypothèse avance qu'au début de la pathologie d'athérosclérose, les LDL minimalement modifiés (LDL-mm) seraient responsables de la réaction inflammatoire des lipoprotéines, puisque d'une part ils

traversent facilement les parois vasculaires, et d'autre part, contrairement aux LDLox, les LDL-mm ne sont pas rapidement internalisés par les macrophages via les récepteurs éboueurs *cluster* de différenciation 36 (CD36), SR-A et LOX-1 (Itabe *et al.*, 2011). En effet, c'est plutôt une fois oxydé que les LDL vont contribuer à la formation de cellules spumeuses. L'internalisation de LDLox par les macrophages active plusieurs voies de signalisations. Notamment, la liaison du LDLox aux récepteurs éboueurs va stimuler la sécrétion de cytokines inflammatoires via la voie NK- $\kappa$ B. Cependant, l'activation du récepteur CD36 par le LDLox va également activer la transcription des proliférateurs de peroxyosomes gamma (*peroxisome proliferator activated receptor*, PPAR $\gamma$ ) qui favorisent l'efflux de cholestérol et l'efférocytose. Ces phénomènes sont détaillés aux points 1.4.4 à 1.4.6 et les voies de signalisation propres au récepteur CD36 sont détaillées au point 1.6.3.

#### **1.1.3.1.4. Formation de cellules spumeuses et stries lipidiques**

Les lésions et plaques athérosclérotiques ont été discriminées histologiquement et sous-divisées en 6 sous-types (Stary *et al.*, 1995). Les lésions initiales sont de type I et sont formées par des amas de cellules spumeuses. L'accumulation de lipides intracellulaires (principalement, de LDLox) forme les stries lipidiques, soit le type II. Une lésion intermédiaire (type III) est constituée de stries lipidiques avec des agglomérats de lipides extracellulaires. Ces 3 sous-types n'ont pas de conséquences cliniques, ce qui les rend difficilement détectables. Les premiers signes cliniques peuvent survenir suite à la formation accrue d'athéromes matures (IV), lesquels ont de larges dépôts lipidiques extracellulaires au sein de l'intima des vaisseaux sanguins touchés. Les plaques plus complexes, telles les plaques fibreuses (V) et plaques rupturées (VI), sont dues à la progression de la pathologie.

Ainsi, les lésions initiales sont formées suite à l'accumulation d'agrégats de LDL modifiées dans l'espace sous-endothélial qui sont internalisés par endocytose et phagocytose au moyen de SR exprimés par plusieurs types de cellules. Comme mentionné précédemment, ce sont principalement des cellules musculaires lisses et macrophages qui captent le LDLox, mais également des cellules dendritiques (Moore *et al.*, 2006). En effet, le GM-CSF induit la prolifération des cellules dendritiques au niveau des lésions d'athérosclérose où ces dernières vont endosser des rôles semblables aux macrophages, soit produire des cytokines pro-inflammatoires, aider au recrutement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et contribuer à l'induction du phénotype Th1 (Weber *et al.*, 2011). L'ingestion chronique de lipides par les cellules musculaires lisses, macrophages et cellules dendritiques va mener à la formation de cellules spumeuses. Bien qu'au début de la pathologie les souris ont une mince couche de cellules musculaires lisses aux sites de formation des lésions, il a été découvert que les celles-ci sont à l'origine des cellules spumeuses dans l'intima des artères humaines, tout comme les macrophages (Allahverdian *et al.*, 2012). Le *cluster* de différenciation 68 (CD68) a d'ailleurs longtemps été utilisé comme marqueur pour identifier les macrophages, mais il a été découvert que les cellules musculaires lisses ayant internalisé des lipides vont également l'exprimer. En effet, les cellules musculaires lisses retrouvées dans l'intima de vaisseaux prompts au développement de lésions athérosclérotiques acquièrent des propriétés phagocytaires et sécrétoires en réponse aux cytokines, facteurs dérivés des plaquettes et facteurs de croissance transformants bêta (*transforming growth factor*  $\beta$ , TGF $\beta$ ) produits par les cellules endothéliales, plaquettes, macrophages et cellules musculaires lisses (Rong *et al.*, 2003). De plus, contrairement aux cellules musculaires lisses de la média, les cellules musculaires lisses s'infiltrant dans l'intima dans la pathologie d'athérosclérose ont une capacité de contraction moindre (Allahverdian *et al.*, 2012). Additionnellement, tout comme les macrophages, les

cellules musculaires lisses vont avoir une expression augmentée des principaux SR liant le LDLox, soit SR-A et CD36, aussi connu sous le nom de SR-B2 (Collot-Teixeira *et al.*, 2007, Kzhyshkowska *et al.*, 2012).

Les macrophages expriment une large gamme de récepteurs éboueurs. Outre SR-A et CD36, il y a le LOX-1, CD68 et récepteur éboueur B1 (SR-B1), bien que leur rôle dans la formation de cellules spumeuses soit moindre (Kzhyshkowska *et al.*, 2012). De plus, bien que le LDLR est également exprimé chez les macrophages et cellules musculaires lisses, il ne contribue pas significativement à la formation de cellules spumeuses. L'internalisation de LDL provoque la séquestration du facteur de transcription *Sterol Regulatory Element Binding Protein* (SREBP), ce qui diminue l'expression de LDLR à la surface des macrophages. Cette régulation négative minimise ainsi la contribution du LDL naïf dans l'athérogénèse (Horton *et al.*, 1999). Le métabolisme des lipides est détaillé au point 1.2.

D'autre part, les macrophages ayant internalisé une grande quantité de lipides deviennent moins mobiles, en plus de sécréter des cytokines et médiateurs inflammatoires en réponse à divers stimuli provenant des cellules immunitaires ayant infiltré l'endothélium. La contribution des cellules de l'immunité innée et acquise est détaillée au point 1.1.3.2.1.

Bien qu'il existe plusieurs mécanismes cellulaires pour réguler l'influx et l'efflux de LDL modifiées dans les vaisseaux sanguins, on observe une dérégulation de cette balance qui va mener à la formation de cellules spumeuses riches en lipides dans l'athérosclérose. Une déficience du transport inverse du cholestérol (*Reverse Cholesterol Transport*, RTC) peut être due à un défaut de fonctionnement des transporteurs *ATP-Binding Cassette A1* (ABCA-1) et *G1* (ABCG-1) (détails dans section 1.4.5.) (Galkina *et al.*, 2009).

Ainsi, une internalisation excessive de lipides par les macrophages induit leur apoptose. Bien que l'augmentation de l'apoptose en soi n'est pas athérogénique, elle contribue au

dysfonctionnement des mécanismes de clairance des cellules apoptotiques (Galkina *et al.*, 2009). En effet, au début de la pathologie, l'efférocytose, un mécanisme de clairance des cellules mortes et débris cellulaires par les macrophages via des SR, est intact. Toutefois, dans la pathologie avancée, cette fonction fait défaut, menant à l'accumulation de cellules mortes, ce qui provoque une nécrose secondaire et la formation de noyau nécrotique (Nagenborg *et al.*, 2017). L'apoptose est la mort programmée de la cellule médiée par les caspases, par contraste avec la nécroptose qui est indépendante des caspases, et est provoquée par l'activation de diverses cascades par des cytokines, pathogènes, *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP) ou DAMP (Vanlangenakker *et al.*, 2012). La nécrose primaire est la mort non contrôlée de la cellule et est caractérisée par la perte de l'intégrité membranaire. Quant à la nécrose secondaire elle se produit lorsqu'une cellule en apoptose n'est pas phagocytée de façon efficace et que la membrane cellulaire perd son intégrité. La capacité apoptotique des macrophages est perturbée par l'internalisation excessive de lipides. La réponse inflammatoire est alors perpétuée, ce qui engendre des signaux apoptotiques pour les cellules musculaires lisses, cellules endothéliales et leucocytes dans la plaque (Galkina *et al.*, 2009).

L'accumulation de cellules riches en lipides mène à l'apparition de stries lipidiques. Celles-ci sont composées d'amas cellulaires (cellules musculaires lisses, macrophages, lymphocytes T), lipidiques (LDL modifiées, cholestérol et ses esters) et matrice extracellulaire (collagène, fibres d'élastine, protéoglycanes) (Salamat 2010).

#### **1.1.3.1.5. Plaques fibreuses**

Avec l'âge, l'athérome formé évolue en une plaque plus complexe, notamment via la synthèse de matrice extracellulaire que se forme une chape fibreuse. C'est par la prolifération

de cellules musculaires lisses au niveau de l'intima que les stries lipidiques se transforment en un athérome mature.

Comme mentionné précédemment, les cellules musculaires lisses que l'on retrouve dans la plaque acquièrent un phénotype sécrétoire et une capacité proliférative. Ces cellules sont dites synthétiques, par opposition à leur statut contractile physiologique. D'une part, les PDGF et le facteur de croissance des fibroblastes stimulent la synthèse de matrice extracellulaire (dont le collagène) par les cellules musculaires lisses, ce qui stabilise le noyau nécrotique. D'autre part, l'activation des cellules inflammatoires dans l'athérome favorise la dégradation de la matrice extracellulaire sous l'action de protéases comme la collagénase, gélatinase et stromolysine qui fragilisent la plaque (Galis *et al.*, 1994). De plus, un phénomène de néovascularisation se déroule en périphérie des lésions. On retrouve également certains athéromes en état de calcification (Salamat 2010) (Adiguzel *et al.*, 2009).

Les plaques fibreuses sont caractérisées par une masse de lipides extracellulaires, débris de cellules mortes, cellules spumeuses, fibrine et thrombus. On y retrouve également des cytokines et facteurs de croissance sécrétés par les macrophages et lymphocytes T qui sont importants pour la migration et prolifération des cellules musculaires lisses et la production de matrice extracellulaire (Lusis 2000). L'endothélium dysfonctionnel va également stimuler le système rénine-angiotensine II (Husain *et al.*, 2015), qui augmente l'angiotensine II et favorise ainsi la croissance et migration de cellules musculaires lisses (Lusis 2000). L'épaississement de la chape fibreuse aura des effets opposés dans la pathologie : d'un côté elle va contribuer à l'obstruction de la lumière des vaisseaux, tandis que de l'autre, elle stabilise la plaque et la rend ainsi moins prompte à se rompre (Newby *et al.*, 1999).

#### 1.1.3.1.6. Rupture de la plaque et autres complications

La présence d'un athérome mature peut mener à diverses complications. Ces événements vont notamment dépendre de la localisation et de la composition de la plaque, mais également de la pression sanguine et réactivité plaquettaire du vaisseau touché.

Plusieurs facteurs peuvent contribuer à la rupture d'un athérome vulnérable. Par exemple, une mince chape fibreuse, un large noyau nécrotique, une accumulation de cellules inflammatoires, la perte de tissus élastiques et un endothélium endommagé vont tous promouvoir l'érosion de la plaque (Kullo *et al.*, 1998). De plus, un vaisseau sanguin ayant perdu son intégrité ne pourra plus subir le stress mécanique généré par les forces de cisaillement induites lors d'une vasoconstriction. Conséquemment, le débalancement entre la production de facteurs vasoconstricteurs comme l'endothéline et les agonistes adrénergiques, et celle de facteurs vasodilatateurs comme le NO, va également favoriser le développement de complications cardiovasculaires (Salamat 2010).

La chape fibreuse joue le rôle clef de barrière entre le contenu de la plaque athérosclérotique et les composantes du sang. L'un des éléments majeurs formant la chape est le collagène sécrété par les cellules musculaires lisses ayant infiltré l'intima du vaisseau. Le collagène contribue grandement à la force mécanique et la stabilité de la chape fibreuse. Il peut toutefois être dégradé par des métalloprotéinases matricielles (*matrix metalloproteinase*, MMP), des enzymes sécrétées par les macrophages et cellules musculaires lisses au sein de la plaque athérosclérotique (Galis *et al.*, 1995, Newby *et al.*, 2009). De plus, les lymphocytes T ayant infiltré la plaque vont produire de l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) qui inhibera la production de matrice extracellulaire par les cellules musculaires lisses. Parallèlement, de nombreuses cellules au sein des lésions vont sécréter des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases matricielles (*tissue inhibitor of metalloproteinase*, TIMP) dans le but de moduler l'activité des



métalloprotéinases matricielles (Orbe *et al.*, 2003). La réaction inflammatoire chronique caractéristique de la pathologie va cependant favoriser la dégradation et la diminution de la synthèse du collagène, ce qui déstabilise la chape fibreuse.

La rupture d'un athérome aura diverses conséquences en fonction de l'état et la localisation du vaisseau touché. D'une part, l'érosion de la plaque expose le collagène de l'espace sous-endothélial aux substances thrombogéniques du sang, ce qui active la voie intrinsèque de la coagulation (Ananyeva *et al.*, 2002). Les principaux acteurs impliqués dans la formation d'un thrombus sont les plaquettes, les facteurs de coagulations comme la thrombine, mais également la fibrine (Furie *et al.*, 2008). Toutefois, la thrombogénicité dans un contexte d'athérosclérose dépend d'abord du facteur tissulaire, une enzyme qui catalyse la voie extrinsèque de la coagulation. Le facteur tissulaire est sécrété par les cellules musculaires lisses et fibroblastes, qui ne sont pas exposés à la circulation sanguine en condition physiologique. Cependant, lorsqu'une plaque athérosclérotique rupture, le contenu hautement thrombogénique est alors en contact avec les plaquettes et facteurs de coagulation sanguins. D'autre part, un endothélium endommagé favorise le recrutement de plaquettes qui vont adhérer à la paroi du vaisseau sanguin et sécréter des granules, ce qui induit l'agrégation d'autres plaquettes. La synthèse de facteur tissulaire par les plaquettes agrégées activées va alors contribuer à la formation d'un caillot sanguin ou thrombus (Badimon *et al.*, 2014). De là, les complications possibles sont nombreuses; micro-embolie dû au largage de débris athérosclérotiques dans la circulation sanguine, occlusion thrombotique au niveau des vaisseaux épicaudiques (infarctus du myocarde), AVC, etc. (Ferro 2003). Dans la majorité des cas, l'infarctus du myocarde est dû à un thrombus au niveau de l'artère coronarienne descendante gauche, bien que l'atteinte peut se faire à d'autres niveaux du vaisseau (Davies *et al.*, 1976). Quant aux thrombus non occlusifs, bien qu'en apparence asymptomatique, ils favorisent tout de même le développement de

complications cardiovasculaires puisqu'ils impliquent l'activation plaquettaire et l'élaboration de facteurs de croissance dérivés des plaquettes (*platelet-derived growth factor*, PDGF) (Crowther 2005). Les macrophages, fibroblastes et cellules endothéliales endommagées vont également sécréter des PDGF, ce qui promeut la croissance des cellules musculaires lisses (Andrae *et al.*, 2008).

Un athérome dont la chape fibreuse reste intègre promeut tout de même de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Avec la progression de la maladie, le noyau central composé de stries lipidiques s'élargit vers la lumière du vaisseau qui s'en retrouve alors diminuée. Dans les petites artères, le flot sanguin est rapidement compromis et cause des dommages ischémiques. Au niveau cardiaque, une interruption soudaine du flot sanguin suivant la perturbation d'une plaque d'athérosclérose mènera rapidement les cellules épocardiques en ischémie, puis en nécrose (Crowther 2005).

De plus, comme mentionné précédemment, on observe une néovascularisation dans certaines plaques avancées. Les hémorragies intraplaque sont possiblement dues à la rupture de ces petits vaisseaux sanguins qui ont proliféré au sein des lésions (Lusis 2000, Crowther 2005).

Les complications cardiovasculaires susmentionnées découlant de l'athérosclérose ont toute une composante inflammatoire importante. Cela est dû aux enchaînements de stimuli pro-inflammatoires et plus particulièrement, à la perte d'équilibre entre les mécanismes atténuant l'inflammation et la sécrétion de médiateurs inflammatoires par les cellules immunitaires (Back *et al.*, 2019).

### 1.1.3.2. Réponse inflammatoire

#### 1.1.3.2.1. Rôle de l'immunité innée/adaptative

Le système immunitaire se divise en deux branches. D'une part, l'immunité innée, constituée de barrières physiques, de cellules immunes telles les macrophages et cellules dendritiques, et d'autre part, l'immunité adaptative, dotée d'une réponse humorale et mémoire immunologique médiée par les lymphocytes B, et d'une réponse cellulaire dirigée par les lymphocytes T (Parham *et al.*, 2015).

Les principales cellules de l'immunité innée sont impliquées dans la réponse inflammatoire aiguë. Les premières d'entre elles à coloniser le site endommagé, les neutrophiles, sont des granulocytes qui vont éliminer les agents pathogènes en libérant des médiateurs comme des espèces réactives de l'oxygène et des pièges extracellulaires à neutrophiles (*neutrophil extracellular trap*, NET) (Rosales 2018). En fonction de leur phénotype, les macrophages contribuent fortement à la réponse immune innée inflammatoire, mais également à sa résolution. Leur microenvironnement va influencer leurs fonctions immunologiques. En effet, selon les stimuli, les macrophages jouent des rôles aux antipodes, soit M1 – inflammatoire, ou M2, anti-inflammatoire. Toutefois, cette vision simplifiée des diverses fonctionnalités des macrophages ne reflète pas leur plasticité *in vivo* (Allahverdian *et al.*, 2012, Moore *et al.*, 2013, Martinez *et al.*, 2014). Une caractérisation plus exhaustive de ces cellules est faite au point 1.3. Les cellules *natural killer* font partie des cellules effectrices de l'immunité innée. Elles produisent de l'IFN $\gamma$  de façon précoce en situation inflammatoire et induisent également la nécroptose de cellules infectées en libérant des enzymes comme la perforine et la granzyme, et des cytokines inflammatoires, dont le facteur de nécrose tumorale alpha (*tissue necrosis factor alpha*, TNF $\alpha$ ) (Selathurai *et al.*, 2014). Un autre type cellulaire est la cellule dendritique qui fait le pont entre l'immunité innée et l'immunité acquise. Les cellules dendritiques sont

présentes dans les organes lymphoïdes et les tissus périphériques où ils vont stimuler les lymphocytes T naïfs de l'immunité acquise en tant que cellules présentatrices d'antigènes exprimant le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) (Chistiakov *et al.*, 2014). Plusieurs cellules immunitaires expriment des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (*pattern recognition receptor*, PRR), dont font partie les *toll-like receptor* (TLR) et les SR qui vont reconnaître et permettre d'éliminer ces molécules de danger. Dans l'athérosclérose, la réponse inflammatoire de l'immunité innée va endommager l'hôte si elle n'est pas contrôlée. Cette inflammation est considérée comme stérile, puisqu'elle est due à des DAMP par opposition aux PAMP, bien que ceux-ci contribuent certainement à la progression de la maladie (Seneviratne *et al.*, 2012). Dans un contexte d'athérosclérose, plusieurs DAMP endogènes contribuent à la pathogenèse par l'activation du système immunitaire inné, notamment les cristaux de cholestérol et produits d'oxydation, comme les LDLox. La détection des épitopes spécifiques à l'oxydation de ces molécules se fait par les PRR des cellules de l'immunité innée. Des épitopes spécifiques à l'oxydation sont constamment générés lorsque les molécules de LDL sont oxydées et lorsque des cellules meurent dans l'intima des vaisseaux. Les PRR des macrophages, les récepteurs éboueurs CD36 et SR-A, vont reconnaître les épitopes spécifiques à l'oxydation exprimés par des cellules apoptotiques et débris cellulaires et les phagocytiser (Miller *et al.*, 2011, Witztum *et al.*, 2014).

La réponse immunitaire adaptative a deux volets. La voie humorale médiée par les lymphocytes B, et la voie cellulaire médiée par les lymphocytes T. Leur réponse est induite par la reconnaissance de différentes structures moléculaires par les récepteurs des lymphocytes. Sur les lymphocytes B, ces récepteurs sont les immunoglobulines, tandis que sur les lymphocytes T, ce sont les récepteurs des cellules T (Galkina *et al.*, 2009, Parham *et al.*, 2015).

L'immunité acquise joue également un rôle dans l'athérogénèse. Brièvement, le recrutement des lymphocytes T au sein d'un endothélium dysfonctionnel est médié par la reconnaissance de chimiokines que sécrètent les cellules vasculaires. Tout comme les macrophages, les lymphocytes T peuvent adopter différents phénotypes selon le stimulus. Dans un contexte d'athérosclérose, les principaux lymphocytes impliqués sont les cellules T auxiliaires (*T helper*, Th) et les T régulateurs (Treg) qui expriment le marqueur *cluster* de différenciation 4 (CD4). Une première activation de ces cellules a lieu dans la lymphe et dans les organes lymphoïdes secondaires, suivant la présentation d'antigène par d'autres cellules immunitaires comme les cellules dendritiques. De là, les lymphocytes vont pénétrer dans les lésions via divers récepteurs aux chimiokines. Le principal phénotype retrouvé dans les plaques humaines et murines est les lymphocytes T auxiliaires de type I (Th1). Ces lymphocytes vont sécréter des médiateurs pro-inflammatoires, dont les cytokines IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ , mais également des chimiokines, dont le ligand du *cluster* de différenciation 40 (CD40L). Bien que le phénotype Treg soit davantage athéroprotecteur étant donné leur sécrétion de cytokines anti-inflammatoires interleukine 10 (IL-10), l'effet net des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> promeut l'athérogénèse (Hansson *et al.*, 2006, Tabas *et al.*, 2017). Tout comme une réponse immune innée persistante va endommager l'hôte, la suractivation du système adaptatif dans l'athérosclérose a le potentiel de dégrader les tissus.

Bref, des dommages cellulaires dus à des stimuli endogène ou exogène vont induire une réponse inflammatoire par le système immunitaire qui peut s'aggraver en inflammation chronique, comme dans l'athérosclérose, si elle n'est pas résolue (Witztum *et al.*, 2014).

#### 1.1.3.2.2. Inflammation chronique

Comme mentionné précédemment, l'accumulation de cristaux de cholestérol et d'acides gras libres dans les macrophages et autres cellules immunitaires sont d'importants stimuli inflammatoires dans l'athérosclérose. Cependant, de nombreuses autres molécules au sein des lésions athérosclérotiques sont perçues par les phagocytes comme des DAMP, dont les corps nécrotiques, les produits de la dégradation de la matrice extracellulaire et les *heat shock proteins* (Zimmer *et al.*, 2015). De surcroît, la motilité des macrophages est compromise dans l'espace sous-endothélial due à la présence de matrice extracellulaire synthétisé par l'endothélium et les cellules musculaires lisses. En conséquence, leur capacité à reconnaître et à éliminer efficacement les cellules en apoptose, soit l'efférocytose, est réduite. En situation physiologique, la production de cytokines et autres médiateurs inflammatoires a pour ultime objectif de recruter des cellules immunitaires afin de contrôler l'inflammation et de favoriser la réparation tissulaire. Ces mécanismes, étroitement régulés, ne fonctionnent pas de façon optimale aux sites de formation des lésions athérosclérotiques. L'enchaînement de cascades inflammatoires non résolues qui en découle contribue à la progression des athéromes, ce qui fait de l'athérosclérose une maladie inflammatoire chronique (Ross 1999, Lusis 2000, Libby 2002).

En effet, de nombreuses voies de signalisation vont nourrir l'inflammation stérile dans l'athérosclérose. L'expression de VCAM-1 par l'endothélium dysfonctionnel augmente le recrutement de monocytes et lymphocytes T; les monocytes recrutés sécrètent alors des CCL-2 qui contribuent au recrutement et à l'activation d'autres leucocytes et au recrutement et à la prolifération de cellules musculaires lisses au sein de l'intima (Deshmane *et al.*, 2009). De plus, puisque les cellules endothéliales et macrophages ont une augmentation de l'expression et de l'hétérogénéité des TLR et SR, l'activation de ces récepteurs va à son tour nourrir une multitude

de cascades intracellulaires inflammatoires. Les ligands des TLR sont nombreux, incluant plusieurs PAMP, mais également des molécules endogènes comme les heat-shock proteins et le LDLox qui lient le complexe *cluster* de différenciation 14 (CD14) – *toll-like receptor 4* (TLR4) et activent les voies de *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF-κB) et *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Stewart *et al.*, 2010). Ces cascades induisent la traduction de gènes codants pour d'autres médiateurs inflammatoires, qui à leur tour vont s'accumuler dans l'athérome. La résultante, une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires tels IL-1, IL-6 et TNFα par les macrophages, cellules musculaires lisses et cellules endothéliales, va favoriser l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la sécrétion de chimiokines comme CCL-2 et CCL-5 qui permettent le recrutement de monocytes à l'endothélium, l'activation du phénotype classique inflammatoire des macrophages, en plus de stimuler directement les voies de NF-κB et MAPK (Hansson *et al.*, 2006, Galkina *et al.*, 2009). Quant à l'activation de l'inflammasome, il requiert 2 signaux. Le premier stimulus est un amorçage et consiste en l'activation de la voie NF-κB via les PRR, tandis que le deuxième va induire l'assemblage et l'activation de la cascade de l'inflammasome NLRP-3, qui à son tour active la caspase-1 et la relâche d'IL-1β (Kelley *et al.*, 2019). Les signaux activateurs sont nombreux et inclus les flux ioniques et les espèces réactives de l'oxygène. Les ligands et voies de signalisation des SR, plus particulièrement du CD36 qui est fortement exprimé par les macrophages, sont détaillés au point 1.4.

Plusieurs autres marqueurs inflammatoires sont présents dans la plaque, dont la forme soluble du CD40L (sCD40L) (Schonbeck *et al.*, 2000), l'interleukine 18 (IL-18), l'interleukine 12 (IL-12) (Lee *et al.*, 1999) et l'IFNγ (Gupta *et al.*, 1997). Ces médiateurs jouent divers rôles dans la mitogénèse, la synthèse de matrice extracellulaire, l'angiogénèse et le développement

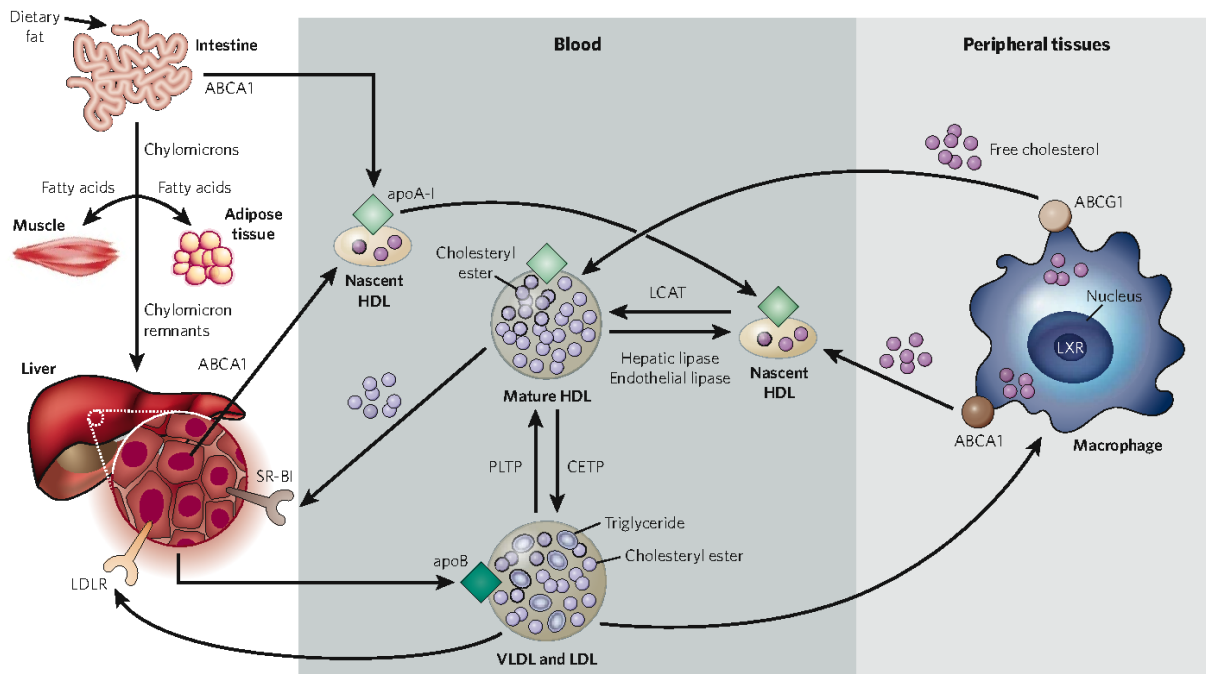
de cellules spumeuses en agissant notamment sur les lymphocytes T, macrophages et cellules musculaires lisses (Crowther 2005).

Cependant, les cellules immunitaires sécrètent également des cytokines et chimiokines anti-inflammatoires, comme les interleukines 4 (IL-4), IL-10 et interleukine 13 (IL-13), dans le but de résoudre l'inflammation et réparer les tissus nécrosés (Mallat *et al.*, 1999, King *et al.*, 2002, Cardilo-Reis *et al.*, 2012, Moore *et al.*, 2013). Toutefois, le déséquilibre et la dysfonction des mécanismes de clairance des cellules apoptotiques, DAMP et PAMP sont tels que les lésions d'athérosclérose progressent malgré tout.

## 1.2. Métabolisme des lipides

Le cholestérol est une composante essentielle des membranes cellulaires, en plus d'être une source d'énergie importante. Il est aussi le précurseur des stéroïdes, acides biliaires et vitamine D (Berg *et al.*, 2002). Chez l'homme, près de 75% du cholestérol est synthétisé par les cellules et est stocké sous sa forme estérifiée, alors que 25% proviennent de la diète. Le cholestérol est transporté dans la circulation sanguine par des lipoprotéines. Celles-ci sont formées d'un cœur hydrophobe riche en esters de cholestérol et triglycérides et d'une couche de phospholipides, cholestérol libre et apolipoprotéines. La densité des lipoprotéines est en lien avec leur contenu en lipides : les lipoprotéines de faible densité ont une grande quantité de triglycérides, tandis que celles de haute densité sont plutôt riches en cholestérol estérifié. Ainsi, plusieurs sous-classes de lipoprotéines co-existent dans l'organisme (Ogedegbe *et al.*, 2001, Berg *et al.*, 2002).





**Figure 1** – Métabolisme des lipides

(Rader et al., 2008)

### 1.2.1. Lipoprotéines

La proportion de cholestérol provenant de la diète est sécrétée dans la circulation sanguine depuis les entérocytes de l'intestin par la formation de chylomicrons de faible densité riches en triglycérides. Ces derniers expriment à leur surface les apolipoprotéines B48, E et C. Les chylomicrons seront ensuite hydrolysés dans la circulation sanguine par la lipoprotéine lipase (LPL) (Mulder *et al.*, 1993). Cette dernière est d'abord synthétisée, puis sécrétée par les myocytes et adipocytes dans la circulation sanguine (Dallinga-Thie *et al.*, 2010). La LPL lie ensuite les protéoglycanes aux sulfates d'héparane à la surface apicale des cellules de l'endothélium et va lier puis hydrolyser les lipoprotéines riches en triglycérides. Les acides gras alors libérés vont se lier à une molécule d'albumine afin d'être acheminés dans les muscles et adipocytes et être internalisés par le récepteur CD36. Les chylomicrons remnants seront internalisés dans le foie via les récepteurs

aux LDL et les *lipoprotein receptor-related protein* (LRP) exprimés par les hépatocytes (Cooper 1997). La digestion des chylomicrons remnants dans des lysosomes va libérer le cholestérol libre qui sera utilisé pour former la membrane lipidique des cellules. Les molécules de cholestérol estérifiées et les triglycérides vont alors former les lipoprotéines de très faible densité (*very low density lipoprotein*, VLDL) au niveau du foie. Les VLDL ainsi formées n'exprimeront plus l'apoB48, mais plutôt l'apoB100. De retour dans la circulation, les VLDL peuvent retourner au foie via les LRP pour être digérés à nouveau, être soumis à l'action de LPL dans la circulation sanguine et devenir des LDL, ou encore échanger des molécules avec des HDL et devenir des lipoprotéines de densité intermédiaire (*intermediate density lipoprotein*, IDL) (Rader et al., 2008). Ce mécanisme est décrit au point 1.2.1.2. Les LDL, qui expriment seulement l'apoB100, peuvent être à nouveau internalisées dans le foie ou encore s'accumuler dans les tissus périphériques. Dans la pathologie d'athérosclérose, ces lipoprotéines s'accumulent dans les parois vasculaires, principalement sous la forme de LDLox. Les voies de signalisation du LDLox sont décrites au point suivant. Quant aux IDL, elles sont très rapidement internalisées par les LDLR du foie ou hydrolysées par la LPL et forment à leur tour des LDL riches en cholestérol estérifié (Ogedegbe *et al.*, 2001, Berg *et al.*, 2002).

#### **1.2.1.1. LDL modifié**

Les LDL provenant de l'hydrolyse des VLDL et IDL peuvent subir plusieurs modifications différentes dans la circulation sanguine et au sein des tissus périphériques. Les LDL peuvent être notamment être oxydées, acétylées, glycolysées ou carbamylées (Alique *et al.*, 2015). Les 8 classes de récepteurs éboueurs, A à H, peuvent se lier aux diverses formes de LDL modifiées (Goyal *et al.*, 2012). Par exemple, les LDL natifs peuvent se lier aux récepteurs éboueurs de classe B, alors

que les LDL acétylées lient les classes A et B, ce qui inclus le CD36. Bien que plusieurs formes de LDL modifiées existent, ce sont les LDLox qui contribuent le plus à l'athérogénèse. Cette forme lie principalement les sous-classes SR-A, CD36 et LOX-1. Les macrophages expriment ces 3 récepteurs, tout comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et plaquettes. Il a été démontré que les modifications affectant l'apoB100 des LDL vont inhiber leur capacité de se lier au LDLR, compromettant ainsi leur clairance (Alique *et al.*, 2015). La présence de radicaux libres et d'hydropéroxydes formés par les lipoxgénases dans la circulation et au sein de l'espace sous-endothélial va permettre l'oxydation rapide des LDL natifs. La glycolysation des LDL va également modifier l'apoB100 et ainsi empêcher leur liaison au LDLR (Kattoor *et al.*, 2017). Les récepteurs CD36 et SR-A des macrophages de la plaque vont rapidement internaliser ce LDLox et devenir par la suite des cellules spumeuses. De plus, la reconnaissance de LDLox par le CD36 joue le rôle de signal proximal qui induit l'activation du complexe TLR4-TLR6 exprimé par les macrophages. L'activation de cet hétérodimère régule en partie la transcription de pro-IL-1 $\beta$  et CCL-5 par l'activation des voies inflammatoires dépendantes des *myeloid differentiation primary response protein* (MyD88) et *TIR domain-containing adaptor protein-inducing interferon  $\beta$*  (TRIF) (Stewart *et al.*, 2010). L'activation des hétérodimères TLR2/1 et TLR2/6 qui stimulent la voie inflammatoire de NF- $\kappa$ B et ainsi la production des cytokines inflammatoires IL-1b, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12 et IFN $\gamma$ , va augmenter la capacité du CD36 à internaliser les LDLox et à phagocyter les cellules apoptotiques (Park 2014). Les voies de signalisations du CD36 sont décrites au point 1.6.2.

#### 1.2.1.2. HDL

Également appelés bon cholestérol, les HDL forment une population hétérogène contenant peu de lipides, mais riche en apolipoprotéines I (apoA-I) et II (apoA-II). Il y a d'abord

des HDL naissantes riches en apoA-I qui sont sécrétées par le foie et les entérocytes ou produites par l'hydrolyse des chylomicrons et VLDL dans la circulation sanguine. C'est via sa liaison à l'apoA-I que le cholestérol libre va s'accumuler dans les HDL qui vont devenir matures sous l'effet de l'enzyme *lecithin-cholesterol acyltransferase* (LCAT) dont le rôle est d'estérifier le cholestérol libre. La composition des HDL change constamment sous l'effet de la protéine de transfert de cholestérol estérifié (*cholesteryl ester transfer protein*, CETP) et de la lipase hépatique (Ogedegbe *et al.*, 2001, Berg *et al.*, 2002). Le cholestérol contenu dans les HDL va retourner dans le foie pour se lier aux récepteurs SR-B1 des hépatocytes, ou encore via CETP qui va permettre l'échange de triglycérides de HDL matures contre du cholestérol estérifié. De plus, les hépatocytes, les entérocytes et les macrophages des tissus périphériques expriment le transporteur ABCA-1 qui permet l'efflux de cholestérol et enrichit les HDL en cholestérol.

### **1.2.1.3. Lp(a)**

Très semblables aux LDL, les Lp(a) sont également constituées d'esters de cholestérol et d'apoB100, mais possèdent toutefois l'apoA(Orso *et al.*, 2017). Le rôle des Lp(a) est peu connu en condition physiologique; elles participeraient toutefois à la réparation tissulaire en s'accumulant au niveau d'un endothélium endommagé et en se liant à la chimiokine CCL-2 qui va attirer des monocytes. Les Lp(a) peuvent subir des modifications dans la circulation et exprimer des épitopes spécifiques à l'oxydation qui seront reconnus comme des DAMP par les PRR des cellules de l'immunité innée. Tout comme les LDLox, les Lp(a) modifiés vont activer des voies de signalisations comme NF- $\kappa$ B et MAPK, ce qui perpétue l'état inflammatoire observé dans la pathologie d'athérosclérose.

### 1.2.2. Apolipoprotéines

Il y a quatre principaux sous-types d'apolipoprotéines : A, B, C et E (Ogedegbe *et al.*, 2001). Les apoA des HDL agissent notamment comme co-facteur de la LCAT et permettent la reconnaissance du récepteur hépatique SR-B1. De plus, les apoA vont se lier aux transporteurs ABCA-1 des macrophages et permettre l'efflux de cholestérol libre hors de ces leucocytes. L'apoB existe principalement sous deux formes. Les apoB48 produites par l'intestin sont exprimées par les chylomicrons tandis que les apoB100 sont produites par le foie et sont associées aux VLDL, IDL et LDL. Les apoB agissent comme ligand pour les LDLR et LRP, ce qui permet l'internalisation de ces lipoprotéines par le foie. L'apoC va moduler le métabolisme des VLDL et chylomicrons en agissant sur les enzymes LPL, LCAT et CETP. Entre autres, l'apoC-I inhibe l'internalisation des VLDL par les récepteurs hépatiques, l'apoC-II active la LPL tandis que l'apoC-III inhibe la lipolyse des lipoprotéines par la LPL. Finalement, l'apo joue un rôle dans le transport et l'échange de lipides en agissant comme ligand pour les interactions avec les autres lipoprotéines. L'apo interagit avec les *heparan sulfate proteoglycans* (HGPG) qui permettent la liaison et le transfert des lipides vers plusieurs récepteurs incluant les LDLR, LRP et récepteur aux VLDL (Huang *et al.*, 2014). D'ailleurs, la délétion du gène codant pour l'apo génère un modèle de souris hypercholestérolémique (Buzello *et al.*, 2003).

### 1.3. Traitements actuels et en développement

Étant donné les fardeaux économiques et sociaux qui découlent des maladies CV dérivant de l'athérosclérose, de nombreux traitements ont été développés au fil des années dans le but de réduire le risque d'évènements cardiovasculaires indésirables. Une description sommaire de

quelques thérapies actuellement disponibles ou en développement suit. L'accent a été mis sur les différentes cibles moléculaires de ces traitements.

### **1.3.1. Inhibiteurs de la synthèse du cholestérol**

Les inhibiteurs de l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMGCR), plus connus sous le nom de statines, ont les effets anti-athérosclérotiques les mieux documentés dans la littérature (Endo 2010). Les statines vont empêcher la conversion de l'hydroxyméthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) en acide mévalonique, un précurseur du cholestérol. La concentration de cholestérol intracellulaire est alors diminuée, ce qui a comme conséquence d'activer les SREBP, une famille de facteurs de transcription qui augmente l'expression génique des LDLR. Cela se traduit par une augmentation de l'expression du récepteur à la membrane, ce qui permet une clairance accrue du cholestérol endogène, mais également provenant de la diète (Stancu *et al.*, 2001). La diminution des LDL circulants est associée à une diminution des événements cardiovasculaires indésirables découlant de l'accumulation de dépôts lipidiques dans l'intima des vaisseaux, mais également à une diminution de la mortalité (Istvan *et al.*, 2001). Plus récemment, il a été découvert que les effets des statines vont au-delà de la réduction des lipides sanguins. En effet, il a été démontré que les statines diminuent également l'inflammation vasculaire en augmentant la sécrétion de cytokines anti-athérosclérotiques telles l'IL-4 et l'IL-10, et en diminuant celle de cytokines athérogéniques comme IL-6, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  et CCL-2 (Schonbeck *et al.*, 2004, Crowther 2005). De plus, les statines réduisent la sécrétion et l'activité des métalloprotéinases matricielles par les cellules musculaires lisses vasculaires et macrophages (Luan *et al.*, 2003), réduisent la taille des noyaux nécrotiques et l'inflammation locale dans la plaque (Newby *et al.*, 2009). Malgré les effets

bénéfiques énumérés dans la littérature, il reste qu'une proportion de patients ne bénéficient pas de traitements par les inhibiteurs de l'HMGCR. Des études ont démontré que la résistance au traitement peut être due à des polymorphismes d'un ou plusieurs gènes, ou encore à la combinaison avec d'autres médicaments. De plus, plusieurs patients sont intolérants aux statines, car ils développent des effets secondaires qui ne permettent pas d'atteindre des doses suffisamment élevées de statines pour diminuer les taux de LDL sanguins sous le seuil optimal (Reiner 2014). En effet, les statines bloquent une multitude de voies de signalisation, d'où le risque de développer des effets secondaires graves, dont la myopathie (atrophie musculaire évolutive) (Fernandez *et al.*, 2011). Le phénomène d'isoprénylation des protéines, une modification post-translationnelle essentielle à l'association de plusieurs protéines avec la membrane cellulaire, est notamment altéré (Greenwood *et al.*, 2006). De plus, la diminution des taux circulants de LDL seule n'élimine pas le risque de développer des maladies CV, il faut également réduire significativement l'inflammation.

### **1.3.2. Inhibiteurs de la dégradation du récepteur au LDL**

D'autres thérapies développées plus récemment visent également à réduire les taux circulants de LDL. Une nouvelle cible d'intérêt est la convertase PCSK9. Suivant son autoclivage, la convertase PCSK9 maintenant activée lie le LDLR (Bottomley *et al.*, 2009). Ce complexe est ensuite internalisé dans une vésicule riche en clathrine et subséquemment dégradé dans des lysosomes. Lorsque des anticorps lient la PCSK9, les LDLR sont libres de lier le LDL. Le complexe LDLR/LDL est alors internalisé, puis dissocié dans des endosomes : le LDL sera dégradé dans des lysosomes alors que le LDLR sera recyclé à la membrane. En effet, les patients atteints d'une mutation causant une perte de fonction de PCSK9 présentent une hypocholestérolémie. Comme c'est le cas pour les statines, cette réduction du cholestérol

sanguin réduit le risque de développer une maladie CV. Des anticorps contre PCSK9 ont donc été développés dans le but de limiter l'internalisation et la dégradation des LDLR. Cette thérapie s'avère efficace, puisque l'augmentation de l'expression de LDLR à la surface cellulaire augmente la clairance des LDL circulants au niveau du foie (Soutar *et al.*, 2007). Toutefois, des études couvrant un large horizon temporel doivent être menées pour comparer les bénéfices de ces anti-PCSK9 par rapport aux statines. En effet, les coûts de fabrication d'anticorps restent plus élevés que pour de petites molécules de synthèse, et un des effets secondaires les plus fréquents est une réaction cutanée au site d'injection. Bien que peu rapportés, des effets adverses neurocognitifs sont également possibles (McKenney 2015).

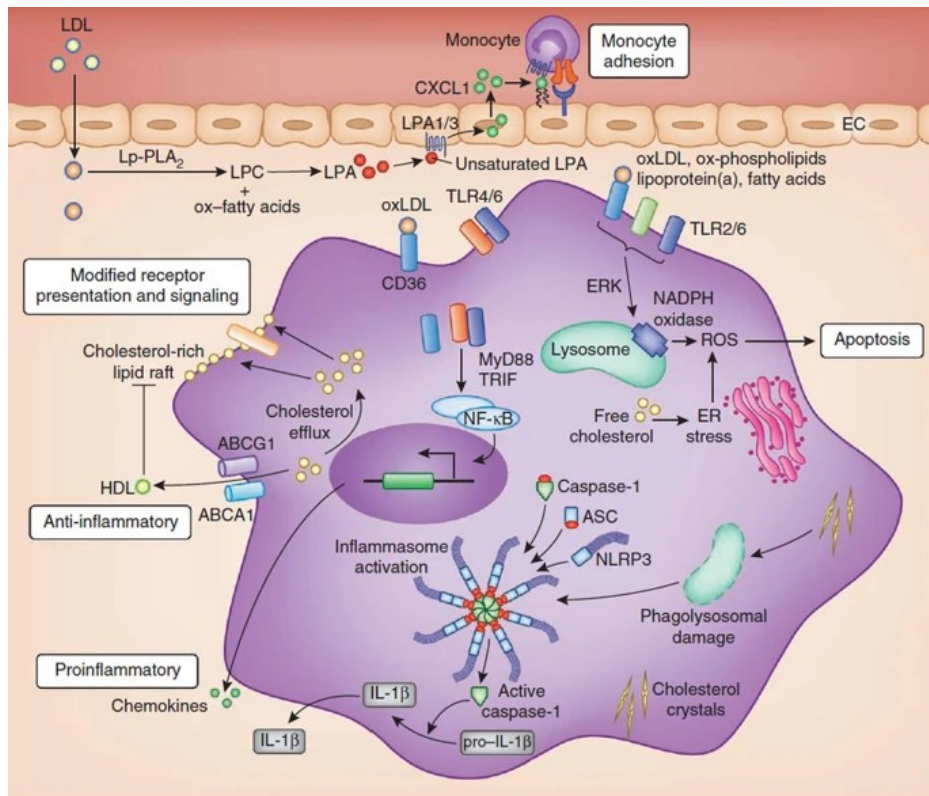
### **1.3.3. Anti-inflammatoires**

La voie des récepteurs activés par les PPAR fait partie des cibles d'intérêts pour le développement de thérapies anti-athérosclérotiques (Moreno *et al.*, 2004). La forme endothéliale, PPAR $\alpha$ , est connue pour inhiber l'expression de molécules d'adhérence (dont VCAM-1) et augmenter la libération de NO, ce qui diminue donc l'internalisation de LDL et le recrutement de leucocytes tels les macrophages. Le récepteur PPAR $\gamma$  est quant à lui exprimé par de nombreuses cellules, incluant les cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, macrophages et lymphocytes T. L'activation de cette voie promeut plusieurs activités anti-athérogéniques : augmentation de la synthèse et relâche de NO, réduction du recrutement de lymphocytes T, diminution de l'angiogenèse, inhibition de la migration des cellules musculaires lisses, réduction de l'expression de métalloprotéinases matricielles et augmentation du transport inverse du cholestérol (Crowther 2005). Toutefois, les études cliniques menées jusqu'à ce jour se sont soldées par un échec thérapeutique. Une large étude clinique portant sur les thiazolidinedione, des ligands synthétiques du PPAR $\gamma$ , a révélé des



effets secondaires tels que la rétention de fluide et un risque d'œdème périphérique dû à l'augmentation de la perméabilité endothéliale (Ehara *et al.*, 2004).

## 1.4. Contribution des macrophages dans l'athérosclérose



**Figure 2** – Voies de signalisation des macrophages dans l'athérosclérose

(Weber *et al.*, 2011)

### 1.4.1. Hétérogénéité des monocytes

Comme mentionné précédemment, les monocytes sont les précurseurs des macrophages s'accumulant dans l'espace sous-endothélial en situation inflammatoire. Tout comme les macrophages, les monocytes forment une population hétérogène et jouent un rôle dans l'initiation et la progression des lésions d'athérosclérose (Nagenborg *et al.*, 2017).

Chez l'homme, les sous-types de monocytes sont classés en fonction de leur expression de CD14 et *cluster* de différenciation 16 (CD16) (Passlick *et al.*, 1989). Le CD14 est une protéine accessoire qui est nécessaire à la reconnaissance des lipopolysaccharides (LPS) de la membrane des bactéries par le complexe TLR4-*myeloid differentiation factor 2* (MD2) qui active la voie inflammatoire précoce de NF- $\kappa$ B via MyD88 qui à son tour active les *interleukin-1 receptor-associated kinases* (IRAK) (Akira *et al.*, 2004). Plus tardivement, l'internalisation du complexe TLR4-CD14-MD2 par endocytose dans des endosomes va augmenter la transcription de gènes codant pour les interférons de type 1 comme les IFN $\alpha/\beta$  via la voie dépendante de *translocation associated membrane proteins* (TRAM) et TRIF (Akira *et al.*, 2004). Quant au CD16, il s'agit d'un récepteur aux immunoglobulines G (IgG) qui contrôle la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps de l'immunité acquise (Yeap *et al.*, 2016). Il y aurait d'ailleurs une association entre la vulnérabilité des athéromes et la présence de monocytes CD16<sup>+</sup> puisque ceux-ci sécrètent des médiateurs pro-inflammatoires, énumérés plus bas, et des métalloprotéinases matricielles qui contribuent à dégrader la chape fibreuse (Nagenborg *et al.*, 2017).

Il existe 3 sous-types de monocytes chez l'homme : les classiques expriment fortement CD14, mais peu CD16 (CD16<sup>-</sup>CD14<sup>++</sup>), les intermédiaires expriment les 2 (CD16<sup>+</sup>CD14<sup>++</sup>) et les non-classiques (ou alternatifs) expriment davantage CD16 que CD14 (CD16<sup>++</sup>CD14<sup>+</sup>) (Geissmann *et al.*, 2003). Il existe des formes analogues aux monocytes classiques et non classiques chez la souris, selon leur expression de l'antigène lymphocytaire 6C (Ly6C) et des récepteurs aux chimiokines CCR-2 et CX3CR-1 . Bien que les monocytes murins aient des similitudes phénotypiques avec leurs homologues humains, leurs rôles et fonctions diffèrent (Geissmann *et al.*, 2003)

La forme classique CD16<sup>-</sup>CD14<sup>++</sup> dérive des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse (Fogg *et al.*, 2006) et compose la majorité des monocytes dans la circulation sanguine (80-90%) (Auffray *et al.*, 2009). Leur émigration de la moelle est stimulée par l'interaction de leur récepteur CCR-2 et ses ligands CCL-2 et chimiokine motif c-c ligand 7 (CCL-7), alors que leur maturation dépend du M-CSF (Kratofil *et al.*, 2017). Ils expriment les récepteurs aux chimiokines de type CC 2 (CCR-2), CXC 1 (CXCR-1), CXC 2 (CXCR-2) et CXC 4 (CXCR-4) (Nagenborg *et al.*, 2017), mais pas CX3C (CX3CR-1) (Auffray *et al.*, 2009). Les monocytes classiques humains jouent un rôle important dans la réponse antimicrobienne en tant que phagocytes. Conséquemment, ils expriment fortement des MPO et récepteurs éboueurs comme le CD36 afin d'éliminer efficacement les cellules infectées (Nagenborg *et al.*, 2017). La forme équivalente chez la souris, Ly6C<sup>high</sup>CCR2<sup>high</sup>CX3CR1<sup>low</sup>, migre dans l'espace sous-endothélial en utilisant ses récepteurs aux chimiokines CCR-2 et CCR-5 qui vont reconnaître les ligands CCL-2 et CCL-5 que sécrètent les cellules endothéliales activées (Tacke *et al.*, 2007, Karlmark *et al.*, 2009). Ces monocytes classiques s'accumulent davantage que les non-classiques au niveau des lésions athérosclérotiques, ce qui fait d'eux les précurseurs de la majorité des macrophages retrouvés dans l'intima au début de la pathologie. En plus de leurs propriétés antimicrobiennes, ils sont pro-inflammatoires puisqu'ils libèrent de larges quantités de TNF $\alpha$ , IL-1 et iNOS, ce qui leur confère un profil de sécrétion différent des monocytes classiques retrouvés chez l'homme (Auffray *et al.*, 2009). De plus, des études *in vitro* ont démontré que les monocytes pro-inflammatoires CCR2<sup>high</sup> peuvent changer leur phénotype sous l'action des cytokines IL-4 et IL-10 et exprimer CX3CR-1, devenant ainsi des monocytes activés alternativement (Dal-Secco *et al.*, 2015).

Les monocytes intermédiaires CD16<sup>+</sup>CD14<sup>++</sup> représentent une forme transitoire jouant à la fois un rôle anti-inflammatoire par leur sécrétion d'IL-10, mais également pro-inflammatoire

par leur production d'espèces réactives de l'oxygène et cytokines inflammatoires (Wong *et al.*, 2011, Nagenborg *et al.*, 2017) Ils expriment les récepteurs aux chimiokines CCR-1, CCR-2 et CCR-5, mais également le CMH-II qui promeut l'activation des Th1. Ils ont toutefois une capacité phagocytaire moindre que les monocytes classiques(Nagenborg *et al.*, 2017)

Quant aux monocytes non classiques CD16<sup>++</sup>CD14<sup>+</sup>, ils expriment fortement CX3CR-1, mais peu CCR-2 (Tacke *et al.*, 2007). Ils expriment également le CHM-II à leur surface. Ces monocytes patrouillent constamment les parois vasculaires artérielles et jouent un rôle dans la réponse inflammatoire initiale et transitoire par leur sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène. La forme analogue chez la souris, Ly6C<sup>low</sup>CCR2<sup>low</sup>CX3CR1<sup>high</sup>, participe à la réparation tissulaire (Geissmann *et al.*, 2003). Contrairement aux monocytes classiques qui vont adhérer fermement à l'endothélium, les monocytes murins non classiques n'expriment pas la sélectine-L, mais seulement l'intégrine LFA-1 qui va se lier aux molécules ICAM-1 de l'endothélium (Auffray *et al.*, 2009). De plus, leur migration dans la plaque requiert une interaction entre CCR-5 et son ligand sécrété par les cellules endothéliales, la CCL-5 (Karlmark *et al.*, 2009).

En condition homéostatique stable, il a été avancé que les monocytes Ly6C<sup>high</sup> seraient les précurseurs des monocytes Ly6C<sup>low</sup> dans la moelle osseuse et le sang (Yona *et al.*, 2013). Toutefois, d'autres études supportent plutôt l'hypothèse qu'ils dériveraient de précurseurs indépendants (Carlin *et al.*, 2013). On trouve également dans la pulpe rouge de la rate un réservoir de monocytes classiques (Swirski *et al.*, 2009). Leur émigration vers la circulation sanguine, de même que leur recrutement au site inflammatoire, se produit sous l'effet de l'angiotensine-II locale et de la CCL-7 sécrété par les lymphocytes B (Nagenborg *et al.*, 2017).

#### 1.4.2. La polarisation des macrophages dans l'athérosclérose

Les macrophages font partie des principales cellules phagocytaires dans la pathologie d'athérosclérose (Schrijvers *et al.*, 2007). Effectivement, ils vont faire la clairance des agents pathogènes et autres produits toxiques comme le LDLox présent dans leur environnement, mais ils vont également médier l'efférocytose, c'est-à-dire internaliser puis métaboliser les cellules apoptotiques (Korns *et al.*, 2011). Bien que les macrophages retrouvés au sein des plaques dérivent principalement des monocytes sanguins recrutés au site d'un endothélium dysfonctionnel (Gordon *et al.*, 2005), un autre type de macrophage réside dans les tissus. Ces derniers vont adopter des phénotypes très différents de ceux dérivés des monocytes. Ils vont par exemple former la microglie au niveau du système nerveux central, ou encore des cellules de Kupffer au niveau du foie (Geissmann *et al.*, 2010). On les retrouve également au niveau de la couche adventice des artères où ils participent à l'endocytose de pathogènes (Willemsen *et al.*, 2020).

C'est au sein de l'espace sous-endothélial que les monocytes sanguins vont se différencier en macrophages exprimant l'antigène F4/80 et la tyrosine kinase Mer (*Mer tyrosine kinase*, MerTK) (Koltsova *et al.*, 2013) sous l'effet du M-CSF. Au fil des années, de nombreuses études ont permis de déterminer les effets de divers médiateurs sur la différenciation des monocytes en macrophage pro-inflammatoire M1, ou anti-inflammatoires M2, dans un contexte d'athérosclérose. Bien qu'il ait d'abord été avancé que les M1 dérivent des monocytes Ly6C<sup>high</sup> et les M2 des Ly6C<sup>low</sup>, la découverte d'autres phénotypes a révélé la plasticité complexe des macrophages (Jakubzick *et al.*, 2017).

D'une part, les monocytes Ly6C<sup>high</sup> qui s'accumulent aux sites inflammatoires peuvent non seulement se différencier en macrophages, mais également en cellules dendritiques présentatrices d'antigènes (Geissmann *et al.*, 2003). Les dyslipidémies peuvent également

induire la polarisation des monocytes Ly6C<sup>low</sup> en cellules dendritiques et inhiber leur migration vers les organes lymphoïdes, ce qui favorise leur séquestration périphérique (Weber *et al.*, 2011).

La différenciation des monocytes Ly6C<sup>high</sup> en macrophage M1 se produit sous l'effet de stimuli microbiens comme les LPS ou par les cytokines IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ . (Mosser 2003). L'activation alternative des macrophages va plutôt les polariser en un sous-type anti-inflammatoire. D'abord qualifiés simplement de M2, des études additionnelles ont plutôt caractérisé 3 principales sous-classes chez l'homme: M2a, M2b et M2c (Martinez *et al.*, 2014). Un macrophage stimulé par IL-4 et IL-13 aura un phénotype M2a, alors que la stimulation par des complexes immuns et ligands des TLR va plutôt activer les macrophages sous le phénotype M2b. La polarisation en M2c est quant à elle induite par l'IL-10, le TGF $\beta$  ou les glucocorticoïdes (Mosser 2003).

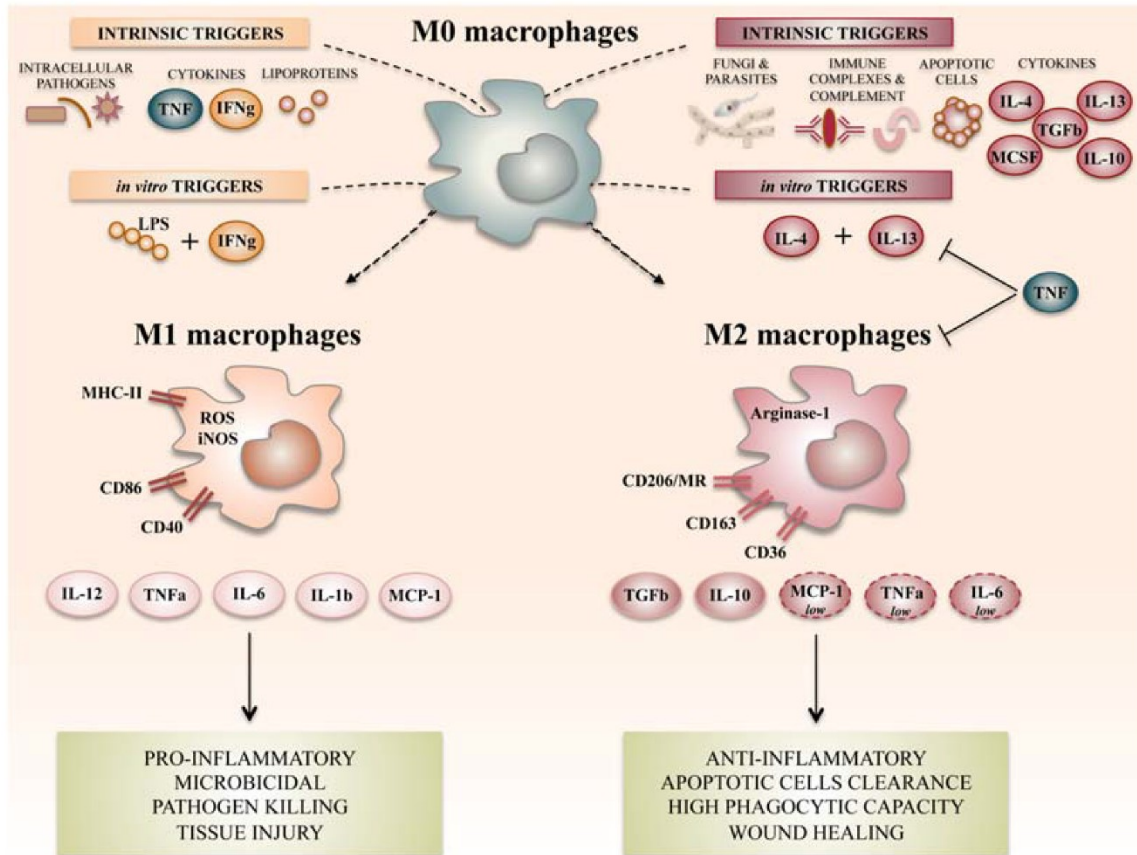
Étant donné la composition dynamique des plaques d'athéroscléroses, les macrophages sont constamment soumis à un éventail de médiateurs qui vont moduler leur phénotype. Ainsi, il n'existe pas seulement des macrophages M1 ou M2, mais également diverses variétés ayant des caractéristiques associées à plus d'un phénotype.

Les rôles des classes de macrophages précédemment énumérés sont décrits aux points suivants.

### **1.4.3. Phénotypes des macrophages dérivés des monocytes**

Les macrophages couvrent un large spectre de fonctions qui sont aux antipodes. En effet, la vision simplifiée montre d'une part le phénotype M1 qui contribue à l'inflammation en sécrétant des médiateurs et en phagocytant les pathogènes, ce qui promeut la croissance et la

rupture des plaques, et d'autre part, le sous-type M2 qui participe à la résolution des lésions, l'immunorégulation, le transport inverse du cholestérol et l'efférocytose (Mosser *et al.*, 2008).



**Figure 3 – Polarisation et rôles des macrophages**

(Atri *et al.*, 2018)

### 1.4.3.1. M1

Les macrophages de type M1 ont plusieurs fonctions, dont la sécrétion médiateurs inflammatoires (ex. espèces réactives de l'oxygène, cytokines, chimiokines) et la phagocytose de pathogènes et lipoprotéines modifiées par des récepteurs éboueurs, tel le CD36 (Lusis 2000).

Les voies de signalisation découlant de l'internalisation de cholestérol sont détaillées au point 1.4.4. Les M1 possèdent également un activité bactéricide et contribuent à la dégradation de la matrice extracellulaire (Murray *et al.*, 2011). D'autre part, il a été démontré que la stimulation *in vitro* de macrophages non-différenciés, M0, par les LPS active la voie inflammatoire de NF- $\kappa$ B, notamment via le dimère TLR2/4, ce qui induit la sécrétion de cytokines inflammatoires telles IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-23 et TNF $\alpha$  (Martinez *et al.*, 2014). La stimulation des macrophages par l'IFN $\gamma$  va quant à elle stimuler la cascade inflammatoire dépendante des *signal transducer and activator of transcription 1* et *2* (STAT-1, STAT-2), ce qui promeut la transcription de gènes codants pour des cytokines inflammatoires, mais également pour iNOS et les antigènes de surface *cluster* de différenciation 86 (CD86) et CMH-II (Liu *et al.*, 2014, Martinez *et al.*, 2014). De surcroît, cette voie induit la sécrétion de chimiokines inflammatoires comme CCL-2 et CCL-5, qui contribuent au recrutement d'autres cellules immunitaires par chimiotactisme (Deshmane *et al.*, 2009). Les M1 promeuvent également la nécrose des cellules par la production d'espèces réactives de l'oxygène (Gordon 2003).

On retrouve une grande quantité de macrophages M1 au sein des plaques vulnérables, de même que des lymphocytes Th1. Ces derniers sont constamment stimulés par leur micro-environnement qui perpétue leur réponse inflammatoire. Additionnellement, les M1 sécrètent des métalloprotéases matricielles, comme MMP-2 et MMP-9, ce qui favorise la dégradation du collagène qui stabilise la plaque (Peled *et al.*, 2014). Le risque de rupture de l'athérome est ainsi augmenté. Bref, la réponse inflammatoire incontrôlée des M1 nourrit l'athérogénèse en plus d'induire des dommages tissulaires.



#### 1.4.3.2. M2 (a, b, c)

Afin de réduire le fardeau inflammatoire au sein de la plaque, les macrophages peuvent s'activer de façon alternative en différents sous-types de M2. Tous sécrètent des médiateurs anti-inflammatoires, mais plus spécifiquement, les M2a jouent un rôle dans la phagocytose et la réparation tissulaire, les M2b régulent plutôt l'immunité, alors que les M2c participent à l'efférocytose (Mosser 2003, Martinez *et al.*, 2014).

Les macrophages non différenciés, M0, vont se polariser en M2a sous l'effet d'IL-4 et d'IL-13 qui stimulent la voie des *Janus kinases 1 et 3* (JAK-1, JAK-3) qui à leur tour activent les *signal transducer and activator of transcription 6* (STAT-6) (Martinez *et al.*, 2014) qui induisent la transcription de gènes codant pour le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ . Ce dernier joue un rôle clé dans l'efférocytose médié par les récepteurs éboueurs, dont le CD36 (Feng *et al.*, 2000). Ce phénomène est détaillé au point 1.4.6. De plus, les M2a ont une expression augmentée du récepteur au mannose de type C 1, aussi connu sous le nom de *cluster de différenciation 206* (CD206), de CHM-II (Martinez *et al.*, 2014), de fibronectine et TGF $\beta$  (Mahdavian Delavary *et al.*, 2011). Le CD206 joue le rôle de senseur pour la reconnaissance de pathogènes, PAMP, DAMP, antigènes et cellules apoptotiques (Roszer 2015), alors que la fibronectine et TGF $\beta$  sont nécessaires pour la fibrose des tissus (Spencer *et al.*, 2010). Cela confère un rôle dans la réparation tissulaire aux macrophages M2a. Toutefois, la fibrose peut s'avérer néfaste, car elle implique le durcissement de la paroi vasculaire des artères touchées. Il y a ainsi une diminution de l'élasticité et de la capacité de contraction de ces vaisseaux. Chez la souris, les M2a ont une expression augmentée d'enzymes comme *resistin-like molecule alpha* (RELM $\alpha$ , Fizz-1), chitinase-like 3 (Chil3, YM-1) (Raes *et al.*, 2002) et arginase-1 (Arg-1) (Munder *et al.*, 1998). Ce dernier est requis pour la synthèse de collagène.

Suite à la différenciation des M0 en M2b par la reconnaissance de complexes immuns tel IgG et d'agonistes des TLR ou ligands du récepteur à l'IL-1 (IL-1R) (Anderson *et al.*, 2002), la voie dépendante des kinases *spleen tyrosine kinase* (Syk), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et protéine kinase B (PKB, AKT) est stimulée. Il y aura alors sécrétion d'IL-10 aux propriétés anti-inflammatoires en grande quantité (Vergadi *et al.*, 2017). Les M2b auront une expression augmentée de CD86 et de CHM-II et participent donc à l'activation des lymphocytes T de l'immunité acquise (principalement les auxiliaires de type 2) (Roszer 2015).

Quant au phénotype M2c, il est induit par les glucocorticoïdes, TGF $\beta$  et IL-10. Moins bien documentées, les voies de signalisations qui en découlent incluent l'activation des *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT-3) qui inhibe la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (Kocsso *et al.*, 2013). Tout comme les M2a, les M2c expriment fortement CD206 et MerTK, leur conférant un rôle dans l'efférocytose (Zizzo *et al.*, 2012). De plus, les M2c vont sécréter des TGF $\beta$  et IL-10 à leur tour, ce qui crée une boucle de rétroaction favorable à ce phénotype (Mosser 2003).

#### **1.4.3.3. Autres**

D'autres sous-types de macrophages ont été caractérisés au fil des ans : M2d chez la souris, M4, M(hb), Mhem, HA-mac chez l'homme, et Mox chez les 2 espèces (De Paoli *et al.*, 2014, Medbury *et al.*, 2014, Tabas *et al.*, 2016).

Le sous-type M2d est induit par les agonistes des TLRs et du récepteur adénosine A2A et est considéré comme étant proathérogénique et protumoral puisqu'il sécrète des VEGF et iNOS (De Paoli *et al.*, 2014). De plus, il n'exprime pas les marqueurs YM-1, Fizz-1 et CD206 caractéristiques des M2a qui sont considérés comme athéroprotecteurs. D'autre part, les

macrophages M1 et M2 murins ayant internalisé des LDLox adoptent un autre phénotype, nommé Mox (De Paoli *et al.*, 2014, Medbury *et al.*, 2014). Ce sous-type est un intermédiaire entre les macrophages et les cellules spumeuses qui a une moindre capacité de phagocyter des cellules apoptotiques. Les Mox vont fortement exprimer l'hème oxygénase-1 (HMOX-1) qui catabolise l'hème. Ce dernier est un cofacteur contenant du fer qui sert au transport de l'oxygène par l'hémoglobine (Tabas *et al.*, 2016, Vijayan *et al.*, 2018), une protéine retrouvée dans les globules rouges qui transporte l'oxygène des poumons vers les tissus périphériques (Marengo-Rowe 2006). Les Mox ont donc un rôle antioxydant et anti-inflammatoire puisqu'ils modulent à la baisse la toxicité cellulaire causée par l'hème. Ainsi, les Mox contribuent à l'athérosclérose par leur internalisation de lipides oxydés, mais réduisent également l'inflammation par l'expression de HMOX-1.

Les macrophages M4, découvert chez l'homme, se différencie via le CXCL-4 (De Paoli *et al.*, 2014). Les M4 expriment la MMP-12, le CD206 et sécrètent faiblement les cytokines inflammatoires IL-6 et TNF $\alpha$ . Contrairement aux HA-mac et Mhem, ils n'expriment pas le récepteur CD163 qui lie l'hémoglobine (De Paoli *et al.*, 2014).

Les sous-types M(hb), HA-mac et Mhem sont étroitement liés : ils expriment tous le CD163 qui lie l'hémoglobine (De Paoli *et al.*, 2014). Les deux premiers ont été caractérisés chez l'homme tandis que le Mhem a été identifié chez l'homme et la souris. Les M(hb) et Mhem sont des phénotypes associés aux hémorragies et sont résistants à la formation de cellule spumeuse (Jeney *et al.*, 2014). Les macrophages se polarisent en M(hb) suivant l'internalisation d'hémoglobine et d'haptoglobine et vont exprimer le marqueur CD206. L'haptoglobine est produite par le foie et lie l'hémoglobine avec une grande affinité lorsque les globules rouges sont détruits (Marengo-Rowe 2006). L'hémoglobine libre étant pro-oxydante, l'élimination du

complexe hémoglobine-haptoglobine par le système réticuloendothélial au niveau du foie est anti-inflammatoire (Etzerodt *et al.*, 2013). Les HA-mac lient également ce complexe en plus d'exprimer HMOX-1. Ce phénotype a donc des fonctions anti-athérogéniques en participant à l'élimination de l'hémoglobine et l'hème. Finalement, les Mhem, polarisé par l'internalisation d'hème, ont une expression diminuée des récepteurs éboueurs, mais augmentée de CD163 et de *activating transcription factor 1* (Medbury *et al.*, 2014). Ce dernier induit l'expression de HMOX-1 et *liver X receptor alpha* (LXR $\alpha$ ). De plus, les Mhem ont une expression augmentée des transporteurs ABCA-1 et ABCG-1, en accord avec l'induction de la voie LXR $\alpha$  (De Paoli *et al.*, 2014, Medbury *et al.*, 2014).

#### **1.4.4. Homéostasie du cholestérol**

Plusieurs récepteurs présents à la surface membranaire des macrophages participent à l'homéostasie du cholestérol. Dans la pathologie d'athérosclérose, il y a un débalancement dans l'activation et l'inhibition des voies de signalisations de ces récepteurs (Back *et al.*, 2019). En effet, l'accumulation de cholestérol dans les macrophages est dû à un déséquilibre entre les mécanismes d'internalisation et d'efflux du cholestérol et mène à l'apoptose des macrophages. Le cholestérol, principalement sous forme de LDL modifiée, va s'accumuler dans les macrophages, induire la formation de cellules spumeuses, puis la mort de celles-ci. Leur contenu lipidique est alors libéré ce qui contribue au milieu inflammatoire des plaques athéromateuses. En effet, les cristaux de cholestérol ainsi libérés ont la capacité d'activer la cascade de l'inflammasome tandis que le cholestérol libre augmente le stress du réticulum endoplasmique (Rajamaki *et al.*, 2010, Rohrl *et al.*, 2014). La forme LDLox est particulièrement hétérogène, car elle est rapidement internalisée via les récepteurs LOX-1, SR-A et CD36. L'expression du CD36 est notamment régulée par

l'activation de PPAR $\gamma$  : les cellules apoptotiques et le LDLox stimulent PPAR $\gamma$  qui induit alors la transcription du gène codant pour le CD36 dans le but de faciliter la clairance des DAMP et PAMP environnants (Nagy *et al.*, 1998). Les cytokines TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$ , de même que les acides gras à longues chaînes (AGLC), régulent également l'expression du CD36 à la hausse.

À l'opposé, il existe des récepteurs qui vont permettre l'efflux de cholestérol hors des cellules spumeuses et vers la circulation et la lymphe afin de réduire la quantité d'esters de cholestérol au sein des lésions d'athérosclérose. Au niveau des macrophages, le cholestérol estérifié stocké dans des lipoprotéines va subir une hydrolyse et devenir du cholestérol non estérifié au sein de lysosomes (Feingold *et al.*, 2000). Ce cholestérol est acheminé vers le réticulum endoplasmique où une bonne partie sera de nouveau estérifiée sous l'effet de l'*acetyl-coenzyme a acetyltransferase 1* (ACAT-1). Le cholestérol non estérifié peut également être converti en oxysterol qui va activer les récepteurs nucléaires LXR $\alpha$  et  $\beta$  (Chen *et al.*, 2007, Torocsik *et al.*, 2009). Leur activation va alors réguler à la hausse l'expression des transporteurs ABCA-1 et ABCG-1. Cela a pour conséquence de favoriser l'efflux du cholestérol non estérifié vers les molécules de HDL naissantes via la protéine apoA-I et de HDL matures, par les transporteurs ABCA-1 et ABC-G1-1 respectivement (Yvan-Charvet *et al.*, 2010, Sag *et al.*, 2015). Le cholestérol transporté dans les HDL peut également être internalisé au niveau du foie via le SR-B1 qui agit comme un transporteur bidirectionnel entre les hépatocytes et le HDL présent dans la circulation sanguine (Ji *et al.*, 2012). L'expression de ABCA-1 et SR-B1 est aussi régulée par les SREBP qui vont détecter les lipides et augmenter la transcription de ces transporteurs afin de promouvoir l'efflux de cholestérol (Luo *et al.*, 2010). La vitesse du flux de cholestérol hors des endosomes tardifs et lysosomes, de même que la formation d'oxysterol qui en suit, sont des régulateurs clefs de l'expression et l'activité des ABC-

A1 et ABC-G1 (Allahverdian *et al.*, 2012). Ces transporteurs servent donc à mobiliser l'excès de cholestérol des cellules qui en sont gorgées et à générer de nouvelles particules de HDL.

Le transport inverse du cholestérol représente une avenue thérapeutique d'intérêt. Parmi les cibles potentielles, on compte l'apoA-I, l'enzyme LCAT et le récepteur SR-BI (Cuchel *et al.*, 2006). De plus, il a été démontré que des agonistes des LXR utilisés actuellement pour traiter des désordres métaboliques et certains cancers ont également le potentiel d'augmenter l'expression des transporteurs ABCA-1 et ABCG-1 chez un modèle murin. Cela augmenterait l'efflux de cholestérol au niveau des macrophages et diminuerait donc l'athérosclérose. Toutefois, de plus amples études détaillant le bénéfice thérapeutique de l'augmentation du transport inverse du cholestérol sont nécessaires.

#### **1.4.5. Efférocytose**

Un autre rôle clef des macrophages est la phagocytose des cellules apoptotiques. Dans l'athérosclérose, l'inflammation et l'accumulation d'esters de cholestérol sont telles que de nombreuses cellules entrent en apoptose et doivent être rapidement phagocytées. Ce phénomène, nommé efférocytose, est intact au début de la pathologie (Thorp *et al.*, 2009).

Tout comme les macrophages, les neutrophiles recrutés au site d'une inflammation stérile vont participer à la phagocytose de pathogènes (Kourtzelis *et al.*, 2020). De plus, ils vont produire des espèces réactives de l'oxygène, des cytokines pro-inflammatoires et relâcher des NET. Ces NET vont permettre la dégradation des médiateurs inflammatoires environnants via les protéases qu'ils contiennent. Les neutrophiles peuvent également entrer en apoptose et devront à leur tour être

phagocytés par les macrophages. Ainsi, la clairance des neutrophiles apoptotiques contribue activement à la résolution de l'inflammation.

Selon le type d'inflammation, le stimulus d'apoptose varie (Elliott *et al.*, 2017). Il y a d'abord un premier signal provenant d'une cellule en apoptose qui l'identifie comme telle auprès des phagocytes. Ensuite, un deuxième signal consistant en la reconnaissance de protéines spécifiques exprimées par les cellules apoptotiques permet au phagocyte de l'ingérer. La dernière cascade signalétique a lieu lorsque la cellule apoptotique est digérée dans un lysosome au sein du phagocyte.

Un des signaux permettant l'identification d'une cellule en apoptose le mieux caractérisé est induit par la chimiokine motif CX3C ligand 1 (CX3CL-1) (Elliott *et al.*, 2017). Les cellules apoptotiques vont sécréter cette molécule et attirer des phagocytes exprimant le récepteur aux chimiokines de type CX3C (CX3CR-1). Les nucléotides sont un autre exemple de signal identifiant les cellules à phagocyter (Ravichandran 2010).

Par la suite, un deuxième signal indique aux phagocytes quelles cellules ingérer. Par exemple, les cellules apoptotiques peuvent exprimer la phosphatidylserine (PtdSer). Cette dernière est normalement exprimée au niveau de la membrane plasmique interne par des *flippases* (Naeini *et al.*, 2020). Cependant, lorsque la cellule entre en apoptose, la PtdSer est externalisée à la surface cellulaire par des *scramblases*. Les PtdSer sont alors reconnues par des récepteurs spécifiques exprimés par les phagocytes, dont les tyrosines kinases transmembranaires TAM (pour Tyro3, Axl et MerTK). La Tyro3 est notamment exprimée au niveau de la prostate et du cortex cérébral, l'Axl au niveau des macrophages stimulés par des LPS et MerTK par des macrophages résidents et au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien et des poumons. La PtdSer est reconnue par les TAM des phagocytes via d'autres protéines, comme le *growth arrest-specific 6* (Gas6) et la protéine S,

qui font le pont entre les TAM du phagocyte et les PtdSer de la cellule apoptotique (Lemke *et al.*, 2010).

La PtdSer exprimée à la surface des cellules apoptotique est aussi reconnue par d'autres cellules, dont la protéine *milk fat globule-epidermal growth factor-factor 8* (MFG-E8) qui fait le pont entre la PtdSer et les intégrines  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha V\beta 5$  exprimées par les macrophages (Kourtzelis *et al.*, 2020). La reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages peut également être facilitée par la liaison d'autres protéines. Par exemple, le CD36 des phagocytes lie directement les protéines *T cell immunoglobulin mucin-1* (TIM-1) et -4 (TIM-4), de même que la thrombospondine-1 (TSP-1), exprimées la surface des cellules apoptotiques. De surcroît, la molécule d'adhérence intercellulaire de type 3 (*intercellular adhesion molecule 3*, ICAM-3) lie le CD14, respectivement exprimés par les cellules apoptotiques et les macrophages (Kourtzelis *et al.*, 2020).

La reconnaissance de la PtdSer par ces nombreuses protéines va déclencher une cascade menant à la phagocytose puis la digestion de la cellule en apoptose (Hochreiter-Hufford *et al.*, 2013). Toutefois, des macrophages non apoptotiques peuvent également externaliser la PtdSer, et leur reconnaissance par le CD36 exprimé par d'autres macrophages induit la fusion de ceux-ci, menant ainsi à la formation d'une cellule multinucléée (Helming *et al.*, 2009).

A l'opposé, les cellules peuvent exprimer le *cluster* de différenciation 47, ce qui signale aux phagocytes que la cellule n'a pas à être ingérée.

D'autre part, de nombreux récepteurs nucléaires ont été identifiés comme jouant un rôle dans la régulation de l'efférocytose médié par les macrophages : LXR $\alpha$ , LXR $\beta$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\delta$  et *retinoid X receptor  $\alpha$*  (RXR  $\alpha$ ) (Elliott *et al.*, 2017). En effet, l'activation de ces récepteurs



nucléaires augmente la transcription de gènes codant pour des protéines jouant un rôle dans la cascade signalétique de l'efférocytose, dont la PtdSer, le CD36, la MerTK et les ABCA-1 et ABCG-1. D'autre part, l'IL-10 et le TGF $\beta$  sont des médiateurs qui induisent l'efférocytose puisqu'ils favorisent un phénotype M2c chez les macrophages, connus pour exprimer fortement les protéines CD36, CD206 et MerTK (Zizzo *et al.*, 2012, Back *et al.*, 2019). De plus, la production de TGF $\beta$  régule à la baisse la transcription de gènes codant pour les cytokines inflammatoires TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL-8 (Kourtzelis *et al.*, 2020).

Cependant, lorsque les mécanismes d'efférocytose font défaut, les cellules apoptotiques ne sont pas phagocytées et vont entrer en nécrose secondaire (Thorp *et al.*, 2009). Dans le cas de cellules spumeuses, cela implique que leur contenu lipidique est libéré et va contribuer à l'élaboration d'un athérome. L'inflammation locale va perpétuer la réponse inflammatoire chronique, soit le recrutement de cellules immunitaires (monocytes, lymphocytes T), l'accumulation de cytokines telles IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF $\alpha$ , et la formation d'un noyau nécrotique au sein de l'espace sous-endothélial (Back *et al.*, 2019).

La susceptibilité apoptotique et l'efférocytose des macrophages se doivent d'être balancés pour favoriser la résolution des plaques d'athérosclérose. Le LRP-1 est critique pour l'internalisation des chylomicrons remnants par le foie (Yancey *et al.*, 2010). L'apo, un ligand de ce récepteur, est un déterminant majeur de la susceptibilité à l'athérosclérose étant donné son rôle dans la régulation du trafic du cholestérol et du stress oxydatif. En effet, l'apo diminue l'inflammation en jouant un rôle dans l'efficacité de l'efférocytose des cellules apoptotiques. La synthèse de apo serait d'ailleurs augmenté chez les macrophages en apoptose afin de favoriser leur clairance. De plus, des études *in vivo* comparant des souris sauvages et d'autres exprimant des macrophages déficients en LRP-1 ont montré que la délétion de LRP-1 augmente l'étendue des zones nécrotiques et la

densité des macrophages au niveau des plaques d'athérosclérose (Yancey *et al.*, 2010). C'est via l'activation de la voie Akt que la survie cellulaire serait associée à LRP-1.

### 1.5. Modèles animaux de l'athérosclérose

Afin d'étudier la pathologie d'athérosclérose, plusieurs modèles animaux ont été développés au fil des ans. On compte parmi les plus utilisés, les modèles déficients en (LDLR<sup>-/-</sup>) ou déficientes en apoE (apoE<sup>-/-</sup>), et le modèle de transplantation aortique. C'est par la modification de l'expression d'un gène de souris au niveau germinale qui permet l'obtention de souris LDLR<sup>-/-</sup> ou apo<sup>-/-</sup> (Getz *et al.*, 2016). Il est nécessaire d'utiliser des modèles transgéniques ou des modèles de chirurgie, car les souris de type sauvage ne développeront pas d'athérosclérose. Leur expression de HDL est telle que les souris ne deviennent pas hypercholestérolémiques et ce, même lorsque nourries avec une diète enrichie en lipides et cholestérol (Huszar *et al.*, 2000, Getz *et al.*, 2006).

Chez les souris LDLR<sup>-/-</sup>, les lipoprotéines ne peuvent plus être excrétées par le foie et restent en circulation (Huszar *et al.*, 2000, Getz *et al.*, 2006, Getz *et al.*, 2016). Lorsque jumelées à une alimentation riche en lipides et en cholestérol (*high fat high cholesterol*, HFHC), on obtient une augmentation de la concentration sanguine de LDL, mais également une accumulation de lipoprotéines au niveau de l'intima des artères. Le profil sanguin des lipoprotéines des LDLR<sup>-/-</sup> ressemble à celui de l'homme ayant développé une hypercholestérolémie, soit une augmentation des VLDL, mais surtout des LDL circulants.

Les souris n'exprimant pas l'apo ont une augmentation de chylomicrons, VLDL et LDL chargés de cholestérol dans la circulation sanguine (Getz *et al.*, 2006, Getz *et al.*, 2016). Leur capture par le récepteur LRP-1 des hépatocytes est inhibée due à l'absence de son ligand apo qui

est normalement exprimé par ces lipoprotéines. On obtient ainsi un profil sanguin plus riche en LDL qui favorise le développement de lésions athérosclérotiques. Ainsi, sans apo, les LDL modifiées s'accumulent dans le sang, ce qui crée une hypercholestérolémie. Les LDL sont alors transportées ou diffusent de la circulation sanguine vers l'intima des artères. De plus, une diète enrichie en lipides et en cholestérol va causer une hypercholestérolémie plus sévère, ce qui augmente l'étendue et la vitesse d'apparition des lésions chez les apo<sup>-/-</sup> de façon plus marquée que chez les souris LDLR<sup>-/-</sup>. Toutefois, une diète normale va tout de même contribuer à l'initiation de la pathologie chez ce modèle, contrairement aux souris LDLR<sup>-/-</sup> pour lesquelles une hypercholestérolémie doit être induite par une diète enrichie en lipides et cholestérol afin d'induire des lésions avancées d'athérosclérose (Getz *et al.*, 2016).

D'autres différences existent entre les modèles de souris déficientes en LDLR et en apo. Entre autres, la taille des lésions et des zones nécrotiques est plus grande et les lésions ont davantage de cellules musculaires lisses infiltrées chez les souris apo (Getz *et al.*, 2016). Des études ont également montré qu'une perte de fonction de la cytokine inflammatoire IL-6 va augmenter la taille des lésions au niveau de l'aorte chez les souris apo<sup>-/-</sup>, tandis que c'est sans effet chez celles LDLR<sup>-/-</sup>. D'autres chercheurs ont montré que l'apo participe à la polarisation des macrophages pro-inflammatoires en anti-inflammatoires en plus d'avoir une activité antioxydante. Ainsi, le modèle apo<sup>-/-</sup> est considéré comme davantage inflammatoire que le LDLR<sup>-/-</sup>. Cependant, le profil lipidique des LDLR<sup>-/-</sup> est plus proche de l'homme que celui des apo<sup>-/-</sup>.

D'un autre côté, on peut obtenir un autre type de modèle murin d'athérosclérose en effectuant une chirurgie au niveau de la crosse aortique. Ce modèle permet d'étudier la régression des lésions d'athérosclérose (Peled *et al.*, 2014) en greffant la crosse aortique de souris apoE<sup>-/-</sup> ou LDLR<sup>-/-</sup> à l'aorte d'une souris de type sauvage. Ces études ont pu démontrer que la chirurgie permet d'induire

la régression des lésions au niveau du greffon lorsque comparé à des souris transgéniques apoE<sup>-/-</sup> ou LDLR<sup>-/-</sup> ayant subies la même greffe. Ainsi, la présence d'apoE ou du LDLR chez les souris sauvages permet la régression des lésions préétablies au niveau de la crosse aortique provenant des souris transgéniques.

## **1.6.Récepteur SR-B2/CD36**

### **1.6.1. Structure et expression**

Le récepteur CD36 fait partie de la grande famille des SR. Plus précisément, c'est un récepteur éboueur membranaire de sous-type B, formé de 472 acides aminés (Park 2014). L'ADN complémentaire code pour une protéine de 53 kDa (Febbraio *et al.*, 2001). Ce poids correspond au CD36 avant les modifications post-traductionnelles dont il est l'objet (Febbraio *et al.*, 2001, Luiken *et al.*, 2016). Il possède un large domaine extracellulaire, deux passages transmembranaires, et ses domaines N- et C-terminaux sont cytosoliques (Silverstein *et al.*, 2000, Garcia-Bonilla *et al.*, 2014). Au niveau extracellulaire, il y a 3 ponts disulfures qui relient des résidus cystéines et dont le rôle est de contribuer à l'expression du récepteur à la membrane (Nergiz-Unal *et al.*, 2011). Il y a également plusieurs sites de glycosylation qui font fait varier le poids du récepteur jusqu'à 88 kDa et qui servent à la maturation et à l'expression à la membrane cellulaire du récepteur (Park 2014). De plus, le domaine extracellulaire contient une poche hydrophobe qui interagit avec la membrane cellulaire et où la plupart des ligands du CD36 vont se lier (Luiken *et al.*, 2016). Il existe également des sites extracellulaires de phosphorylation qui vont influencer la reconnaissance de ligands comme la TSP-1 et le collagène par le récepteur. Quant aux domaines N- et C- terminaux intracellulaires, on y trouve des sites d'ubiquitination et de palmitoylation. L'ubiquitination sert à la signalisation du calcium par le CD36 et permet également la dégradation du récepteur dans des

lysosomes. Additionnellement, les domaines C- et N-terminaux participent à l'expression du récepteur au niveau des cavéoles, ainsi qu'au niveau des radeaux lipidiques des membranes plasmiques (Febbraio *et al.*, 2001). Le récepteur CD36 est en effet co-localisé avec la cavéoline-1 au niveau des cavéoles. Ces derniers jouent un rôle dans le trafic et l'intégration des cascades signalétiques du cholestérol et le CD36 va réguler leur fonction.

Chez l'homme, le gène du CD36 est constitué de 15 exons, dont 13 sont codants (Rac *et al.*, 2007). On le trouve sur le chromosome 7, tandis que chez la souris, il est situé sur le chromosome 5. La structure du gène est d'ailleurs hautement conservée entre les espèces (Ingersoll *et al.*, 2010). Deux sous-types de déficiences de ce gène ont été caractérisés chez l'homme : dans le type I, les personnes touchées sont déficientes en récepteur CD36 au niveau des plaquettes et des monocytes, tandis que dans le type II, seulement les plaquettes n'expriment pas le CD36 (Febbraio *et al.*, 2001). Les conséquences de ces mutations chez l'homme ne sont pas encore très bien comprises. Chez les patients déficients de type I, certaines études rapportent une diminution de l'internalisation de oxLDL, et donc de la formation de cellule spumeuse, ce qui appuie les observations chez les souris CD36<sup>-/-</sup> (Nozaki *et al.*, 1995). Cependant, il a également été rapporté que ces patients présentent des caractéristiques typiquement associées au syndrome métabolique un facteur de risque de l'athérosclérose (Hirano *et al.*, 2003). Par exemple, ces patients peuvent avoir des taux plasmatiques élevés de triglycérides et de glucose et/ou une diminution des HDL. Par ailleurs, ces mutations affectent principalement les personnes de descendance japonaise ou africaine (2-3% de la population contre 0.3% chez les Caucasiens) (Kashiwagi *et al.*, 2001).

L'expression du CD36 ne se limite toutefois pas aux plaquettes et aux monocytes. En effet, on le retrouve également au niveau des macrophages, cellules dendritiques, cellules endothéliales microvasculaires, hépatocytes, adipocytes, cardiomyocytes, myocytes squelettiques, cellules

sensorielles de l'épithélium pigmenté rétinien, mitochondrie, papilles linguales, entérocytes et plaquettes (Febbraio *et al.*, 2001, Silverstein *et al.*, 2009). Toutefois, des études montrent que le récepteur CD36 est également emmagasiné dans des vésicules intracellulaires et que son expression peut être régulée positivement par l'*adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK) et le PI3K qui vont induire la translocation du CD36 à la surface cellulaire (Schwenk *et al.*, 2008). Le CD36 lie un éventail de ligands selon les cellules qui l'expriment. Ainsi, le récepteur CD36 a de multiples fonctions qui sont modulées par l'activation de diverses voies de signalisations selon sa localisation et les ligands impliqués.

### **1.6.2. Rôles et voies de signalisation du récepteur CD36**

Le CD36 est un récepteur aux multiples fonctions et nombreux ligands. L'activation de ses voies de signalisation requiert l'internalisation du complexe CD36-ligand. Des recherches suggèrent que selon le ligand, cette internalisation passe soit par les cavéoles, la macropinocytose, l'endocytose médiée par la clathrine, l'endocytose médiée par les radeaux lipidiques ou un processus dépendant des actines (Zeng *et al.*, 2003, Heit *et al.*, 2013, Hao *et al.*, 2020). On compte parmi les ligands du CD36 des molécules endogènes comme les phospholipides oxydés, les LDLox, les AGLC libres, la trombospondine-1, le peptide amyloïde bêta (A $\beta$ ), ainsi que des molécules synthétiques comme l'hexaréline et autres analogues du peptide de relâche de l'hormone de croissance 6 (*growth hormone releasing peptide 6*, GHRP-6), de même que des cellules apoptotiques, segments externes de photorécepteurs, composantes de membranes cellulaires bactériennes et érythrocytes infectés au *Plasmodium falciparum* (Febbraio *et al.*, 2001, Park 2014). Certains sites de liaisons se chevauchent, par exemple les LDLox au niveau des acides aminés 155-183 et les AGLC au niveau des acides aminés 127-279 (Nergiz-Unal *et al.*, 2011). Le site de liaison

des analogues azapeptidiques du GHRP-6 qui font l'objet de ce mémoire chevauche également celui du LDLox (Demers *et al.*, 2004, Proulx *et al.*, 2012). Ainsi, le récepteur CD36 joue des rôles variés selon le type cellulaire qui l'exprime, dont facilitateur de stockage des AGLC, récepteur anti-angiogénique, phagocyte et récepteur éboueur des lipoprotéines (Silverstein *et al.*, 2000, Febbraio *et al.*, 2001).

Chez les cellules endothéliales microvasculaires, le CD36 joue le rôle d'inhibiteur de l'angiogenèse médiée par les facteurs de croissance comme le facteur de croissance vasculaire endothélial et le facteur de croissance des fibroblastes 2 (Febbraio *et al.*, 2001). En tant que récepteur de la TSP-1, le CD36 inhibe les signaux angiogéniques des facteurs de croissances, favorise les voies inflammatoires et induit l'apoptose cellulaire qui découlent de l'activation de la tyrosine kinase Fyn, de la caspase-3 et des MAPK p38 et *c-Jun N-terminal kinase 1* (JNK-1) (Jimenez *et al.*, 2000, Garcia-Bonilla *et al.*, 2014).

Un autre rôle du CD36 est de faciliter le transport et le stockage des AGLC au sein de plusieurs cellules, dont les adipocytes, les cellules musculaires squelettiques, les cardiomyocytes, les entérocytes et les hépatocytes (Febbraio *et al.*, 2001). Ainsi, le CD36 met à disposition des AGLC comme source énergétique pour plusieurs types cellulaires. D'ailleurs, des études ont montré que les cellules musculaires ont des réservoirs intracellulaires de CD36 qui peuvent être exprimés à la membrane dans le but d'augmenter le captage d'AGLC et servir de substrat pour la  $\beta$ -oxydation (Silverstein *et al.*, 2009, Park 2014). De plus, une déficience en CD36 (types I et II) peut causer une diminution du captage d'AGLC au niveau cardiaque et y induire un remodelage (Watanabe *et al.*, 1998).

Au niveau de la microglie, le complexe formé par le récepteur CD36, les intégrines  $\alpha_6\beta_1$  et le *cluster* de différenciation 47 (CD47) reconnaît le peptide A $\beta$  ce qui induit la génération d'espèces

réactive de l'oxygène et provoque l'assemblage de l'hétérodimère TLR4-TLR6 (Doens *et al.*, 2014). Le complexe CD36-TLR4/6 va alors entraîner l'activation de l'inflammasome NLRP-3 qui implique l'activation de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  (Sheedy *et al.*, 2013). De plus, ce complexe induit la voie inflammatoire de NF- $\kappa$ B via les protéines TRIF et MyD88, ce qui induit une sécrétion additionnelle de cytokines inflammatoires dont TNF $\alpha$ , IL-12 et IFN $\gamma$ .

Par ailleurs, au niveau des papilles linguales, l'ingestion d'AGLC chez le rongeur associe le CD36 à une hausse de calcium intracellulaire qui va préparer l'intestin à absorber ces lipides et va induire un rétrocontrôle négatif sur l'appétit des rongeurs envers la nourriture riche en gras (Silverstein *et al.*, 2009, Silverstein *et al.*, 2010).

De surcroît, l'expression du CD36 par les cellules dendritiques leur confère le rôle de phagocytes des cellules apoptotiques. Les cellules dendritiques vont exprimer des antigènes au lieu de dégrader la cellule, ce qui active les lymphocytes T cytotoxiques de l'immunité acquise (Febbraio *et al.*, 2001).

Le récepteur CD36 participe également à la phagocytose de composantes membranaires des segments externes des photorécepteurs de type bâtonnets de l'épithélium pigmentaire rétinien (Febbraio *et al.*, 2001). Ces composantes, dont font partie les phospholipides et les rhodospines, doivent être dégradées quotidiennement par des phagocytes afin de conserver une vision normale.

Un rôle additionnel du CD36 est de favoriser l'activation plaquettaire. Le récepteur CD36 exprimé par les plaquettes va lier le LDLox et activer une cascade de signalisation impliquant les kinases Fyn, Lyn, JNK-2 et Vav qui vont mener à l'activation puis l'agrégation plaquettaire (Silverstein 2009). Ce phénomène, couplé au rétrécissement de la lumière des vaisseaux sanguins dont l'intima est gorgée de cellules spumeuses dans la pathologie d'athérosclérose, augmente



fortement le risque de thrombose. Cela engendre ainsi un risque élevé de développer une maladie CV aiguë comme l'ACV et l'infarctus.

Comme décrit aux points 1.1.3.1.4 et 1.1.3.2.1 le CD36, exprimé à la surface des monocytes et macrophages, est le principal récepteur des lipoprotéines modifiées qui ont diffusé ou été transportées dans l'espace sous-endothélial, en plus d'être un PRR pour des signaux DAMP et PAMP (Stewart *et al.*, 2010). Dans la pathologie d'athérosclérose, l'internalisation excessive de lipoprotéines par les phagocytes mène à la formation de cellules spumeuses. En effet, le CD36 dirige le cholestérol sous forme d'ester vers des lysosomes dans lesquels ils vont se cristalliser (Tall *et al.*, 2015). Les cellules spumeuses finissent par entrer en apoptose, mais due à la défectuosité de l'efférocytose, elles ne sont pas phagocytées et entrent en nécrose secondaire. L'espace sous-endothélial est alors très pro-inflammatoire. Le CD36 des monocytes et macrophages stimulent de nombreuses voies inflammatoires en induisant des cascades impliquant l'hétérodimère TLR4/6 (Stewart *et al.*, 2010), les tyrosines kinases de la famille des Src comme Fyn et Lyn, de même que des MAPK tels JNK-1, JNK-2 et p38 (Silverstein *et al.*, 2009). De plus, en tant que co-récepteur des hétérodimères de TLR2/6, TLR2/1 et TLR2/4, le CD36 participe à l'activation de la voie inflammatoire de NF- $\kappa$ B dépendante de MyD88, IRAK et TRAF-6 (Mukherjee *et al.*, 2016). À la suite de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, il y a sécrétion de cytokines inflammatoires comme IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$ , suivie de l'assemblage et l'activation de l'inflammasome NLRP-3. L'induction de cette voie augmente également la transcription de iNOS, ce qui contribue au stress oxydatif caractéristique de l'athérosclérose.

L'expression du CD36 est régulée par plusieurs voies de signalisation, dont les principales sont LDLox-PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ , oxystérol-LXR $\alpha$ , AGLC-PPAR $\gamma$  et PPAR $\alpha$  (Chawla *et al.*, 2001, Glatz *et al.*, 2017). D'autres médiateurs sont également impliqués indirectement dans la régulation

du CD36. Par exemple, l'activation de la protéine Vav par Lyn va réguler à la hausse l'internalisation de LDLox par le CD36 (Chen *et al.*, 2015), ce qui contribue à la boucle de rétroaction positive de l'expression du récepteur CD36. De plus, la stimulation du CD36 par ses nombreux ligands va activer le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  ce qui induit des effets anti-inflammatoires (Croasdell *et al.*, 2015). De surcroît, l'internalisation des LDLox augmente la production de 9- et 13-HODE par la cyclooxygénase-2 et la lipoxygénase, respectivement (Michalik *et al.*, 2004). Ces derniers vont activer les PPAR et induire l'inhibition de voies inflammatoires comme celle de NF- $\kappa$ B, en plus de réduire la production de MMP et cytokines inflammatoires par les macrophages (Chinetti *et al.*, 2000).

## **1.7. Ligands synthétiques du CD36**

### **1.7.1. Le GHRP-6**

La famille des peptides de relâche de l'hormone de croissance (GHRPs) est composée de ligands synthétiques dérivés de la méthionine-enképhaline (Tyrosine-Glycine-Glycine-Phénylalanine-Méthionine-OH, Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH), un peptide endogène des récepteurs opiacés (Hughes *et al.*, 1975). Ces peptides ont la capacité de sécréter des hormones de croissance grâce à leur liaison avec le *growth hormone secretagogue receptor 1a* (GHS-R1a) (Howard *et al.*, 1996). Également connu sous le nom de récepteur de la ghréline, il a d'abord été identifié au niveau de l'estomac et au niveau neuronal, plus précisément dans la région de l'axe hypothalamus pituitaire (Kojima *et al.*, 1999, Kojima *et al.*, 2001). La ghréline est une molécule endogène sécrétée par les cellules P/D1 au niveau de l'estomac (Rindi *et al.*, 2002) qui stimule l'appétit et la relâche d'hormone de croissance (Kojima *et al.*, 1999, Kojima *et al.*, 2005). On retrouve également le GHS-R1a dans d'autres tissus, comme le myocarde et le cerveau (McGirr *et al.*, 2011).

Dans le cerveau, la liaison des GHRPs à leur récepteur GHS-R1a active une voie de signalisation dépendante de la phospholipase C (PLC), de l'inositol triphosphate (IP3), conduisant à l'activation de la protéine kinase C (PKC) (Chen 2000). L'induction de cette voie cause une augmentation du calcium intracellulaire et stimule la sécrétion d'hormone de croissance par l'hypophyse antérieure.

Une banque de peptides synthétiques analogues au GHRP-6 a été synthétisée et leurs propriétés pharmacologiques caractérisées (Bowers *et al.*, 1984, Momany *et al.*, 1984). Parmi ces molécules, l'hexaréline (Histidine-D-Tryptophane-Alanine-Tryptophane-D-Phénylalanine-Lysine-NH<sub>2</sub>, His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-ys-NH<sub>2</sub>) a été développé pour traiter l'hypopituitarisme (Deghenghi *et al.*, 1994). Des études subséquentes ont montré que ce peptide exerce des effets cardioprotecteurs qui sont indépendants de la relâche d'hormones de croissance (Locatelli *et al.*, 1999). En effet, la contractilité du myocarde est conservée chez un modèle de cœur de rat isolé et déficient en hormone de croissance (De Gennaro Colonna *et al.*, 1997). Le groupe de Ong a alors mené des essais de compétition de liaison et a montré que l'hexaréline exerce ses effets cardiaques en se liant à un récepteur autre que le GHS-R1a (Bodart *et al.*, 1999). Cet autre récepteur a ensuite été identifié comme étant le récepteur CD36 (Bodart *et al.*, 2002).

L'expression du CD36 étant ubiquitaire, il est rapidement devenu une cible d'intérêt pour le développement de thérapies dans diverses pathologies.

La contribution du CD36 dans l'athérosclérose a été démontrée *in vivo* notamment par l'utilisation de souris transgéniques. Des études comparant des souris mâles apoE<sup>-/-</sup> à des souris doublement déficientes en apoE et récepteur CD36 (apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup>) ont révélé que suivant 8 semaines de diète de type Western, les souris n'exprimant pas le CD36 avaient environ 75% moins de lésions au niveau de l'aorte (Febbraio *et al.*, 2000). D'autres études subséquentes ont confirmé

ces résultats (Kuchibhotla *et al.*, 2008). C'est ainsi que le récepteur CD36 est devenu une cible thérapeutique d'intérêt dans la pathologie d'athérosclérose.

### 1.7.2. Le EP80317

La découverte du site de liaison des GHRP qui chevauche celui des LDLox au niveau de la poche hydrophobe du CD36 et de l'effet cardioprotecteur de l'hexaréline observée dans un modèle de cœur de rat isolé a encouragé l'étude des effets pharmacologiques d'autres peptides de la série. En particulier, la recherche d'une molécule qui n'aurait pas d'activité somatotrope, tout en se liant au CD36. En effet, une limitation des dérivés du GHRP-6 pour le traitement de l'athérosclérose est son affinité relative plus importante envers le récepteur GHS-R1a plutôt que le CD36. On compte parmi ceux-ci un autre analogue hexapeptidique, le EP80317 (Haic-D-2MeTrp-D-Lys-Trp-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) (Marleau *et al.*, 2005). Ce dernier est dépourvu de la capacité de sécréter l'hormone de croissance et montre une affinité augmentée envers le CD36 et réduite pour le GHS-R1a lorsque comparé à l'hexaréline (Demers *et al.*, 2004, Marleau *et al.*, 2005). Effectivement, la concentration inhibitrice à 50% (CI<sub>50</sub>) envers le GHS-R1a est de  $7,5 \times 10^{-7}$  M pour le EP80317 et de  $1,59 \times 10^{-8}$  M pour l'hexaréline (Proulx *et al.*, 2012). De plus, ces 2 composés ont une affinité semblable envers le CD36, soit dans l'ordre du micromolaire.

Étant donné la contribution du CD36 dans la pathologie d'athérosclérose, le EP80317 est devenu un candidat d'intérêt pour traiter cette pathologie. Dans le contexte où des souris apoE<sup>-/-</sup> ont été nourries avec une diète HFHC et traité avec le EP80317 pendant 12 semaines, notre laboratoire a montré une diminution des lésions au niveau de l'aorte de 51% pour les souris traitées avec le EP80317 comparé à des souris ayant reçu le véhicule seulement (0,9% NaCl) (Marleau *et*

*al.*, 2005). Cette observation est accompagnée d'une réduction de 30% du cholestérol total plasmatique. Les macrophages péritonéaux isolés de souris apoE<sup>-/-</sup> et exposés à des LDLox *in vitro* ont montré une augmentation de l'ARN messager (ARNm) codant pour le LXR $\alpha$  et l'ABCG-1. De plus, il y a une augmentation de l'expression des protéines PPAR $\alpha/\gamma$ , LXR $\alpha$ , ABCA-1 et ABC-G1, tel que le montre une analyse par *Western Blot* d'homogénats de tissus aortiques. D'autres études se sont ensuite intéressées aux effets potentiels du EP80317 sur l'efflux et le transport inverse du cholestérol (Bujold *et al.*, 2009, Bujold *et al.*, 2013). Un essai *in vitro* a permis de déterminer que l'exposition de macrophages péritonéaux isolés de souris apoE<sup>-/-</sup> au EP80317 augmentait l'expression des protéines ABCA-1 et ABCG-1 en induisant une activation de la voie de signalisation dépendant des *extracellular signal-regulated kinases-1 et -2* (ERK-1/2), de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et de la production de prostaglandines J2 (PGJ<sub>2</sub>) (Bujold *et al.*, 2009). Cette voie conduit en effet à la transcription des gènes codant pour LXR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , CD36 et les transporteurs ABC.

Un autre fait d'intérêt est que ces effets n'ont pas été observés chez les souris apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup>, ce qui montre que la présence du récepteur CD36 est requise pour induire les effets anti-athérosclérotiques énumérés (Marleau *et al.*, 2005). Ces résultats prometteurs ont ainsi permis d'avancer l'hypothèse que le EP80317 pourrait interférer avec l'internalisation de LDLox et l'efflux de cholestérol dans la pathologie d'athérosclérose.

Des études subséquentes ont été réalisées dans le but de mieux caractériser les mécanismes athéroprotecteurs du EP80317 (Harb *et al.*, 2009). Dans l'une de ces études, des souris ont été à nouveau nourries avec une diète HFHC et ont reçu un traitement quotidien du EP80317 ou du véhicule, pour une période de 12 semaines. Ensuite, des macrophages péritonéaux isolés de souris apoE<sup>-/-</sup> ont été marqués à l'indium (In<sup>111</sup>), puis injectés aux souris traitées. D'une part, cette étude

a pu reproduire les résultats de la première en termes de diminution de la taille des lésions au niveau de l'aorte et de réduction du cholestérol total plasmatique, de l'ordre de 43% et 27%, respectivement, lorsque le groupe traité par le EP80317 a été comparé à celui recevant le véhicule seulement. D'autre part, les souris traitées avec le EP80317 ont présenté une diminution de l'accumulation de macrophages-In<sup>111</sup> au niveau du vaisseau aortique de 65% lorsque comparé au groupe ayant reçu le véhicule. De plus, nous avons observé une diminution de l'expression génique de iNOS, VCAM-1 et CCL-2 à partir d'homogénats d'aortes et également une réduction de l'expression de VCAM-1 par immunohistochimie sur des coupes transversales d'aortes des souris traitées avec le EP80317. Il semble donc qu'un traitement par le EP80317 diminue l'inflammation et le recrutement des cellules immunitaires au niveau des lésions.

Dans une autre étude, des macrophages marqués au radio-isotope <sup>3</sup>H ont injectés dans le péritoine de souris ayant reçu le EP80317 ou le véhicule pendant une période de 12 semaines. Ensuite, l'excrétion de ces cellules marquées a été monitorée (Bujold *et al.*, 2013). Les résultats de cette étude ont montré une augmentation de la sécrétion dans les fèces et une diminution au niveau du foie des macrophages marqués. Bien qu'il n'y ait aucun changement en termes d'ARNm dans les homogénats de foie, il y a une augmentation au niveau de l'ARNm de LXR, ABCA-1 et ABCG-1 au niveau du jéjunum. Ainsi, l'administration de EP80317 induit une augmentation du transport inverse du cholestérol dans les macrophages vers les fèces.

Les effets du composé EP80317 ont également été caractérisés dans une autre pathologie cardiovasculaire, soit le cœur ischémié et reperfusé. Cette maladie a été étudiée via un modèle murin de chirurgie dans lequel l'artère coronaire gauche est temporairement ligaturée dans le but de causer une ischémie du myocarde pendant 30 minutes. Ce dernier est ensuite reperfusé en retirant cette ligature. L'ischémie, mais également la reperfusion, cause des dommages importants

à la fraction du cœur où le sang ne circule plus. Dans ce modèle, le EP80317, en tant que ligand sélectif du récepteur CD36, a pu réduire la taille de l'infarctus d'environ 30% et améliorer la fonction cardiaque en réduisant les taux circulants d'acides gras non estérifiés (Bessi *et al.*, 2012). En accord avec les résultats obtenus dans un modèle murin d'athérosclérose apoE<sup>-/-</sup>, le EP80317 favorise l'accumulation d'acides gras sous forme de triglycérides, diminue la lipolyse et donc le cholestérol plasmatique.

### 1.7.3. Le potentiel thérapeutique des azapeptides

Toujours dans l'objectif de développer et caractériser des molécules ayant une plus grande sélectivité envers le CD36 plutôt que le GHS-R1s, des études de relation structure-activité ont été menées sur des dérivés azapeptides du GHRP-6 (Sabatino *et al.*, 2011, Proulx *et al.*, 2012). Ces azapeptides ont un ou plusieurs résidus acides aminés dans lesquels un carbone alpha est remplacé par un atome d'azote. Cette modification change la conformation de la molécule de sorte que sa stabilité et sa durée d'action sont augmentées. Le CP-3(iv), un azaPhe<sup>4</sup>, présente une affinité semblable au GHRP-6 envers le CD36 ( $IC_{50} = 7,58 \times 10^{-6}$ ), mais sans lier le GHS-R1a ( $IC_{50} \gg 10^{-5}$ ). De surcroît, cet azapeptide a une affinité augmentée envers le CD36 comparé au EP80317. De plus, des études *in vitro* ont montré que le CP-3(iv) activerait une signalisation dépendante du CD36 via les kinases Src et Akt (Proulx *et al.*, 2012).

Le CP-3(iv) a été étudié par notre groupe dans le modèle d'ischémie-reperfusion de l'artère coronaire gauche (Huynh *et al.*, 2018). Suivant une ischémie de 30 minutes, des souris de type sauvage ou CD36<sup>-/-</sup> ont été sacrifiées après 6 ou 48 heures de reperfusion et l'étendue de l'ischémie a été mesurée. Cette étude s'est penchée sur la contribution de l'adiponectine dans les effets

cardioprotecteurs des dérivés azapeptides du GHRP-6. Cette adipokine antilipolytique et antioxydante induit également une diminution des acides gras non estérifiés et serait importante dans la préservation de la fonction cardiaque dépendante du CD36.

Un prétraitement quotidien pendant 14 jours du CP-3(iv) suivi d'une ischémie et d'une reperfusion de 48 heures a permis de réduire le ratio zone ischémisée/aire ventricule gauche, de même que le ratio zone ischémie/zone à risque. Comme attendu, les groupes de souris ayant reçu le véhicule (0,9% NaCl) ou été traités par le CP-3(iv) ont des zones à risque comparable; cela signifie que la chirurgie d'ischémie a été effectuée de façon identique entre les groupes. Faits intéressants, le CP-3(iv) a diminué de 54% la taille de l'infarctus, a induit transitoirement l'expression de l'adiponectine suivant une reperfusion de 6 heures et a augmenté l'expression génique de l'adiponectine et de ses régulateurs transcriptionnels PPAR $\gamma$ , *CCAAT/enhancer-binding protein delta* (C/EBP) et Sirtuin 1 (Sirt-1) au niveau du gras épидидymal. Ces effets ont été accompagnés d'une réduction du stress oxydatif et de l'apoptose cellulaire par la diminution d'espèces réactives de l'oxygène et de l'activité de la caspase-3. De plus, cette étude a montré que ces effets étaient dépendants de la présence du CD36, puisque la diminution de taille de l'infarctus chez les souris traitées avec le CP-3(iv) était abrogée chez les souris CD36<sup>-/-</sup>.

Un autre azapeptide, le MPE-001 (His-D-Trp-Ala-azaTyr-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) a été étudié dans le contexte de maladies rétinienne inflammatoires (Mellal *et al.*, 2019). Les phagocytes mononucléaires, dont font partie les monocytes et macrophages, contribuent à l'inflammation dans l'espace sous-rétinien et participent donc à la dégénérescence des photorécepteurs et de l'épithélium pigmenté rétinien. Ces derniers sont à l'origine de plusieurs pathologies dont la rétinopathie diabétique, la dégénérescence maculaire liée à l'âge et la rétinite pigmentaire. Le récepteur CD36 exprimé par les monocytes et macrophages peut être co-localisé avec



l'hétérodimère TLR2/6. L'activation du complexe CD36-TLR2/6 active les voies inflammatoires de NF- $\kappa$ B et de l'inflammasome NLRP-3, ce qui contribue au développement de maladies rétinienne.

Dans un modèle *in vivo* de souris exposées à une lumière bleue de 6000 lux pendant 5 jours, la dégénérescence des cellules de l'espace sous-rétinien a été ralentie par un traitement quotidien avec le MPE-001 pendant 7 jours après un premier 24 heures d'illumination (Mellal *et al.*, 2019). En effet, l'azapeptide a réduit l'inflammation, la mort des photorécepteurs et l'expression de médiateurs inflammatoires comme iNOS et l'IL-12. De plus, les macrophages des souris illuminées et traitées avec le MPE-001 expriment davantage le marqueur CD206 caractéristique du sous-type anti-inflammatoire M2. Les effets du MPE-001 sont dépendants de l'expression du CD36 puisqu'ils ont été observés chez les souris de type sauvage, mais pas sur les CD36<sup>-/-</sup>.

*In vitro*, le MPE-001 a permis une diminution de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires par les macrophages, tels TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12 et CCL-2, suivant une stimulation de macrophages péritonéaux par des agonistes du TLR-2 (Mellal *et al.*, 2019). De plus, le métabolisme des macrophages dérivés de la moelle osseuse différenciés en M1 a été modifié de sorte que la voie PPAR- $\gamma$ /PGC-1 $\alpha$  est favorisée. Cette dernière va à son tour va augmenter la bêta-oxydation typique des macrophages anti-inflammatoires (Vats *et al.*, 2006).

## **1.8. Hypothèse de recherche et objectifs spécifiques**

Une étape cruciale dans la genèse des plaques athérosclérotiques est la transformation des macrophages en cellules spumeuses dans l'intima des vaisseaux sanguins. Le récepteur CD36 peut jouer des rôles opposés dans l'inflammation caractéristique de l'athérosclérose. D'un côté,

il participe à la clairance des LDL modifiées pro-inflammatoires qui infiltrent l'espace sous-endothélial, mais d'un autre côté cela contribue largement à la formation de cellules spumeuses (Itabe *et al.*, 2011). Ce phénomène est nourri par le dysfonctionnement de plusieurs mécanismes dans l'athérosclérose, dont ceux d'internalisation et d'efflux de cholestérol, d'activation de voies pro- et anti-inflammatoires et de recrutement de cellules immunitaires (Galkina *et al.*, 2009).

Tel que l'ont démontré les études précédemment menées et détaillées au point précédent, les dérivés des GHRP-6 sélectifs envers le récepteur CD36 présentent plusieurs propriétés anti-inflammatoires. Les dérivés azapeptides sont particulièrement d'intérêts étant donné leur sélectivité et affinité envers le CD36. Ainsi, à la lumière du potentiel thérapeutique attrayant des dérivés azapeptidiques du GHRP-6, notre groupe croit que la modulation du récepteur CD36 est une avenue prometteuse pour le développement d'une thérapie pour traiter la pathologie d'athérosclérose.

On compte parmi les candidats thérapeutiques le MPE-001, précédemment étudié dans le contexte de maladies rétiniennes inflammatoires, mais également le MPE-003, un analogue aza-Gly<sup>4</sup> du GHRP-6 (His-D-Trp-Ala-[aza-(N,N-diallylaminobut-2-ynyl)Gly<sup>4</sup>]ff-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>) (Zhang *et al.*, 2014).

L'hypothèse centrale de mon projet de recherche stipule qu'un traitement chronique par les azapeptides MPE-001 et MPE-003 permet de diminuer la progression et d'induire la régression des lésions d'athérosclérose chez un modèle murin déficient en apoE.

Plus spécifiquement, ce projet vise l'évaluation des effets de ces azapeptides sur l'étendue des lésions athérosclérotiques à plusieurs sites, soit l'aorte, le sinus aortique et l'artère

brachiocéphalique. Nous souhaitons également caractériser les profils plasmatiques du cholestérol total, des LDL et des cytokines/chimiokines inflammatoires CRP, CCL-2, IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$ . De plus, nous voulons évaluer l'expression de gènes d'intérêts par qPCR, dont le CD36, PPAR $\gamma$ , LXR $\alpha$ , ABCA-1 et MerTK et évaluer la quantité et le phénotype des macrophages au sein de lésions avancées.

Les résultats de ce projet sont inclus dans l'article suivant. Ce dernier est présenté au chapitre 2.

« Frégeau G, Sarduy R, Elimam H, Esposito CL, Mellal K, Ménard L, Leitão da Graça SD, Proulx C, Zhang J, Febbraio M, Soto Y, Lubell WD, Ong H, Marleau S (2020). "Atheroprotective and atheroregressive potential of azapeptide derivatives of GHRP-6 as selective CD36 ligands." *Atherosclerosis*. 2020 Aug;307:52-62. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.06.010. »

La contribution de chacun des auteurs va comme suit:

Geneviève Frégeau (co-premier auteur) – Conceptualisation, méthodologie, validation, investigation, visualisation, administration du projet, analyses formelles, écriture et révision du manuscrit

Roger Sarduy (co-premier auteur) – Conceptualisation, méthodologie, validation, investigation, visualisation, analyses formelles, écriture et révision du manuscrit

Hanan Elimam – Investigation, analyses formelles, écriture et révision du manuscrit

Cloé L. Esposito – Validation, visualisation, écriture et révision du manuscrit

Katia Mellal – Méthodologie, investigation, visualisation, analyses formelles, écriture et révision du manuscrit

Liliane Ménard – Méthodologie, investigation, visualisation, analyses formelles, écriture et révision du manuscrit

Silas D. Leitão da Graça – Validation, révision du manuscrit

Caroline Proulx – Investigation, révision du manuscrit

Jinqiang Zhang – Investigation, révision du manuscrit

Maria Febbraio – Conceptualisation, méthodologie, ressources, écriture et révision du manuscrit

Yosdel Soto – Conceptualisation, révision du manuscrit

William D. Lubell – Investigation, ressources, acquisition de financement, écriture et révision du manuscrit

Huy Ong – Conceptualisation, ressources, acquisition de financement, supervision, écriture et révision du manuscrit

Sylvie Marleau – Conceptualisation, méthodologie, validation, ressources, acquisition de financement, administration du projet, écriture et révision du manuscrit

**Chapitre 2 – Article scientifique : Atheroprotective and atheroregressive potential of azapeptide derivatives of GHRP-6 as selective CD36 ligands in apolipoprotein E deficient mice**

**Atheroprotective and atheroregressive potential of azapeptide derivatives of GHRP-6 as selective CD36 ligands in apolipoprotein E-deficient mice**

Geneviève Frégeau<sup>a,1</sup>, Roger Sarduy<sup>a,1,2</sup>, Hanan Elimam<sup>a,c</sup>, Cloé L. Esposito<sup>a</sup>, Katia Mellal<sup>a</sup>, Liliane Ménard<sup>a</sup>, Silas D. Leitão da Graça<sup>a</sup>, Caroline Proulx<sup>b,3</sup>, Jinqiang Zhang<sup>b,4</sup>, Maria Febbraio<sup>d</sup>, Yosdel Soto<sup>a,2</sup>, William D. Lubell<sup>b</sup>, Huy Ong<sup>a</sup>, and Sylvie Marleau<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Faculty of Pharmacy and <sup>b</sup>Department of Chemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada. <sup>c</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Sadat City, Sadat City, Egypt. <sup>d</sup>*Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada*

**Author of correspondence: Sylvie Marleau**

Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7; Tel: 514-343-7110; E-mail: [sylvie.marleau@umontreal.ca](mailto:sylvie.marleau@umontreal.ca)

<sup>1</sup> Joint first authors.

<sup>2</sup> Present address: Department of Immunobiology, Center of Molecular Immunology, 216 St. & 15th Ave, Atabey, Playa, PO Box 16040, Havana 11600, Cuba

<sup>3</sup> Present address: Department of Chemistry, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina 27695-8204, United States

<sup>4</sup> Present address: School of Pharmaceutical Sciences, Chongqing University, Chongqing 401331, P. R. China

**Author's emails:** [genevieve.fregeau.1@umontreal.ca](mailto:genevieve.fregeau.1@umontreal.ca); [roger@cim.sld.cu](mailto:roger@cim.sld.cu);  
[hanan.elimam@fop.usc.edu.eg](mailto:hanan.elimam@fop.usc.edu.eg); [cloe.esposito@umontreal.ca](mailto:cloe.esposito@umontreal.ca); [katia.mellal@umontreal.ca](mailto:katia.mellal@umontreal.ca);  
[liliane.menard@umontreal.ca](mailto:liliane.menard@umontreal.ca); [silas.ronald.dubeau.leitao.da.graca@umontreal.ca](mailto:silas.ronald.dubeau.leitao.da.graca@umontreal.ca);  
[cproulx@ncsu.edu](mailto:cproulx@ncsu.edu); [j.zhang1983@cqu.edu.cn](mailto:j.zhang1983@cqu.edu.cn); [febbraio@ualberta.ca](mailto:febbraio@ualberta.ca); [yosdel@cim.sld.cu](mailto:yosdel@cim.sld.cu);  
[william.lubell@umontreal.ca](mailto:william.lubell@umontreal.ca); [huy.ong@umontreal.ca](mailto:huy.ong@umontreal.ca); [sylvie.marleau@umontreal.ca](mailto:sylvie.marleau@umontreal.ca).

## **Abstract**

### *Background and aims*

Scavenger receptor class B member 3, also known as cluster of differentiation-36 (CD36) receptor, is involved in the uptake and accumulation of modified lipoprotein in macrophages, driving atherosclerosis progression. Azapeptide analogs of growth hormone-releasing peptide-6 (GHRP-6) have been developed as selective CD36 ligands and evaluated for their anti-atherosclerotic properties in *apoe*<sup>-/-</sup> mice.

### *Methods*

From 4 to 19 weeks of age, male *apoe*<sup>-/-</sup> mice were fed a high fat high cholesterol (HFHC) diet, then switched to normal chow and treated daily with 300 nmol/kg of MPE-001 ([aza-Tyr<sup>4</sup>]-GHRP-6) or MPE-003 ([aza-(*N,N*-diallylaminobut-2-ynyl)Gly<sup>4</sup>]-GHRP-6) for 9 weeks. In another protocol, mice were fed a HFHC diet throughout the study.

### *Results*

Azapeptides decreased lesion progression in the aortic arch and reduced aortic sinus lesion areas below pre-existing lesions levels in *apoe*<sup>-/-</sup> mice which were switched to *chow diet*. In mice fed a HFHC throughout the study, azapeptides reduced lesion progression in the aortic vessel and sinus. The anti-atherosclerotic effect of azapeptides was associated with a reduced ratio of iNOS<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> macrophages within lesions, and lowered plasma inflammatory cytokine levels. Monocytes from azapeptide-treated mice showed altered mitochondrial oxygen consumption rates, consistent with an M2-like phenotype. These effects were dependent on CD36, and not observed in *apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup> mice.

### *Conclusion*

Azapeptides MPE-001 and MPE-003 diminished aortic lesion progression and reduced, below pre-existing levels, lesions in the aortic sinus of atherosclerotic mice. A relative increase of M2-like

macrophages was observed in lesions, associated with reduced systemic inflammation. Development of CD36-selective azapeptide ligands merits consideration for treating atherosclerotic disease.

**Word count:** 250

**Keywords:** CD36; azapeptides; atherosclerosis; macrophages; regression



## 1. Introduction

A hallmark of atherosclerosis is scavenger receptor-mediated accumulation of lipid-laden cells into the intima [1, 2]. Within the arterial wall, the class B scavenger cluster of differentiation-36 receptor (CD36, Scarb3) has been shown to play a prominent role in the extensive endocytosis of modified forms of low-density lipoproteins (LDL) by macrophages. Notably, CD36-mediated uptake of oxidized LDL (oxLDL) promotes an inflammatory and oxidative stress burden [3-5].

Synthetic peptide analogs of growth hormone-releasing peptide-6 (GHRP-6) (e.g. hexarelin and EP80317) have been previously shown to bind to the ectodomain of CD36 at a site overlapping that of oxLDL [6, 7]. Administration of the synthetic peptide EP80317 in *apoe*-KO (*apoe*<sup>-/-</sup>) mice exerted both preventive and therapeutic effects on chronic atherosclerotic lesion progression [8] and fostered transintestinal cholesterol excretion [9]. The atheroprotection induced by EP80317 treatment was CD36-dependent; no effect was observed in *apoe/cd36* double deficient (*apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup>) mice [8]. In peritoneal macrophages, EP80317 elicited a modest (~20%) reduction of oxLDL internalization [8]. Moreover, EP80317 increased cholesterol efflux through the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )-liver X receptor alpha (LXR- $\alpha$ )-ATP binding cassette A1/G1 (ABCA1/G1) pathway [10]. PPAR $\gamma$  has been identified as a crucial transcriptional regulator of macrophage phenotypic polarization towards a non-inflammatory, M2 macrophage phenotype [11], thus playing an important role in the resolution of inflammation [12].

Studies of GHRP-6 analogs have supported the development of more selective peptide modulators to target CD36 for the treatment of atherosclerosis. In this context, azapeptide derivatives of GHRP-6, in which the  $\alpha$ -CH of one of the central residues was replaced by a nitrogen atom, have shown high receptor selectivity and low micromolar CD36 binding affinity [13]. Azapeptides have also been shown to exert anti-inflammatory activity *in vitro*, reducing stimulated nitric oxide production in macrophage cell lines [14].

Preclinical studies aiming to identify novel therapeutic avenues for the treatment of atherosclerosis have focused on preventing or reducing lesion progression in early phases of the pathology [15]. Potential drug candidates have been mainly assessed for their ability to attenuate lesion development in early phases of atherosclerosis [16]; however beneficial effects are also desirable at later phases of atherosclerosis, specifically the ability to induce plaque regression [17-19].

In addition to reduced apoB-containing lipoproteins, biomarkers of regressive mechanisms include enhancement of cholesterol and lipid efflux, reverse cholesterol transport and foam cell emigration out of lesions or clearance by efferocytosis [19, 20]. Impaired efferocytosis is associated with a reduced number of phagocytic macrophages, and may perpetuate lesion inflammation and foam cell expansion, promoting plaque vulnerability [21, 22]. CD36 expression has been observed to increase in the anti-inflammatory macrophage subtype [23]. The roles of CD36 in dysfunctional efferocytosis during atherogenesis progression and regression require additional clarification.

In the present study, the atheroprotective potential of CD36-selective aza-GHRP-6 analogs has been further evaluated. The therapeutic effect of two novel azapeptides, MPE-001 and MPE-003, have been studied in high fat high cholesterol (HFHC)-fed *apoe*<sup>-/-</sup> mice. The effects of azapeptides were assessed on both atherosclerotic lesions progression and regression. Moreover, a mechanism has been delineated to explain, in part, the observed vasculoprotection afforded by the CD36-selective azapeptides.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Experimental protocols**

In a first experimental setting (Fig. 1A), 4-week-old *apoe*<sup>-/-</sup> male mice were randomly assigned to one of four experimental groups: basal group (n = 6), which were euthanized at week

19, MPE-001 (300 nmol/kg), MPE-003 (300 nmol/kg) or 0.9% NaCl (n = 11 per group) which were euthanized at week 28. Mice were fed with a HFHC, cholate free diet (D12108c, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA) containing 20 kcal% protein, 40 kcal% fat and 1.25% cholesterol (wt/wt), until 19 weeks of age. The diet was then changed to normal chow and daily subcutaneous (s.c.) treatments with MPE-001, MPE-003 or 0.9% NaCl were initiated and pursued for 9 more weeks. Additional studies were performed in *apoe<sup>-/-</sup>cd36<sup>-/-</sup>* mice subjected to the same diet/treatment conditions (Fig. 3B) (n = 8-14 mice per group).

In another study, 4-week-old *apoe<sup>-/-</sup>* mice were fed a HFHC diet throughout the protocol (Fig. 4A) (n = 9-13 mice per group). A fifth group was added, in which mice were treated daily with 300 nmol/kg s.c. of [aza-Lys<sup>6</sup>]-GHRP-6 as a negative control [24]. At week 12, the basal group was euthanized and treatments were initiated in the other groups for 8 more weeks. Similar studies were also performed in *apoe<sup>-/-</sup>cd36<sup>-/-</sup>* mice (Supplemental Fig. 9A).

After fasting for 12 h, blood samples were drawn from the submandibular vein and plasma (heparin sodium, 10 U/mL) or serum was collected. Mice were then euthanized under isoflurane anesthesia (Fresenius Kabi, Toronto, ON, Canada), followed by exsanguination via an intracardiac puncture and perfusion with PBS.

## 2.2. Azapeptides

Azapeptide analogs of GHRP-6, MPE-001, MPE-003 and [aza-Lys<sup>6</sup>]-GHRP-6 (Supplemental Figs. 1A–C), were respectively synthesized and characterized as described previously [13, 25, 26], and reconstituted in sterile 0.9% NaCl before injection.

Supplemental Materials and Methods are available in Appendix A.

### 3. Results

#### 3.1. Azapeptides reduce atherosclerotic lesions below the baseline level in aortic sinuses of *apoe*<sup>-/-</sup> mice after switching diet from HFHC to normal chow

In a first setting, *apoe*<sup>-/-</sup> mice were fed a HFHC diet from 4 to 19 weeks of age. A group was then euthanized (to determine baseline values), whereas vehicle- and azapeptide-treated mice received their treatment and were switched to normal chow diet until week 28 (Fig. 1A).

Both aortic sinuses and aortic crosses were evaluated for lesion areas. Representative photomicrographs of aortic sinuses from mice at week 19 (baseline) and week 28 (vehicle, MPE-001 and MPE-003) are shown in Fig. 1B and lesion areas, expressed as a percentage of the total area, are illustrated in Fig. 1C. After reversion to normal chow for 9 weeks, the vehicle-treated group (week 28) displayed no significant difference in the mean lesion size from that of the basal group (week 19), suggesting no lesion progression after the change of diet. In contrast, mice treated with azapeptides featured mean lesion areas which were reduced by ~20% ( $p < 0.01$ ) compared to pre-existing lesion areas at week 19. Treatment with azapeptides was associated with a ~30% ( $p < 0.01$ ) reduction in necrotic areas within aortic sinus lesions (Supplemental Fig. 2).

Contrary to aortic sinus lesion areas, lesions in aortic arches continued to grow from weeks 19 to 28 in vehicle-treated *apoe*<sup>-/-</sup> mice, as shown by the 63% ( $p < 0.01$ ) increase in lesion areas compared to the basal group (Fig. 1D and 1E). Lesion areas expanded despite a halving of plasma cholesterol levels (Fig. 1F) which reached the values previously observed in *apoe*<sup>-/-</sup> mice fed a normal chow diet (~13 mM) [8]. Azapeptides MPE-001 and MPE-003 attenuated the progression of aortic arch lesion areas by 26 and 30% ( $p < 0.05$ ), respectively, compared to vehicle-treated mice (Fig. 1E). Compared to vehicle treatment, azapeptides did not modulate plasma cholesterol (Fig. 1F) nor triglyceride levels (Supplemental Fig. 3). Azapeptide MPE-001, but not MPE-003,

reduced plasma levels of the pro-inflammatory cytokine  $\text{Il-1}\beta$  by 24% ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1G). Neither body weight nor food intake were modulated by treatment with azapeptides (Supplemental Fig. 4). Furthermore, total and differential leukocytes blood counts were not altered by azapeptide treatment (Supplemental Fig. 5).

### **3.2. Azapeptides reduced macrophage content and the relative numbers of pro-inflammatory macrophages in the brachiocephalic artery of *apoe*<sup>-/-</sup> mice after switching from HFHC to normal chow diet**

Immunostainings were performed on sequential, 4  $\mu\text{m}$  cross-sections of brachiocephalic artery (BCA) from five randomly selected mice, using universal-macrophage marker EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 (F4/80, EMR1), the M1-macrophage marker nitric oxide synthase 2 (iNOS, NOS2), the M2-macrophage marker mannose receptor c type 1 (CD206, MCR-1) and with Lillie's trichrome to detect collagen deposition (representative images shown in Fig. 2A and Supplemental Fig. 7B). Isotype control antibodies were used to detect nonspecific binding (Supplemental Fig. 6). In a manner similar to that observed in the aortic arch, BCA lesions from *apoe*<sup>-/-</sup> mice increased in size from week 19 (dotted line, basal group) to week 28 by  $\sim 2$ -fold ( $p < 0.001$ ) versus vehicle despite a change to chow diet (Fig. 2B). Compared to vehicle-treated mice, MPE-001 and MPE-003-treated mice tended to have reduced lesion areas (Fig. 2B), while MPE-003 diminished the absolute number of F4/80<sup>+</sup> macrophages by 40% ( $p < 0.01$ ) (Fig. 2C). However, azapeptides did not alter F4/80<sup>+</sup> cellularity (cell count per  $\text{mm}^2$  of lesions) (Supplemental Fig. 7D). In addition, MPE-003 elicited a change towards a non-inflammatory macrophage phenotype, expressed as a relatively lower expression of iNOS<sup>+</sup> versus CD206<sup>+</sup> cells within plaques (Fig. 2D). In agreement, the ratio of iNOS<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> was reduced in favor of the M2-like macrophage phenotype (Fig. 2E). The shift towards the M2-macrophage

phenotype associated with MPE-003 ( $p < 0.01$ ) was further validated using chitinase 3-like (YM1, Chil3) as a second M2 marker (Supplemental Fig. 7E). No differences in collagen deposition were associated with azapeptide treatment (Supplemental Fig 7C). Immunofluorescent F4/80 and iNOS double staining confirmed colocalization of both markers in BCA from *apoe*<sup>-/-</sup> mice treated respectively, with vehicle and azapeptides (Fig. 3A).

Treatment with MPE-001 and MPE-003 caused, respectively, 30 and 26% ( $p < 0.05$ ) reductions of abdominal aortic mRNA expression of *adhesion g protein-coupled receptor e1* (*Adgre1*), the F4/80 gene (Supplemental Fig. 8). In addition, mRNA of *matrix metalloproteinase 14* (*Mmp14*), which is highly expressed in macrophages [27], was decreased in the MPE-003-treated group ( $p < 0.05$ ) (Supplemental Fig. 8). Azapeptide treatments did not significantly modulate the mRNA levels of *CD68*, *ABCA1*, *matrix metalloproteinase 2* (*Mmp2*) and *caspase-1* (*Casp1*) (Supplemental Fig. 8).

### **3.3. In *apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup> mice, no anti-atherosclerotic effects of MPE-001 and MPE-003 were observed**

The anti-atherosclerotic effects induced by the azapeptides were shown to be CD36-dependent using *apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup> mice. After switching from a HFHC to a normal chow diet and initiating treatment with azapeptide (MPE-001 or MPE-003) or vehicle (0.9% NaCl) (Fig. 3B), *apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup> mice exhibited atherosclerotic lesions that tended to increase from week 19 to 28, as illustrated in photomicrographs (Fig. 3C), but at a lower level than those observed for *apoe*<sup>-/-</sup> mice. In the aortic arches of *apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup> mice, neither MPE-001 nor MPE-003 were able to attenuate atherosclerosis progression relative to vehicle-treated mice (Fig. 3D). Similar results were obtained after treatment of *apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup> mice that were maintained on a HFHC diet throughout the study (Supplemental Fig. 9).

### 3.4. Azapeptides MPE-001 and MPE-003 reduced atherosclerotic lesions progression in *apoE*<sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet throughout the study

In another setting, the atheroprotective effects of MPE-001 and MPE-003 were evaluated in male *apoE*<sup>-/-</sup> mice in which atherosclerotic lesions were induced by feeding a HFHC diet from 4 to 20 weeks of age. Mice were treated with a daily dose of 300 nmol/kg of azapeptides, s.c., from weeks 12 to 20. The azapeptide [aza-Lys<sup>6</sup>]-GHRP-6 and 0.9% NaCl were respectively used as a negative control and vehicle (Fig. 4A). Nearly 3- and 2.6-fold increase in aortic lesion areas were observed in the vehicle- and [aza-Lys<sup>6</sup>]-GHRP-6-treated groups, respectively, compared to the basal group (12 weeks of age) (Fig. 4B and C). After 8 weeks of treatment with MPE-001 and MPE-003, the extent of atherosclerotic lesion areas at the aortic level was reduced by more than 24% ( $p < 0.01$ ) and 29% ( $p < 0.001$ ) (Fig. 4C), respectively, relative to those of vehicle-treated mice maintained on the HFHC diet. The azapeptide negative control ([aza-Lys<sup>6</sup>]-GHRP-6) was unable to arrest atherosclerosis progression compared to vehicle. Atherosclerosis progression was inhibited under hypercholesterolemic conditions by azapeptides MPE-001 and MPE-003 which did not modulate plasma cholesterol (Fig. 4D), nor triglyceride levels (Supplemental Fig. 10). Oil red-O staining of aortic sinus sections (Fig. 4E) and morphometric quantification demonstrated an increase in lesion areas of 37% ( $p < 0.0001$ ) in the vehicle group, compared to the basal group (Fig. 4F). Azapeptides MPE-001 and MPE-003 reduced of aortic sinus lesion areas by 24% ( $p < 0.0001$ ) and 29% ( $p < 0.0001$ ), respectively, compared with those from vehicle-treated mice. In the MPE-003-treated group, the anti-atherosclerotic effect was associated with a significant reduction in circulating pro-inflammatory cytokines, including C-reactive protein (CRP) (25%,  $p < 0.05$ ), IL-6 (52%,  $p < 0.01$ ) and CCL-2 (40%,  $p < 0.05$ ) (Fig. 4G). In the MPE-001-treated group, IL-1 $\beta$  was significantly reduced (60%,  $p < 0.05$ ). Treatment with azapeptide had no observable

effect on body weight gain nor food intake (Supplemental Fig. 11). Representative BCA cross-sections illustrated a significant reduction of lesion areas by azapeptide MPE-003 ( $p < 0.0001$ ) compared to vehicle (Supplemental Fig. 12B and C); however the absolute number of F4/80<sup>+</sup> cells (Supplemental Fig. 12D) and F4/80<sup>+</sup> cellularity (Supplemental Fig. 13B) were unchanged. Furthermore, MPE-003 reduced the relative expression of iNOS<sup>+</sup> versus CD206<sup>+</sup> cells (Supplemental Fig. 12E). In agreement, MPE-003 decreased the iNOS<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> cell ratio by 65% ( $p < 0.001$ ) (Supplemental Fig. 12F). A similar trend was observed using YM1 as an additional marker of M2 macrophages (Supplemental Fig. 13C). No difference in collagen deposition was found in the BCA after azapeptide treatment (Supplemental Fig. 12G).

### **3.5. Azapeptides promoted aerobic metabolic shift in bone marrow-derived monocytes**

The predominance of M2-like macrophages in BCA lesions was investigated in bone marrow-derived monocytes (BMM) from *apoe*<sup>-/-</sup> and *apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup> mice after 12 weeks of treatment with azapeptides (Fig. 5A). The BMM from azapeptide-treated *apoe*<sup>-/-</sup> mice exhibited increased basal levels of oxygen consumption rates (OCR) compared to those of vehicle-treated animals (Fig. 5B). After the addition of potent uncoupler of mitochondrial oxidative phosphorylation carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP), the observed increase in OCR was more than 2-fold in azapeptide-treated compared to vehicle-treated mice (Fig. 5B). On the contrary, BMM from *apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup> mice treated with vehicle and azapeptide, respectively, exhibited no differences in OCR levels indicating once more the CD36-dependant effect of the latter (Fig. 5C).

Azapeptides also reduced pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$  and chemokine CCL-2 secretion by activated macrophages (Supplemental Fig. 14), as reported previously [28].



#### 4. Discussion

Pharmacological targeting of the CD36 receptor in male *apoe*<sup>-/-</sup> mice was examined under two diet regimens; HFHC diet, and HFHC diet followed by normal chow. Azapeptides MPE-001 and MPE-003 reduced lesion progression in mice fed a HFHC diet throughout the study and elicited regression at the aortic sinus level where lesion progression was halted by the switch of diet regimen from HFHC to normal chow. The CD36-selective ligands, MPE-001 and MPE-003, reduced lesion areas below pre-existing levels in the aortic sinus and greatly attenuated lesion progression in the aortic arch of *apoe*<sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet for 15 weeks then switched to chow and treated with azapeptide for 9 weeks. Under these conditions, characterization of macrophages within the BCA lesions of treated mice revealed reduced absolute numbers and a notable change of relative cell phenotype with a reduction in pro-inflammatory (M1) markers and an increase in anti-inflammatory (M2) cell markers. Neither total plasma cholesterol nor triglyceride levels were modified by azapeptide treatment. The anti-atherosclerotic effects of the azapeptides were dependent on CD36 expression, as they were not observed in *apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup> mice. The azapeptides exhibited similar anti-atherosclerotic effects in mice fed a HFHC diet throughout treatment. In contrast to the striking increase in lesion areas exhibited by *apoe*<sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet between 12 (basal group) and 20 weeks, marked reductions in lesion areas were observed at the aortic arch and sinus levels of mice treated with MPE-001 and MPE-003, but not to the extent of decreasing to baseline levels. Consistently, the azapeptides caused a change in the relative amounts of macrophage pro- and anti-inflammatory markers, indicative of a reduced M1 phenotype, which coincides with the observed diminishment of inflammatory mediators in circulation.

The roles of CD36 in atherosclerosis have been linked to Toll-like receptor (TLR)-dependent and independent pathways in early lesion formation [29, 30] and in plaque resolution through

macrophage efferocytosis [31]. In the pathogenesis of atherosclerosis, CD36 may be involved more extensively than initially anticipated. Previously, the GHRP-6-derived CD36 ligand EP80317 exhibited preventive and curative effects in atherosclerotic lesions [8] associated with impact on macrophage cholesterol metabolism and efflux, vascular inflammation and regulation of mononuclear cell trafficking [32]. Azapeptide analogs of GHRP-6 were later conceived as potent and selective CD36 ligands with CD36 binding affinities in the micromolar range [33]. In particular, the series of GHRP-6 peptides possessing aza-Tyr<sup>4</sup> and aza-Phe<sup>4</sup> residues exhibited promising cardiovascular properties *in vitro*. For example, [Aza-Tyr<sup>4</sup>]-GHRP-6 (MPE-001) exerted anti-angiogenic activity [34] and also dampened the retinal inflammation induced by photo-oxidative stress under blue light exposure, which was associated with a reduced accumulation of M1-activated macrophages at the subretinal level [28]. The activity of MPE-001 correlated with the inhibition of certain pro-inflammatory pathways, such as NF- $\kappa$ B activation of the NLRP3 inflammasome, but initiation of others, like the anti-inflammatory PPAR $\gamma$ -PGC-1 $\alpha$  pathways. The aza-Phe<sup>4</sup> analog, CP-3(iv), previously exhibited cardioprotective effects against myocardial ischemia-reperfusion by decreasing the generation of left ventricular reactive oxygen species and apoptosis [35]. The effects of CP-3(iv) were associated with an increase in plasma adiponectin and a transient reduction in circulating free fatty acid levels. The observed activity of CP-3(iv) was consistent with reduced lipolysis and damped total fatty acid uptake in the hearts of mice treated with other CD36 ligands in the myocardial ischemia-reperfusion model [36]. In the present study, CD36-selective azapeptide analogs of GHRP-6 are now shown to reduce atherosclerosis progression and to initiate the regression of lesions at the aortic sinus level in *apoe*<sup>-/-</sup> mice, which were switched from a HFHC to normal diet. Despite some controversy, regression of atherosclerotic lesions has been experimentally documented and reported to be associated with reduced foam-cell accumulation [19] without significant change in plasma cholesterol [37, 38].

Regression of atherosclerotic lesions in the azapeptides-treated mice was consistent with the latter findings. Even though patients benefit from therapies lowering high LDL, some are still at risk of residual inflammatory cardiovascular events [39]. Along that line, azapeptide treatment reduced systemic inflammation and diminished inflammatory macrophage numbers within lesions. These results coincide with other characteristics of lesion regression, including a reduction in foam cell accumulation and necrotic core areas within lesions [40].

In spite of a reduction in plasma cholesterol levels after switching *apoe*<sup>-/-</sup> mice from HFHC to chow, mice remained hypercholesterolemic. Therefore, lesions progressed between weeks 19 and 28, except at the level of the aortic sinus. The ability to observe regression in the aortic sinus of azapeptide-treated mice may be due, in part, to the absence of increased lesion area compared to baseline levels. In contrast, despite the change of diet, both the aortic arch and BCA displayed an increase in atherosclerotic lesion areas in vehicle-treated mice which may have impeded detection of azapeptide effects on lesion regression in these regions. Consequently, evidence of lesion regression was not observed. However, azapeptide-treated mice exhibited significant increases in markers characteristic of M2 macrophages and reduced inflammation [40]. Moreover, mRNA levels of *Adgre-1*, encoding the F4/80 antigen, and of *Mmp14* were both reduced, consistent with reduced macrophage accumulation at lesion sites of *apoe*<sup>-/-</sup> mice treated with the first generation CD36 ligand, EP80317 [32].

Notwithstanding the complexity of the different phenotypic states of macrophages overtime during lesion development, regression of pre-established lesions is correlated with M2 markers [40, 41]. Favoring tissue remodeling, repair and plaque stability, M2 macrophages clear lesions of dying cells and debris, and secrete anti-inflammatory mediators and cytokines [40]. In the M2 macrophage subtype, CD36 and PPAR $\gamma$  expression are correlated [42]. Moreover, the CD36 ligand EP80317 stimulated the PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ABCA1/G1 transporter pathway and cholesterol efflux in

macrophages [10] and reversed cholesterol transport in *apoe*<sup>-/-</sup> mice [9]. Both PPAR $\gamma$  and LXR $\alpha$  were reported to contribute to dampening inflammation, which leads to enhanced M2-like macrophages and reduced M1 phenotype [5, 42-44]. These observations are in agreement with the PPAR $\gamma$ -dependent cytoprotective effects of CD36-selective ligand MPE-001 [28] and coincide with the reduction of iNOS<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> ratio in azapeptides-treated mice in the current study.

Furthermore, BMM isolated from *apoe*<sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet showed an increase in mitochondrial activity following treatment with azapeptides. Oxygen consumption rates were higher at basal levels, but also upon addition of the protonophore FCCP in BMM from azapeptide-treated mice. This indicates a shift to aerobic metabolism that is consistent with previous observations in bone-marrow-derived macrophages [28]. Such intracellular metabolic shift coincides with an anti-inflammatory M2 macrophage subtype, which is characterized by enhanced rates of oxidative phosphorylation and fatty acid oxidation [45] and a role for CD36 in facilitating fatty acid uptake and oxidation [46]. In addition, the anti-inflammatory effect of azapeptides was shown in isolated macrophages by a reduction in cytokines secretion in a CD36-dependent manner (Supplemental Fig. 14).

These observations and those of our previous studies [10, 32] are consistent with atherosclerotic plaque resolution [18], as they show reduced aortic lesion areas, reduced macrophage accumulation, reduced endothelial and systemic inflammation at lesion sites, as well as increased cholesterol efflux and reverse cholesterol transport in EP80317-treated mice. Moreover, the azapeptide effects were associated with polarization of macrophages to an M2-like subtype. Reduced lesion areas and absolute F4/80<sup>+</sup> macrophage counts were observed in the BCA, a site known to develop advanced lesions in *apoe*<sup>-/-</sup> mice, although detection of azapeptide-induced regression in this region may have likely been impeded by diet-induced lesion progression. On the

other hand, at the aortic sinus level, azapeptides reduced necrotic areas which have notably been implicated in plaque instability [40].

During plaque regression, little evidence exists for significant proliferation of macrophages [47]. An increase expression of M2-like cell markers in the artery wall has been proposed to be attributed to the conversion of M1 macrophages to an M2-like state upon changes in the plaque environment, but could also be due to recruitment of new monocytes that become M2-like [20]. Although the origin of macrophages subpopulations within the different lesion sites and the immunomodulatory mechanism by which azapeptides alter macrophage numbers requires further study, ability to favor the M2-like state has probably significant beneficial consequences. The therapeutic effect of CD36-selective azapeptides on monocytes and macrophages are likely to be extended to other cell types and tissues expressing the scavenger receptor, including endothelium and vascular smooth muscle cells.

The azapeptides also exhibited antiatherogenic effects in *apoe*<sup>-/-</sup> mice which were fed a HFHC diet throughout the experiment. Pivotal cytokines associated with the proatherogenic function of M1 macrophages, such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and CCL-2, were decreased in circulation [48, 49]. A significant reduction in CRP plasma levels was also detected in the azapeptide-treated mice, probably as a consequence of decreasing the upstream regulator IL-6. A well-recognized indicator of inflammation, CRP expression often correlates with cardiovascular disease [50]. The results of the present study on the anti-atherosclerotic effects of azapeptides MPE-001 and MPE-003 encourage further examination. Additional studies aimed to ascertain cellular and molecular events implicated in their influence on monocyte trafficking at lesions sites, plaque macrophage apoptosis and CD36-mediated efferocytosis, remain to be done [23]

#### **4.1. Conclusion**

Azaeptide analogs of GHRP-6 have been shown to be potent and selective CD36 ligands. Treatment of *apoe*<sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet with such azaeptides reduced atherosclerosis progression, and elicited regression of aortic sinus lesions. These effects of azaeptides MPE-001 and MPE-003 were associated with a relative increase in M2-like macrophages within lesions. Azaeptide ligands of CD36 merit further development as a novel therapeutic avenue for treating atherosclerosis.

#### **Conflicts of interest**

HO is the Chief Scientific Officer of Mperia Therapeutics Inc. The other authors report no conflict of interest.

#### **Financial support**

This work was supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada (G-18-0022167), an educational grant from Mperia Therapeutics Inc., Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Discovery Grants (#04079 and #06647), and the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies from the Centre in Green Chemistry and Catalysis (FRQNT-2020-RS4-265155-CCVC).

#### **Author contributions**

GF, RS, HE, CLE, KM, SDLdG and LM performed the experiments and/or assays and analyzed the data. JZ, CP and WDL synthesized azaeptides. SM and HO designed the study. GF, RS, HE, CLE and SM wrote the paper. HE, MF, YS, WDL, and HO performed critical reading and editing of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision and approved the submitted version.

## **Acknowledgements**

RS received scholarship from the Ministère des relations internationales et de la francophonie du Québec and from the Emerging leaders in the America program. HE is a recipient of a grant from the Direction des affaires internationales, Université de Montréal. CP is grateful to NSERC and Boehringer Ingelheim for graduate student fellowships.

## References

- [1] Parthasarathy, S, Printz, DJ, Boyd, D, et al., Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor, *Arteriosclerosis*, 1986;6:505-510.
- [2] Rong, JX, Shapiro, M, Trogan, E, et al., Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003;100:13531-13536.
- [3] Endemann, G, Stanton, LW, Madden, KS, et al., CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein, *J Biol Chem*, 1993;268:11811-11816.
- [4] Podrez, EA, Febbraio, M, Sheibani, N, et al., Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species, *J Clin Invest*, 2000;105:1095-1108.
- [5] Moore, KJ, Sheedy, FJ and Fisher, EA, Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance, *Nat Rev Immunol*, 2013;13:709-721.
- [6] Demers, A, McNicoll, N, Febbraio, M, et al., Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study, *Biochem J*, 2004;382:417-424.
- [7] Sabatino, D, Proulx, C, Pohankova, P, et al., Structure-activity relationships of GHRP-6 azapeptide ligands of the CD36 scavenger receptor by solid-phase submonomer azapeptide synthesis, *J Am Chem Soc*, 2011;133:12493-12506.
- [8] Marleau, S, Harb, D, Bujold, K, et al., EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions, *FASEB J*, 2005;19:1869-1871.



- [9] Bujold, K, Mellal, K, Zoccal, KF, et al., EP 80317, a CD36 selective ligand, promotes reverse cholesterol transport in apolipoprotein E-deficient mice, *Atherosclerosis*, 2013;229:408-414.
- [10] Bujold, K, Rhains, D, Jossart, C, et al., CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPARgamma activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages, *Cardiovasc Res*, 2009;83:457-464.
- [11] Chawla, A, Control of macrophage activation and function by PPARs, *Circ Res*, 2010;106:1559-1569.
- [12] Jiang, C, Ting, AT and Seed, B, PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines, *Nature*, 1998;391:82-86.
- [13] Proulx, C, Picard, E, Boeglin, D, et al., Azapeptide analogues of the growth hormone releasing peptide 6 as cluster of differentiation 36 receptor ligands with reduced affinity for the growth hormone secretagogue receptor 1a, *J Med Chem*, 2012;55:6502-6511.
- [14] Chignen Possi, K, Mulumba, M, Omri, S, et al., Influences of Histidine-1 and Azaphenylalanine-4 on the Affinity, Anti-inflammatory, and Antiangiogenic Activities of Azapeptide Cluster of Differentiation 36 Receptor Modulators, *J Med Chem*, 2017;60:9263-9274.
- [15] Baylis, RA, Gomez, D and Owens, GK, Shifting the Focus of Preclinical, Murine Atherosclerosis Studies From Prevention to Late-Stage Intervention, *Circ Res*, 2017;120:775-777.
- [16] Charo, IF and Taub, R, Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis, *Nat Rev Drug Discov*, 2011;10:365-376.
- [17] Kalanuria, AA, Nyquist, P and Ling, G, The prevention and regression of atherosclerotic plaques: emerging treatments, *Vasc Health Risk Manag*, 2012;8:549-561.
- [18] Back, M, Yurdagul, A, Jr., Tabas, I, et al., Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities, *Nat Rev Cardiol*, 2019;16:389-406.

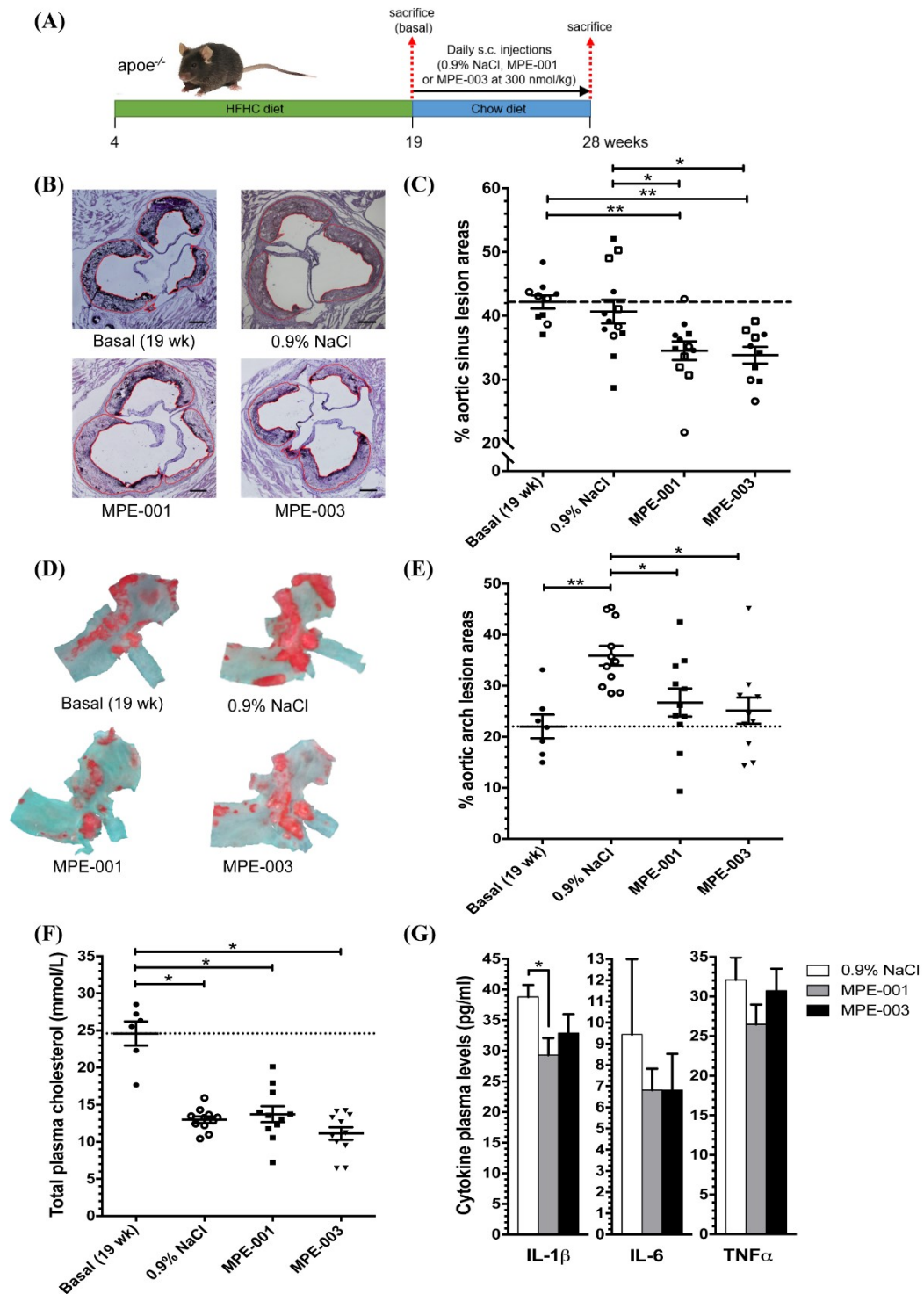
- [19] Feig, JE, Regression of atherosclerosis: insights from animal and clinical studies, *Ann Glob Health*, 2014;80:13-23.
- [20] Fisher, EA, Regression of Atherosclerosis: The Journey From the Liver to the Plaque and Back, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016;36:226-235.
- [21] Schrijvers, DM, De Meyer, GR, Kockx, MM, et al., Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005;25:1256-1261.
- [22] Thorp, E, Cui, D, Schrijvers, DM, et al., Mertk receptor mutation reduces efferocytosis efficiency and promotes apoptotic cell accumulation and plaque necrosis in atherosclerotic lesions of apoe<sup>-/-</sup> mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008;28:1421-1428.
- [23] Korns, D, Frasch, SC, Fernandez-Boyanapalli, R, et al., Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation, *Front Immunol*, 2011;2:57.
- [24] Turcotte, S, Mellal, K, Chingle, R, et al., Azasulfurylpeptide Modulation of CD36-Mediated Inflammation Without Effect on Neovascularization, *Biomedicines*, 2018;6.
- [25] Doan, ND, Zhang, J, Traore, M, et al., Solid-phase synthesis of C-terminal azapeptides, *J Pept Sci*, 2015;21:387-391.
- [26] Zhang, J, Proulx, C, Tomberg, A, et al., Multicomponent diversity-oriented synthesis of aza-lysine-peptide mimics, *Org Lett*, 2014;16:298-301.
- [27] Ray, BK, Shakya, A, Turk, JR, et al., Induction of the MMP-14 gene in macrophages of the atherosclerotic plaque: role of SAF-1 in the induction process, *Circ Res*, 2004;95:1082-1090.
- [28] Mellal, K, Omri, S, Mulumba, M, et al., Immunometabolic modulation of retinal inflammation by CD36 ligand, *Sci Rep*, 2019;9:12903.
- [29] Febbraio, M, Podrez, EA, Smith, JD, et al., Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice, *J Clin Invest*, 2000;105:1049-1056.

- [30] Baranova, IN, Kurlander, R, Bocharov, AV, et al., Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling, *J Immunol*, 2008;181:7147-7156.
- [31] Parks, BW, Black, LL, Zimmerman, KA, et al., CD36, but not G2A, modulates efferocytosis, inflammation, and fibrosis following bleomycin-induced lung injury, *J Lipid Res*, 2013;54:1114-1123.
- [32] Harb, D, Bujold, K, Febbraio, M, et al., The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation, *Cardiovasc Res*, 2009;83:42-51.
- [33] Proulx, C, Sabatino, D, Hopewell, R, et al., Azapeptides and their therapeutic potential, *Future Med Chem*, 2011;3:1139-1164.
- [34] Chingle, R, Proulx, C and Lubell, WD, Azapeptide Synthesis Methods for Expanding Side-Chain Diversity for Biomedical Applications, *Acc Chem Res*, 2017;50:1541-1556.
- [35] Huynh, DN, Bessi, VL, Menard, L, et al., Adiponectin has a pivotal role in the cardioprotective effect of CP-3(iv), a selective CD36 azapeptide ligand, after transient coronary artery occlusion in mice, *FASEB J*, 2018;32:807-818.
- [36] Bessi, VL, Labbe, SM, Huynh, DN, et al., EP 80317, a selective CD36 ligand, shows cardioprotective effects against post-ischaemic myocardial damage in mice, *Cardiovasc Res*, 2012;96:99-108.
- [37] Raffai, RL, Loeb, SM and Weisgraber, KH, Apolipoprotein E promotes the regression of atherosclerosis independently of lowering plasma cholesterol levels, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005;25:436-441.

- [38] Posthuma, JJ, Posma, JJN, van Oerle, R, et al., Targeting Coagulation Factor Xa Promotes Regression of Advanced Atherosclerosis in Apolipoprotein-E Deficient Mice, *Sci Rep*, 2019;9:3909.
- [39] Aday, AW and Ridker, PM, Antiinflammatory Therapy in Clinical Care: The CANTOS Trial and Beyond, *Front Cardiovasc Med*, 2018;5:62.
- [40] Rahman, K and Fisher, EA, Insights From Pre-Clinical and Clinical Studies on the Role of Innate Inflammation in Atherosclerosis Regression, *Front Cardiovasc Med*, 2018;5:32.
- [41] Stoger, JL, Gijbels, MJ, van der Velden, S, et al., Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis, *Atherosclerosis*, 2012;225:461-468.
- [42] Bouhrel, MA, Derudas, B, Rigamonti, E, et al., PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties, *Cell Metab*, 2007;6:137-143.
- [43] Moore, KJ and Tabas, I, Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis, *Cell*, 2011;145:341-355.
- [44] Bensinger, SJ, Bradley, MN, Joseph, SB, et al., LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response, *Cell*, 2008;134:97-111.
- [45] Vats, D, Mukundan, L, Odegaard, JI, et al., Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation, *Cell Metab*, 2006;4:13-24.
- [46] Wang, F, Zhang, S, Vuckovic, I, et al., Glycolytic Stimulation Is Not a Requirement for M2 Macrophage Differentiation, *Cell Metab*, 2018;28:463-475 e464.
- [47] Rahman, K, Vengrenyuk, Y, Ramsey, SA, et al., Inflammatory Ly6Chi monocytes and their conversion to M2 macrophages drive atherosclerosis regression, *J Clin Invest*, 2017;127:2904-2915.

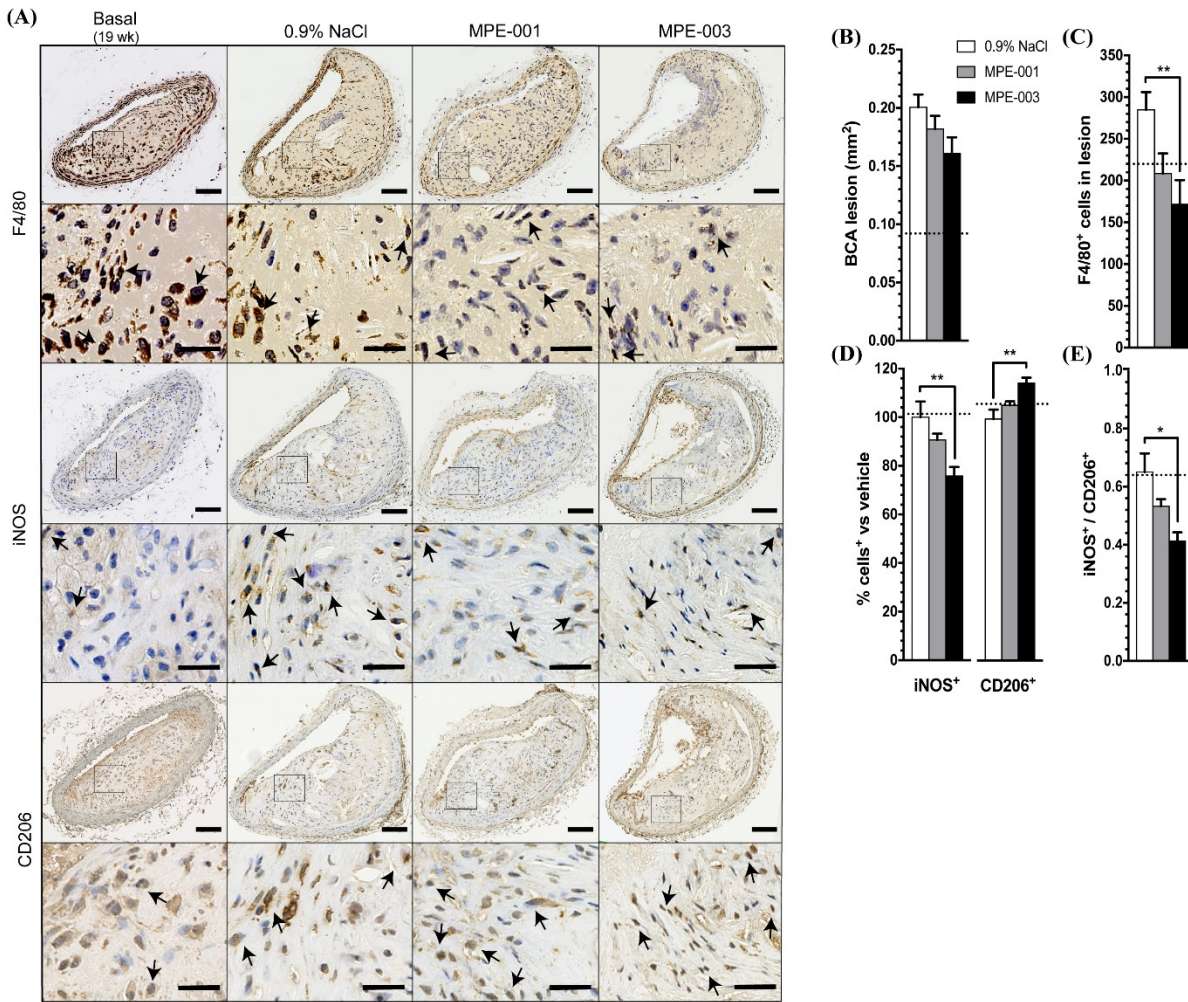
- [48] Ramji, DP and Davies, TS, Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets, *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015;26:673-685.
- [49] Yadav, A, Saini, V and Arora, S, MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review, *Clin Chim Acta*, 2010;411:1570-1579.
- [50] Koenig, W, High-sensitivity C-reactive protein and atherosclerotic disease: from improved risk prediction to risk-guided therapy, *Int J Cardiol*, 2013;168:5126-5134.

## Figures



**Figure 1:** Azapeptides MPE-001 and MPE-003 induced regression of atherosclerotic lesions in *apoe*<sup>-/-</sup> mice. **(A)** Study design. **(B)** Representative photomicrographs of Oil red-O/hematoxylin-

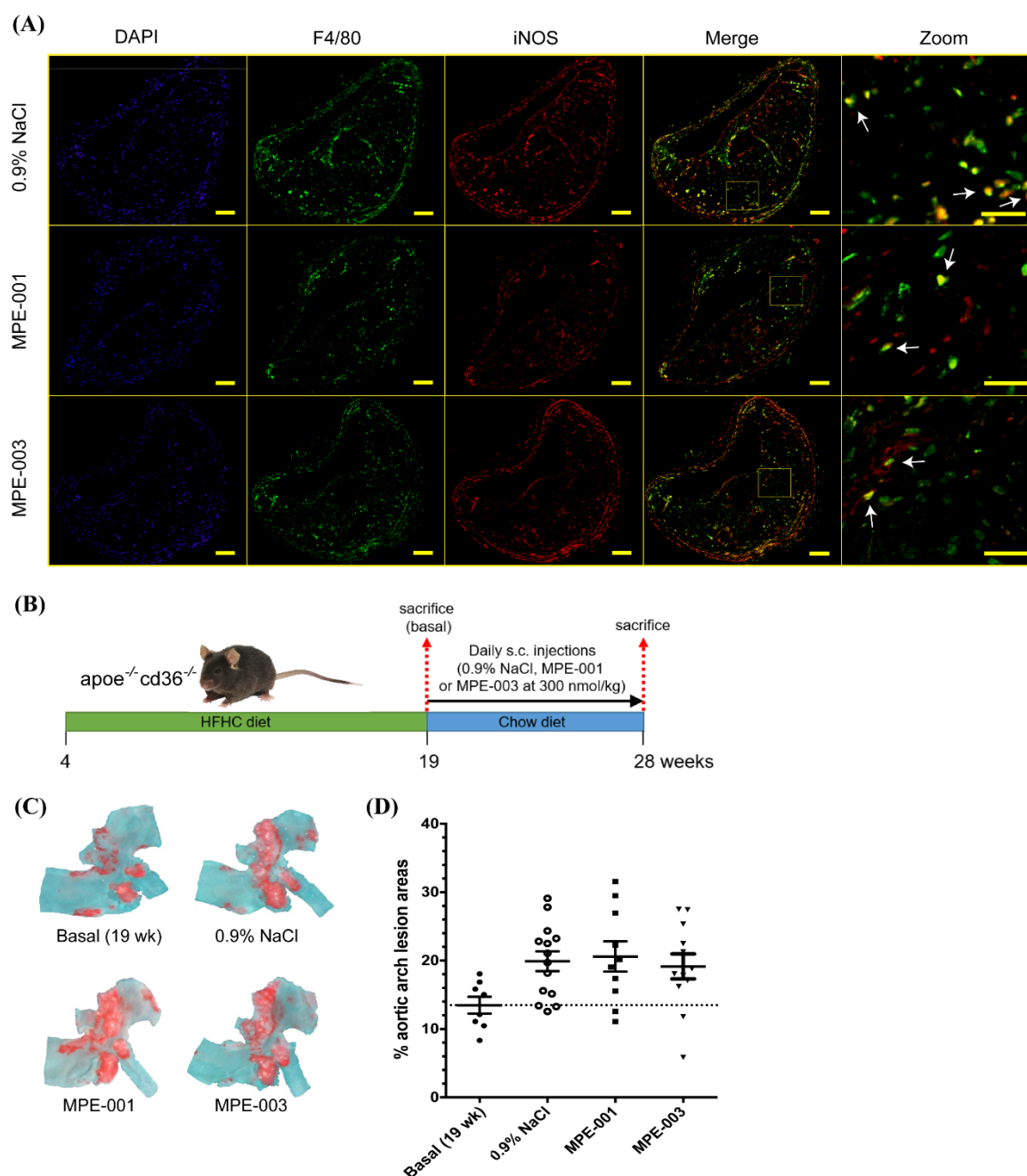
eosin-stained aortic sinuses (scale bar: 200  $\mu\text{m}$ ). **(C)** Percentage aortic sinus lesion areas expressed as dot plots and mean  $\pm$  SEM (n=4 per group, 2-4 sections per mice). Each symbol denotes the sections from a single mouse. **(D)** Representative photomicrographs of aortic arches stained *en face* with Oil red-O. **(E)** Dot plots and mean  $\pm$  SEM of percentage aortic arch lesion areas (n = 6, week 19 and n = 11, mice per group). **(F)** Dot plots and mean  $\pm$  SEM of total plasma cholesterol levels (n = 11 per group). Dotted line represents the mean basal value. **(G)** Mean  $\pm$  SEM of IL-1 $\beta$  (n = 10-11), IL-6 (n = 5-7) and TNF $\alpha$  (n = 11) plasma levels at sacrifice. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison *post hoc* test for all figures except (C) aortic sinus lesion areas (nested one-way ANOVA followed by Tukey); \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



**Figure 2:** Azapeptides reduced the ratio of pro-inflammatory to anti-inflammatory macrophages in 28-week-old mice fed a HFHC diet until 19 weeks of age and then switched to chow. **(A)** Representative serial cross-sections of immunostained BCA sections at weeks 19 and 28, for F4/80, iNOS and CD206 antibodies at 10X magnification (scale bar: 100  $\mu$ m). Enlarged areas (100X) are displayed from the inset (scale bar: 100  $\mu$ m). **(B)** BCA lesion areas. **(C)** Absolute F4/80<sup>+</sup> cell counts in BCA lesion areas. **(D)** Relative percentage of iNOS<sup>+</sup> and CD206<sup>+</sup> stained cells versus 0.9% vehicle. **(E)** Ratio of iNOS to CD206 positive cells in BCA lesions. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of 4 (0.9% NaCl), 5 (MPE-001) and 4 (MPE-003) mice, n = 2-4 sections per mice. Dotted

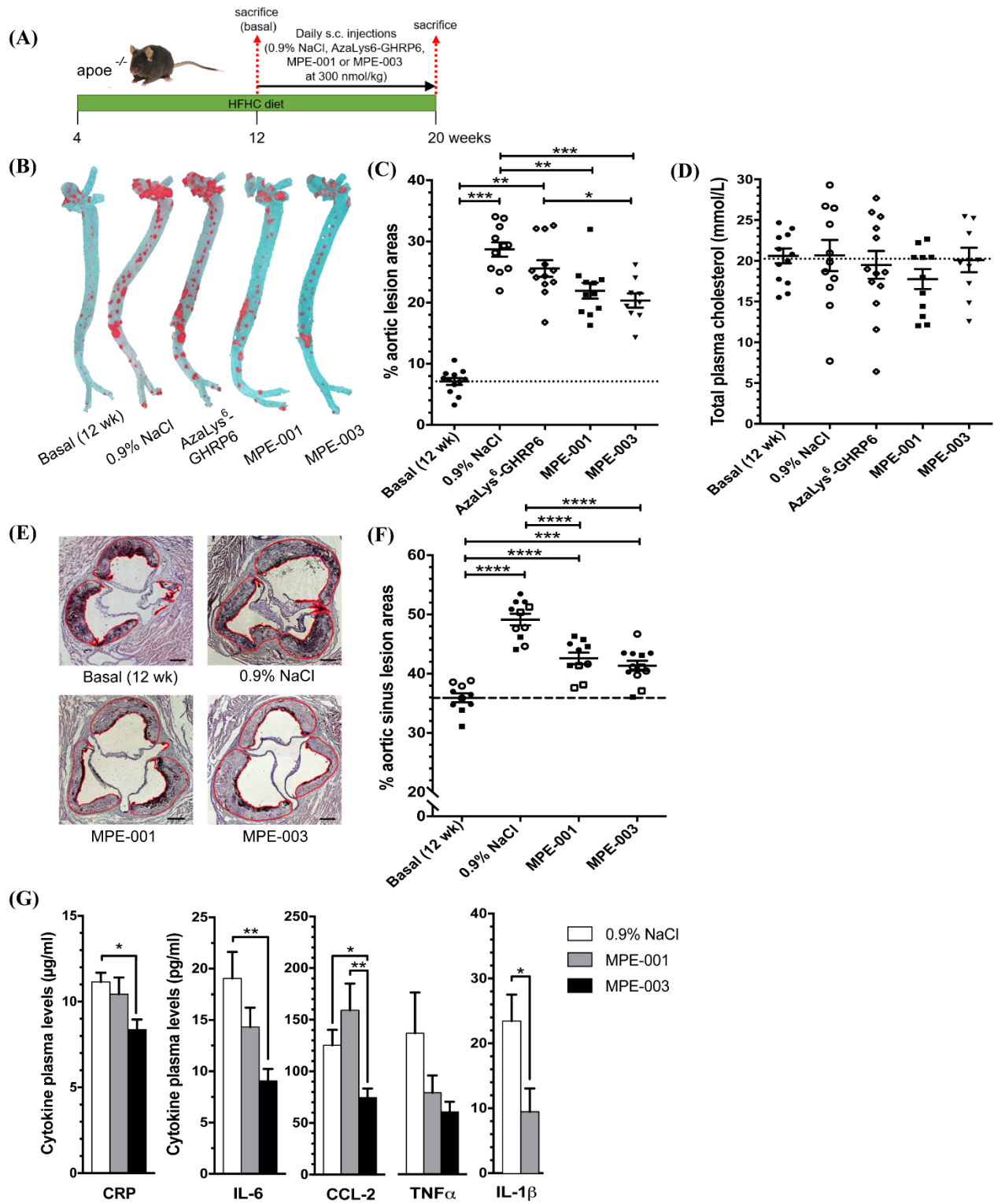


line represents the mean basal value. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , nested one-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison *post hoc* test.



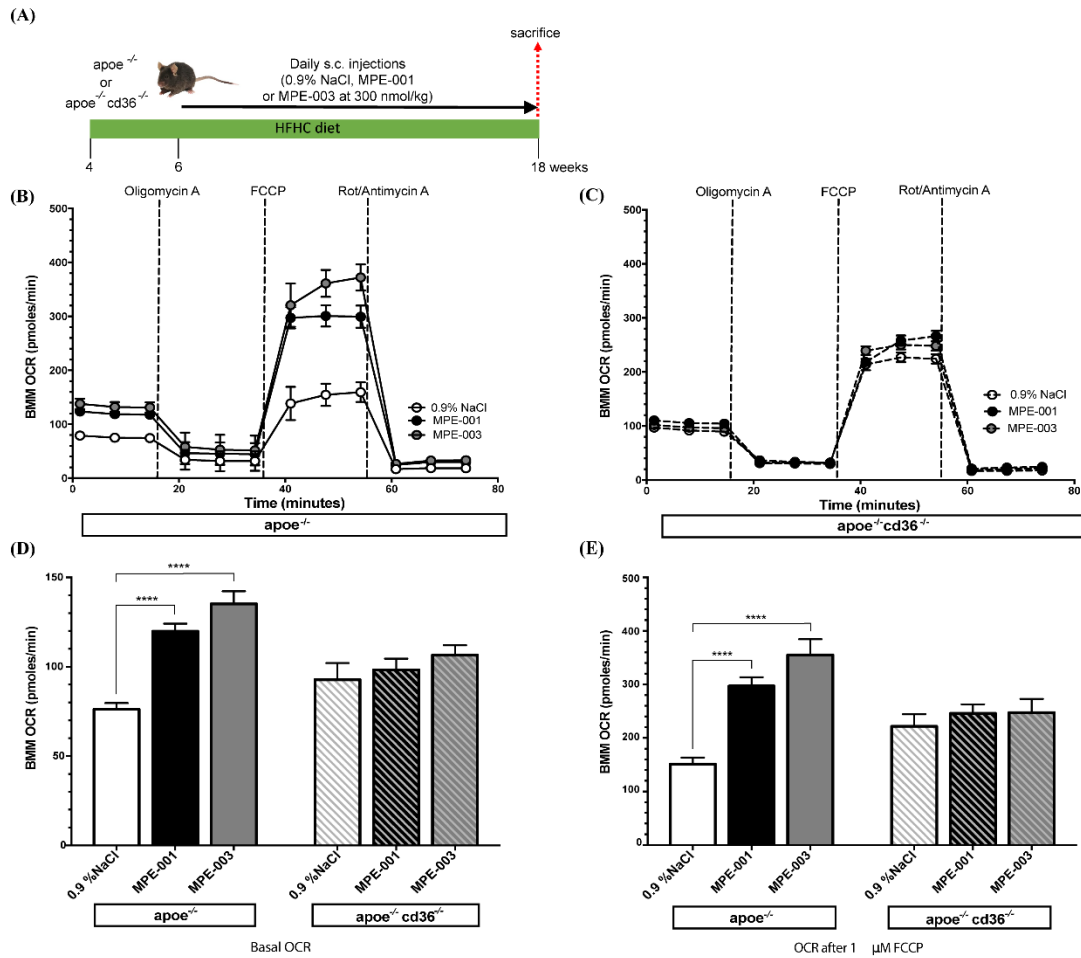
**Figure 3:** Double immunofluorescence staining of macrophages in BCA lesions of *apoe*<sup>-/-</sup> mice showed the colocalization of F4/80 and iNOS. **(A)** Representative staining of macrophages showing F4/80 (green), iNOS (red) and their colocalization (yellow) in BCA sections at 10X magnification (scale bar: 100  $\mu$ m). Enlarged areas of the merging (100X) is displayed from the

inset (scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ). **(B)** Study design for *apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup> mice. **(C)** Representative *en face* Oil red-O-stained aortic arches from *apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup>. **(D)** Dot plots and mean  $\pm$  SEM of aortic arch lesion areas. Dotted line represents the mean basal value. One-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison *post hoc* test.



**Figure 4:** MPE-001 and MPE-003 reduced the progression of atherosclerotic lesions in *apoe*<sup>-/-</sup> mice. **(A)** Study design. **(B)** Representative photomicrographs of aortas stained with Oil red-O. **(C)**

Dot plots and mean  $\pm$  SEM of aorta lesion areas of 11 (0.9% NaCl, MPE-001), 9 (MPE-003) and 13 ([aza-Lys<sup>6</sup>]-GHRP-6) 20-week-old mice. **(D)** Total plasma cholesterol expressed as dot plots. **(E)** Representative photomicrographs of aortic sinuses after staining with Oil red-O and hematoxylin-eosin (scale bar: 200  $\mu$ m). **(F)** Percentage aortic sinus lesion areas showed as dot plots of 4 mice per group, 2-4 cross-sections per mice. Each symbol denotes the sections from a single mouse. Dotted line represents the mean basal value. **(G)** Plasma levels of CRP (n = 11), IL-6 (n = 10-11), CCL-2 (n = 11), TNF $\alpha$  (n = 10-11) and IL-1 $\beta$  (n = 9-11) at week 20. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , one-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison *post hoc* test for all figures except (F) aortic sinus lesion areas (nested one-way ANOVA followed by Tukey) and (G) IL-1 $\beta$  (unpaired t-test).



**Figure 5:** MPE-001 and MPE-003 increased oxygen consumption rate of BMM from azapeptide-treated-mice. **(A)** Experimental protocol of the study. **(B, C)** Time-course of OCR in BMMs of *apoe*<sup>-/-</sup> and *apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup> mice, respectively. Data are representative of 3 independent experiments. **(D, E)** Bar graphs of basal and maximal (FCCP) OCR in BMM from *apoe*<sup>-/-</sup> and *apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup> mice. Each independent experiment was performed with four replicates per treatment. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , Kruskal-Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparisons test.

## **Appendix A. Supplemental materials**

### **Ethics statement**

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Ethics Committee, and performed according to the Canadian Council on Animal Care and US National Institute of Health guidelines for the care and use of laboratory animals.

### **Animals**

*Cd36/apoe* double KO mice were bred by crossing *cd36*-KO mice to *apoe*-KO mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). The resulting *cd36/apoe* double KO and littermate derived *apoe*-KO mice were of 98.44% C57Bl/6j background (6x backcrossed). Mice were housed under standard conditions, with food and water *ad libitum*. Male mice were used in all experiments.

### **Morphometric analysis of aortic lesions**

Atherosclerosis was quantified by *en face* analysis of oil red-O-stained aorta as described previously [1]. The extent of atherosclerotic lesions was expressed as the percentage of aortic stained lesion areas relative to the total aorta area by two blinded investigators.

For determination of aortic sinus lesion areas, frozen hearts kept in Optimal Cutting Temperature (OCT) compound (VRW International, Radnor, PA, USA) were provided to the Histology Core Facility (Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal) and sectioned parallel to the atria. Sequential 8 µm transverse sections, starting from the three valve cusps of the aortic sinus, were cut with a cryostat microtome and placed on a microscope slide before removing OCT with 70% ethanol [2]. Sections were then stained with oil red-O and counterstained with hematoxylin-eosin (Gill Hematoxylin and Intensified Eosin Y, Thermo Fisher

Scientific, Mississauga, ON, Canada) for plaque area measurement. Up to four sections from each specimen were assessed at 80  $\mu\text{m}$  intervals. The magnitude of atherosclerosis development was determined as a percentage of the total aortic sinus areas occupied by lesion. The images were digitized by a camera coupled to a light microscopy and analyzed using Adobe Photoshop CS3 software (Adobe Systems Incorporated, San José, CA, USA) by two blinded investigators, with 4 mice per group and 2-4 sections per mice.

### **Necrosis assessment in aortic sinus lesions**

Necrotic core areas in lesions were measured in hematoxylin-eosin (Thermo Fisher Scientific) stained transverse sections of aortic sinuses. Images were acquired using a 20X objective with the digital scanner Nanozoomer 2.0 HT and NDP.view 2 software (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Shizuoka, Japan), then analyzed using Adobe Photoshop CS3 software (Adobe Systems Incorporated) by one blind user. Results were expressed as percentage of acellular areas in hematoxylin-eosin stained lesions relative to the total lesion surface.

### **Cholesterol and triglyceride assays**

Total plasma cholesterol and triglycerides were assayed using the Infinity<sup>TM</sup> Total Cholesterol Reagent/Triglycerides Reagent and calibrator (Thermo Fisher Scientific).

### **Cytokine assay by ELISAs**

Concentrations of cytokines and inflammatory biomarkers, including interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), c-reactive protein (CRP), chemokine C-C motif ligand 2 (CCL-2) and tumoral necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) were assayed by ELISA in peritoneal cell supernatants or plasma using the mouse ELISA Ready-Set-Go!<sup>TM</sup> kits (eBiosciences, San Diego, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions.



## **Immunohistochemistry (IHC) studies**

For classical IHC analysis of the brachiocephalic artery (BCA) at the Histology Core Facility (IRIC, Université de Montréal), formalin-fixed vessels were embedded in paraffin and cross-sections of 4 µm were cut along the length of the specimen and up to four sections from each specimen were assessed at 40 µm intervals. The sections were deparaffinized using Bond™ Dewax Solution (Leica Biosystems, Concord, ON, Canada) and antigen recovery [3, 4] was performed. For mannose receptor c-type 1 (CD206, MRC1), chitinase-like 3 (YM1, Chil3) and nitric oxide synthase 2 (iNOS, NOS2)[5], heat-induced epitope retrieval (HIER) with Bond™ Epitope Retrieval Solution 1 (Leica Biosystems) was applied for 20 mins. For EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 (F4/80, EMR1) [6, 7], the antigen was retrieved using proteolytic enzyme induced epitope retrieval (PIER) (Bond™ Enzyme Pretreatment Kit, Leica Biosystems) for 10 mins. Sections were then incubated with diluted primary antibody against CD206 (goat polyclonal IgG, 1:50 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)), YM1 (rabbit polyclonal IgG, 1:100 (Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada)), iNOS (rabbit polyclonal IgG, Cl: K13-A, 1:2000 (Novus Biological, Centennial, CO, USA)) or F4/80 (rat monoclonal antibody, Cl: A3-1, 1:50 (Bio-Rad AbD Serotec, Hercules, CA, USA)) for 30 mins. Detection of specific signal was acquired by using Bond™ Polymer DAB Refine kit (Leica Biosystems) for iNOS and Bond™ Intense R Detection System (Leica Biosystems) for CD206, YM1 and F4/80, with corresponding diluted secondary Biotin-conjugated antibody (1:100 – Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Using the same final concentration as specific antibodies, isotype controls for nonspecific binding were performed for F4/80 (rat monoclonal IgG2B, R&D Systems), CD206 (goat polyclonal IgG, Novus Biological) and iNOS (rabbit polyclonal IgG, Novus Biological). Immunostained sections were counterstained with hematoxylin

and images were acquired using a 20X objective with the digital scanner Nanozoomer 2.0 HT and NDP.view 2 software (Hamamatsu Photonics). The results are expressed as total F4/80 positive cells in atherosclerotic lesions. The relative percentage of iNOS<sup>+</sup> or CD206<sup>+</sup> cell numbers (versus sum of iNOS<sup>+</sup> and CD206<sup>+</sup>) was determined. Cell counts were performed both manually and with software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Collagen was assessed in BCA cross-sections using Lillie's trichrome staining and the results expressed as the percentage of the total lesion surface areas. All analyses were performed by two blinded investigators, with 4-5 mice per group and 3-4 sections per mice.

### **Immunofluorescence (IF) studies**

Immunofluorescence (IF) staining was performed on formalin-fixed paraffin-embedded BCA cross-sections by the Histology Core Facility (IRIC, Université de Montréal). Following dewaxing and antigen retrieval using PIER, diluted primary antibody against F4/80 or iNOS (as mentioned above) was applied for 1 h at room temperature. A cocktail of corresponding diluted Alexa Fluor®-conjugated secondary antibody to detect F4/80 (AF488 *goat anti-rat* IgG, 1:200, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) or iNOS (AF594 *goat anti-rabbit*, 1:200, Invitrogen) epitope was applied on each section for 30 mins at room temperature. Slides were counterstained with ProLong™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen) with DAPI and coverslipped manually. High-resolution images were acquired manually using a DP71 digital camera mounted on a BX61 motorized upright microscope with fluorescence filters (FITC/TXRED/DAPI) from Olympus (Waltham, MA, USA).

## RT-qPCR analysis

Total mRNA was extracted from abdominal aorta in Ribozol™ RNA Extraction Reagent (VWR International, Radnor, PA, USA) using PureLink™ RNA Micro Kit (Invitrogen). Reverse transcription to cDNA was then performed in a total volume of 20 µL with oligo(dT) primers using SuperScript II™ Reverse Transcriptase (Invitrogen) at 37°C for 75 mins followed by 10 mins at 95°C. The samples were diluted 1:10 in DEPC-treated water and kept at -80°C until use. Real-time qPCR amplification was carried out in a volume of 20 µL with 2 µL of reverse transcription reaction, 20 µM of each specific primer and Ssofast™ EvaGreen® Supermix (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). The cycling protocol consisted of 40 cycles of 95°C for 30 seconds, then 20 seconds at 60°C.

The mRNA levels were normalized to the housekeeping gene  $\beta$ -actin and relative gene expression was determined using the comparative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method.

The murine primer sequences are as follows:

$\beta$ -actin

sense primer 5' - CAGCAAGCAGGAGTACGATGA - 3'

antisense primer 5' - GAAAGGGTGTAACGCAGCTC - 3' (93 bp);

Adgre1

sense primer 5' - GCAAGGAGAATGAGTCCATTAAC - 3'

antisense primer 5' - TGAGACAAAAGCCACTCCTG - 3' (71 bp);

CD68

sense primer 5' - AGGACCGCTTATAGCCCAAGGAACA - 3'

antisense primer 5' - TCGTAGGGCTGGCTGTGCTTTC - 3' (116 bp);

ABCa1

sense primer 5' – CTGACGGGAAGAGAGCATGT – 3'

antisense primer 5' – TTTGTTGCCGCCACTGTAGT – 3' (150 bp);

Mmp14

sense primer 5' - GCCCTCTGTCCCAGATAAGCCCAA - 3'

antisense primer 5' - CCAGAACCATCGCTCCTTGAAGACAA - 3' (121 bp);

Mmp2

sense primer 5' – TGGTCGCAGTGATGGCTTCCTCT – 3'

antisense primer 5' - GGTAACAAGGCTTCATGGGGGCA – 3' (94 bp);

Casp1

sense primer 5' - ACAGCTCTGGAGATGGTGAAAGAGGT – 3'

antisense primer 5' – GTGGTCCCACATATTCCTCCTGGAT – 3' (122 bp).

### **Purification of bone marrow-derived monocytes (BMMs) and oxygen consumption rate (OCR) assays**

Bone marrow-derived monocytes (BMMs) were isolated from 18-week-old *apoe*<sup>-/-</sup> and *apoe*<sup>-/-</sup>*cd36*<sup>-/-</sup> mice fed a HFHC diet (D12108, Research Diets) and injected daily with a s.c. injection of vehicle (0.9% NaCl) or 300 nmol/kg azapeptide (MPE-001 or MPE-003) from 6-18 weeks of age.

Monocytes were purified from bone marrow using a negative selection monocytes isolation kit (Stem Cell, Vancouver, British Columbia, Canada), plated for 2 h in Seahorse XF media DMEM (Seahorse Bioscience North Billerica, Billerica, MA, USA), followed by real-time analysis of OCR with a 96 XFe Seahorse (Seahorse Bioscience North Billerica). Three or more consecutive measurements were obtained under basal conditions and after the sequential additions of 1  $\mu$ M

oligomycin (inhibitor of mitochondrial ATP synthase), 1  $\mu$ M FCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone), a protonophore that uncouples ATP synthesis from oxygen consumption by the electron-transport chain and 1  $\mu$ M rotenone/antimycin A (inhibitors of the electron transport chain).

### **Peritoneal macrophage purification and stimulation**

After euthanasia by exsanguination under isoflurane, the peritoneal cavity of 12-week-old male mice were washed using 10 mL DMEM cell-culture medium. The cell suspension was purified for resident macrophages by depletion of non-target cells using the Monocyte Isolation Kit (Miltenyi, Auburn, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The purity of macrophages was assessed using APC/Cy7 anti-mouse F4/80 (Biolegend, San Diego, CA, USA) marker and PerCP/Cy5.5 anti-mouse CD80 (Biolegend) by flow cytometry. Purified peritoneal macrophages ( $2.5 \times 10^5$ ) from *cd36<sup>+/+</sup>* and *cd36<sup>-/-</sup>* mice were seeded on 48-well plates in DMEM containing 10% FBS and 20 ng/mL interferon  $\gamma$  at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>-enriched atmosphere. After 48 h, the cells were washed twice with PBS and incubated with DMEM containing 0.2% BSA for 2 h prior to stimulation. Peritoneal macrophages were incubated with azapeptides MPE-001 and MPE-003 at  $10^{-7}$  M or vehicle, and concomitantly stimulated with 300 ng/mL R-FSL1 (a TLR2/6 selective agonist) for 4 h before collecting supernatants for cytokine assay by ELISA.

### **Statistical analysis**

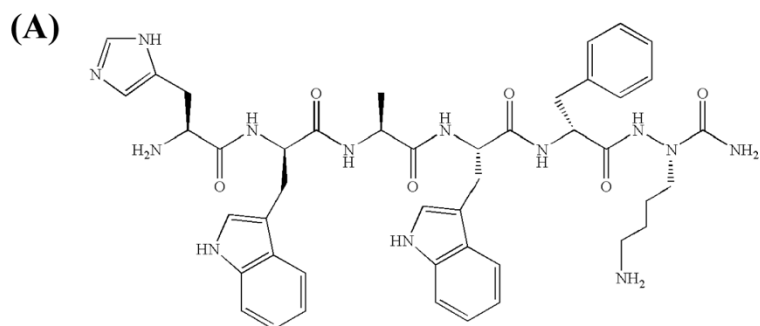
All data are presented as mean  $\pm$  SEM. Comparisons between independent groups on normally distributed data were performed using one-way ANOVA followed by pairwise multiple comparisons using the Tukey method. Nested one-way ANOVA followed by Tukey was used for serial cross-sections of aortic sinus and BCA. Nonparametric analysis using the Kruskal Wallis test

followed by Dunn's *post hoc* was used on non-normal distributed data. (GraphPad Prism v.8.4.2. San Diego, CA, USA), as indicated. *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

### Supplemental references

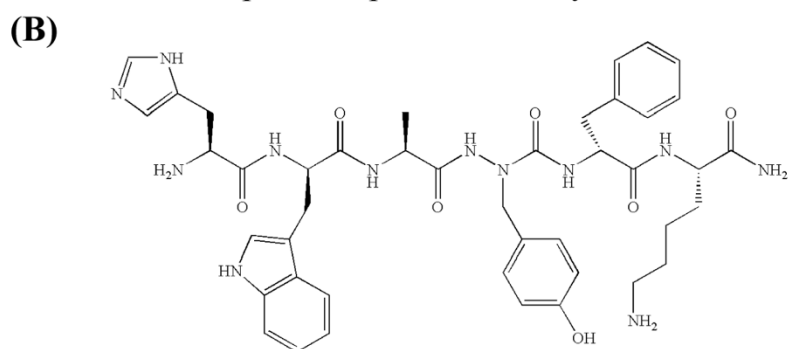
- [1] Febbraio, M, Podrez, EA, Smith, JD, et al., Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice, *J Clin Invest*, 2000;105:1049-1056.
- [2] Venegas-Pino, DE, Banko, N, Khan, MI, et al., Quantitative analysis and characterization of atherosclerotic lesions in the murine aortic sinus, *J Vis Exp*, 2013:50933.
- [3] Shi, SR, Shi, Y and Taylor, CR, Antigen retrieval immunohistochemistry: review and future prospects in research and diagnosis over two decades, *J Histochem Cytochem*, 2011;59:13-32.
- [4] Pileri, SA, Roncador, G, Ceccarelli, C, et al., Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods, *J Pathol*, 1997;183:116-123.
- [5] Jablonski, KA, Amici, SA, Webb, LM, et al., Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages, *PLoS One*, 2015;10:e0145342.
- [6] Hume, DA, Perry, VH and Gordon, S, The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localisation of antigen F4/80: macrophages associated with epithelia, *Anat Rec*, 1984;210:503-512.
- [7] Waddell, LA, Lefevre, L, Bush, SJ, et al., ADGRE1 (EMR1, F4/80) Is a Rapidly-Evolving Gene Expressed in Mammalian Monocyte-Macrophages, *Front Immunol*, 2018;9:2246.

## Supplemental figures and legends



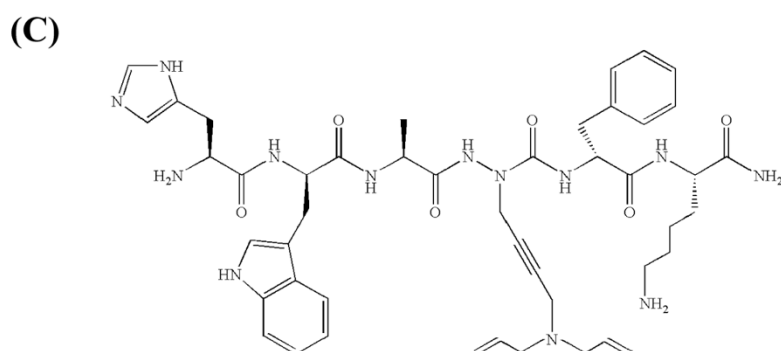
### [aza-Lys<sup>6</sup>]-GHRP-6

His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-azaLys-NH<sub>2</sub>



### MPE-001

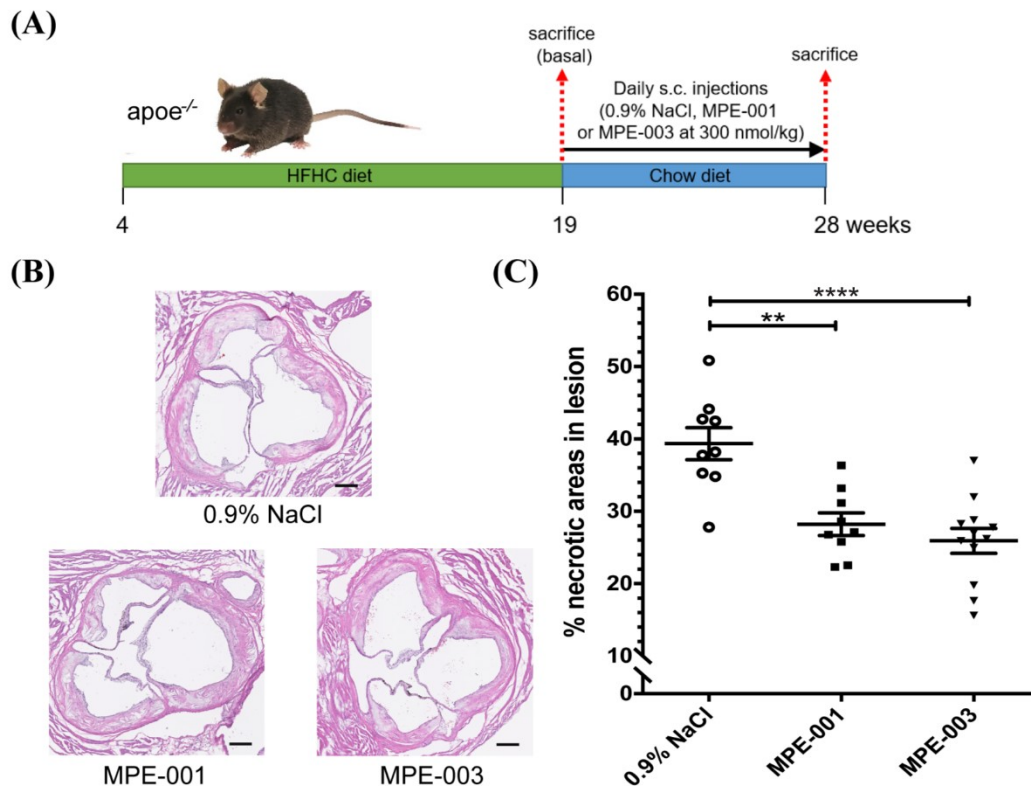
His-D-Trp-Ala-azaTyr-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>



### MPE-003

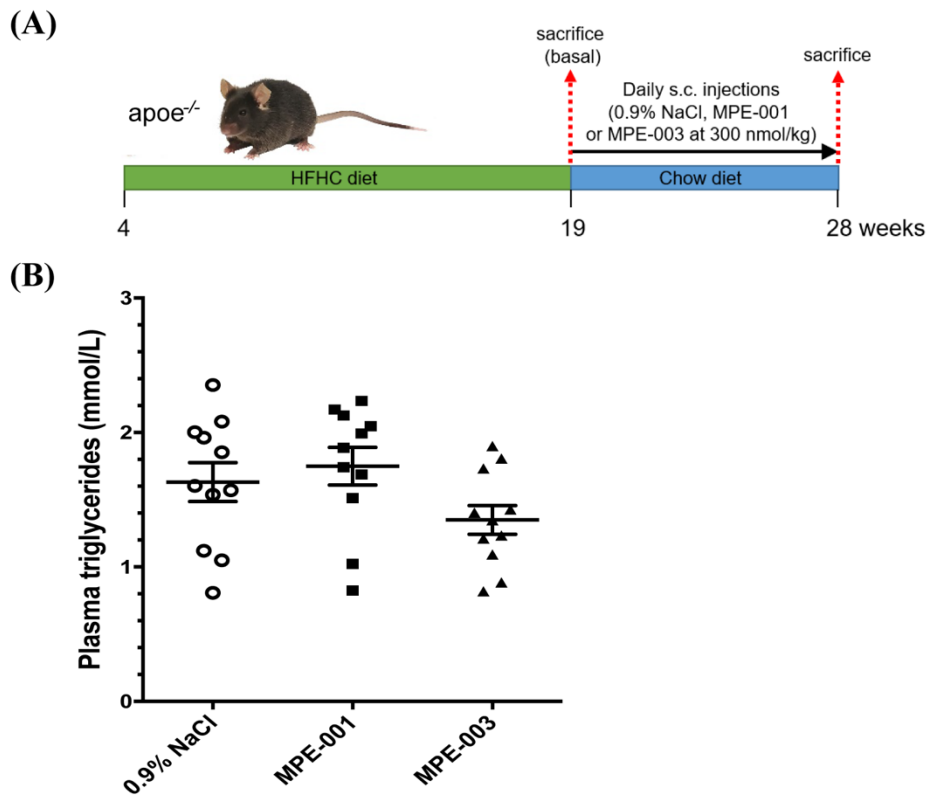
His-D-Trp-Ala-[aza-(N,N-diallylaminobut-2-ynyl)Gly<sup>4</sup>]-D-Phe-Lys-NH<sub>2</sub>

**Supplemental Figure 1:** Chemical structures of azapeptide analogues of GHRP-6; (A) [aza-Lys<sup>6</sup>]-GHRP-6, (B) MPE-001 and (C) MPE-003.



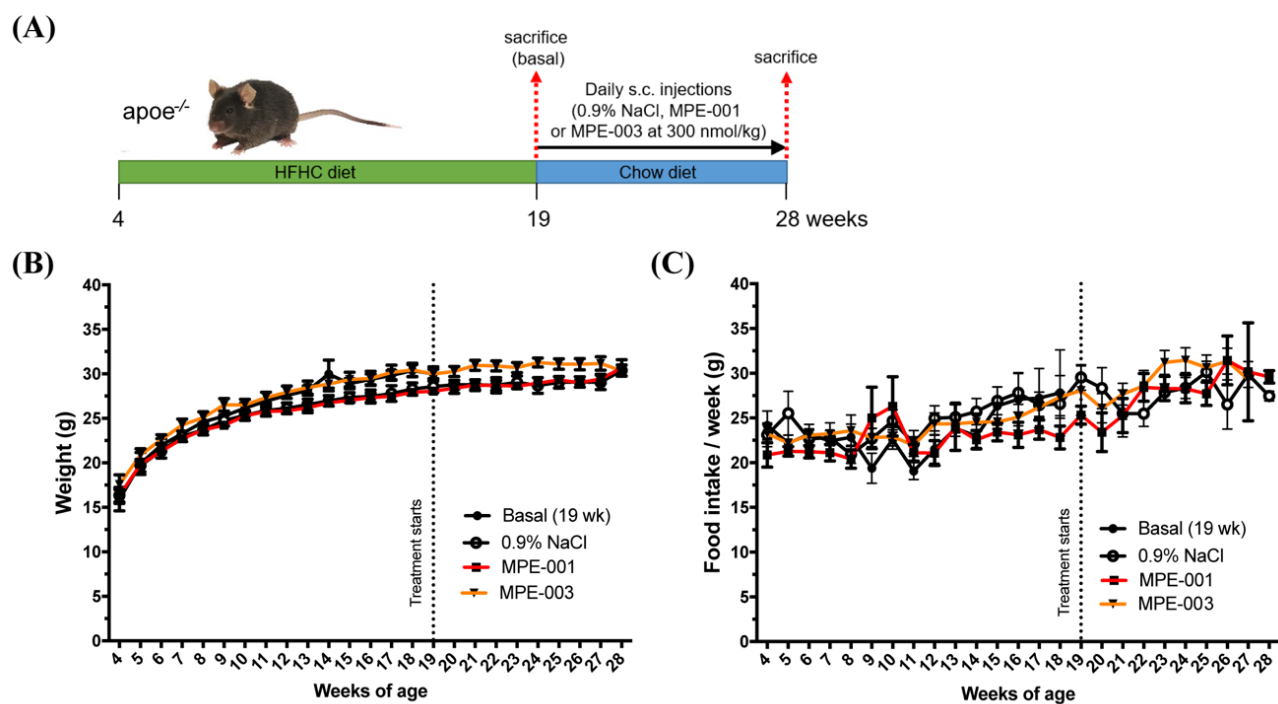
**Supplemental Figure 2:** Treatment with azapeptides reduced necrotic areas of aortic sinus lesions after switching from HFHC to chow diet. **(A)** Study design. **(B)** Representative photomicrographs of aortic sinuses stained with hematoxylin-eosin from 28-week-old *apoE*<sup>-/-</sup> mice (scale bar: 200 μm). **(C)** Necrotic areas expressed as percentage of sinus lesion areas. Results are shown as dot plots and mean ± SEM 2-4 cross-sections per mice (n = 3-4 per group). \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , nested one-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison *post hoc* test.





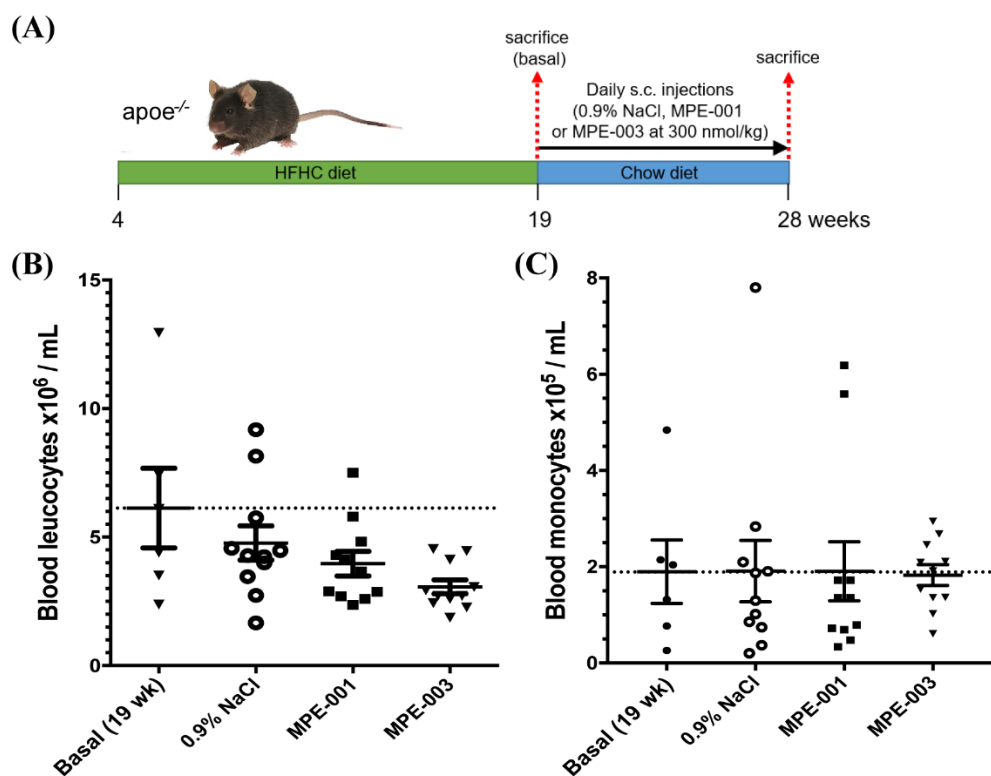
**Supplemental Figure 3:** Azapeptides did not significantly modulate plasma triglyceride levels.

(A) Study design. (B) Plasma triglyceride levels of *apoe*<sup>-/-</sup> mice at 28 weeks of age. Results are shown as dot plots and mean  $\pm$  SEM (n = 11 mice per group).

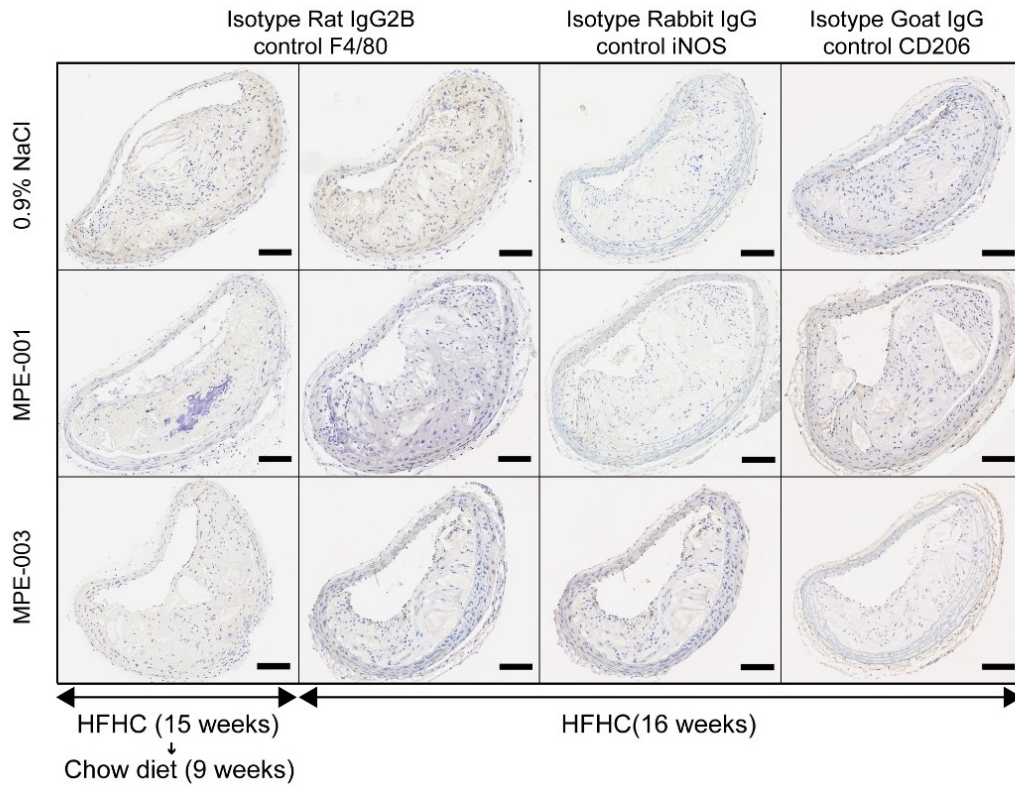


**Supplemental Figure 4:** Azapeptides did not modulate body weight gain and weekly food intake.

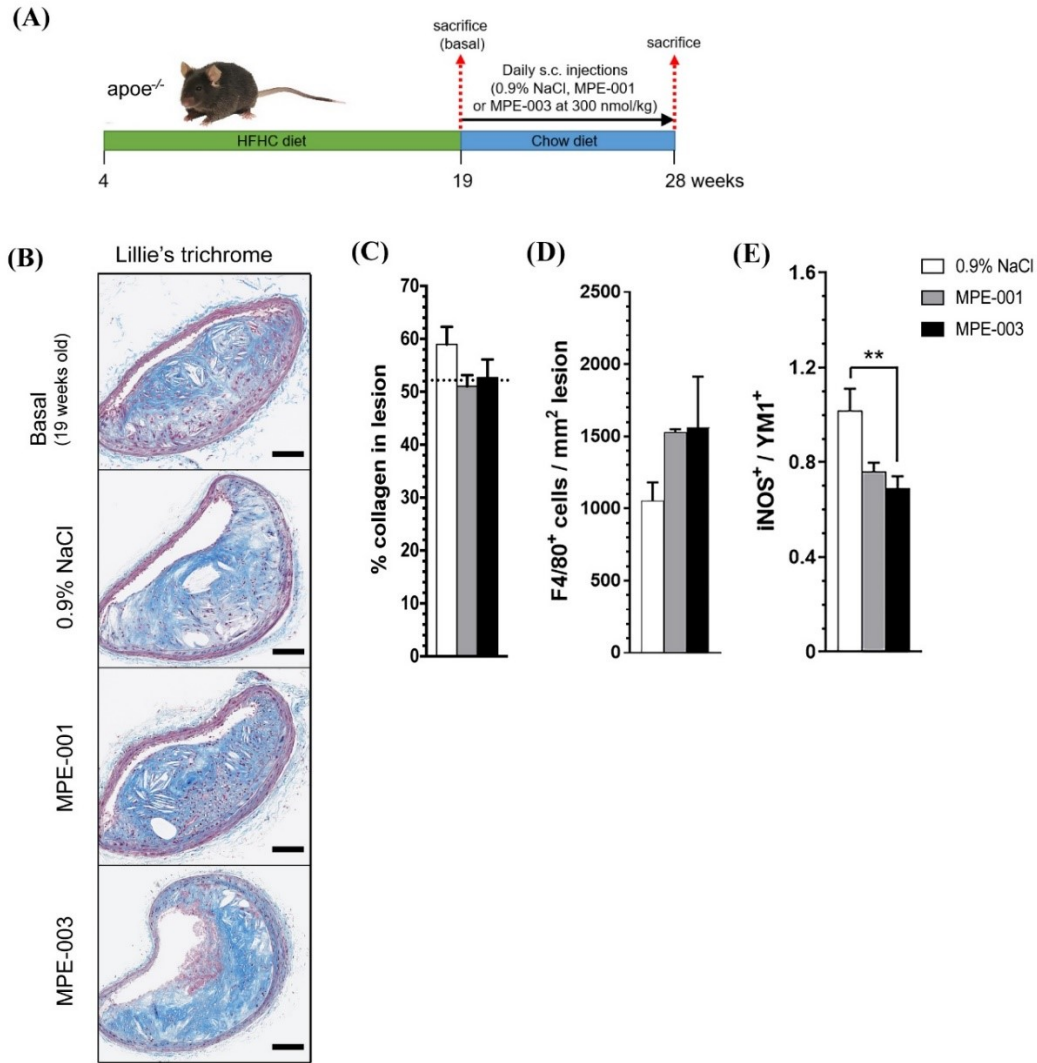
**(A)** Study design. **(B)** Weekly body weight gain and **(C)** weekly food intake. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.



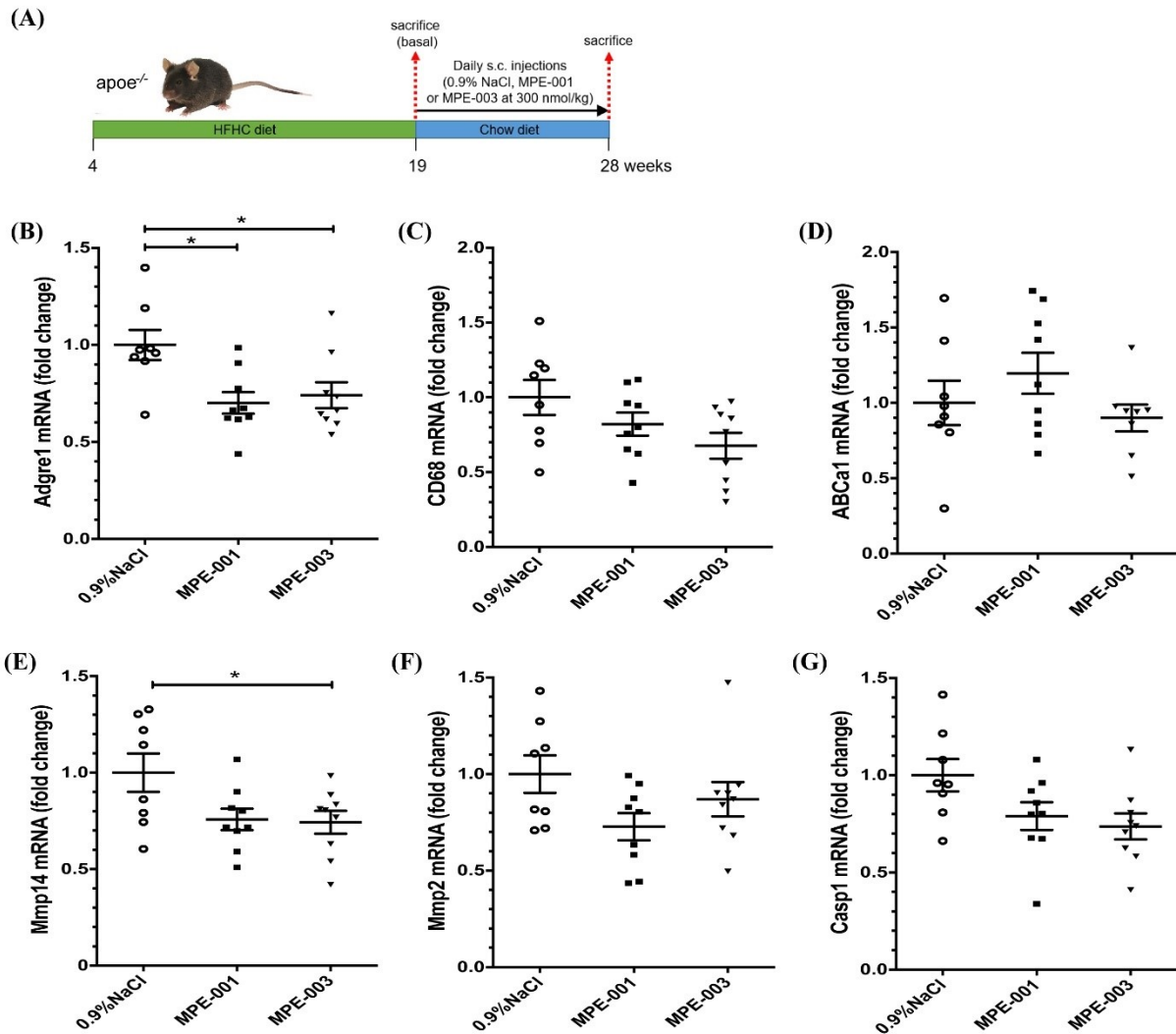
**Supplemental Figure 5:** Azapeptides did not modulate blood leukocyte nor monocyte counts. Blood sample was taken at sacrifice to perform blood and differential counts analysis. Total blood cell count, as well as differential leukocytes counts, were performed. **(A)** Study design. **(B)** Blood leukocyte counts and **(C)** blood monocyte counts. Results are expressed as dot plots and mean  $\pm$  SEM (n = 6 (basal) or n = 11 mice per group).



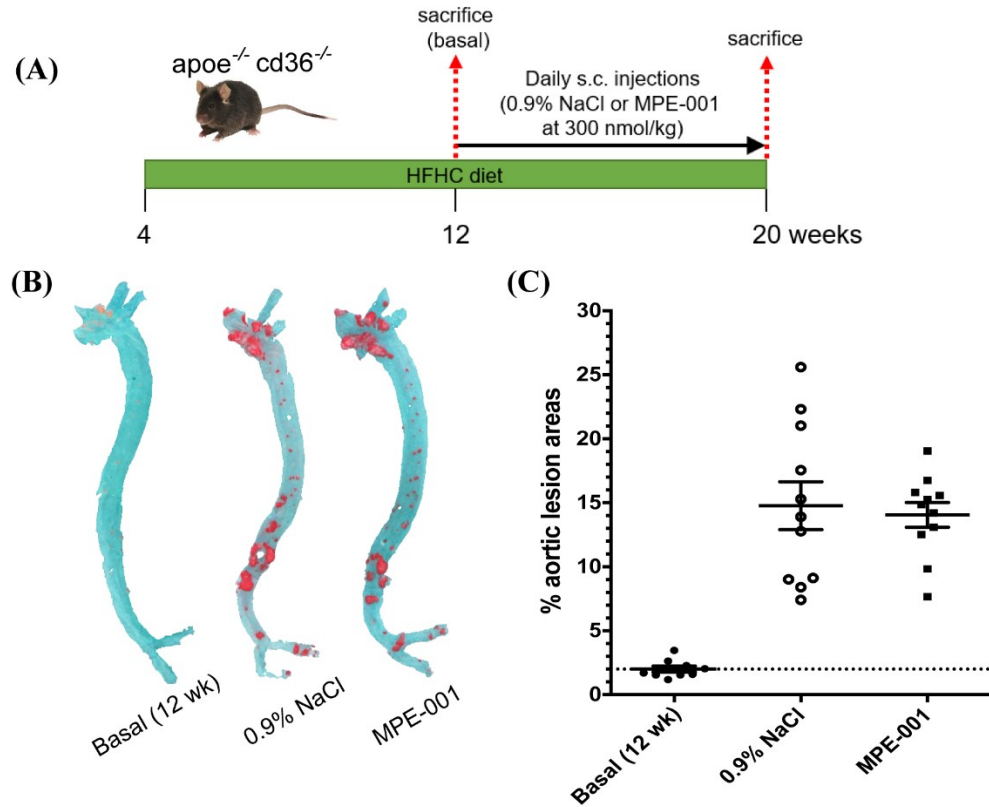
**Supplemental Figure 6:** Immunocytochemistry negative controls. Representative images of isotype control antibodies staining for F4/80 (rat IgG2B), iNOS (rabbit IgG) and CD206 (goat IgG) markers on serial cross-sections of BCA at 10X magnification (scale bar: 100  $\mu$ m).



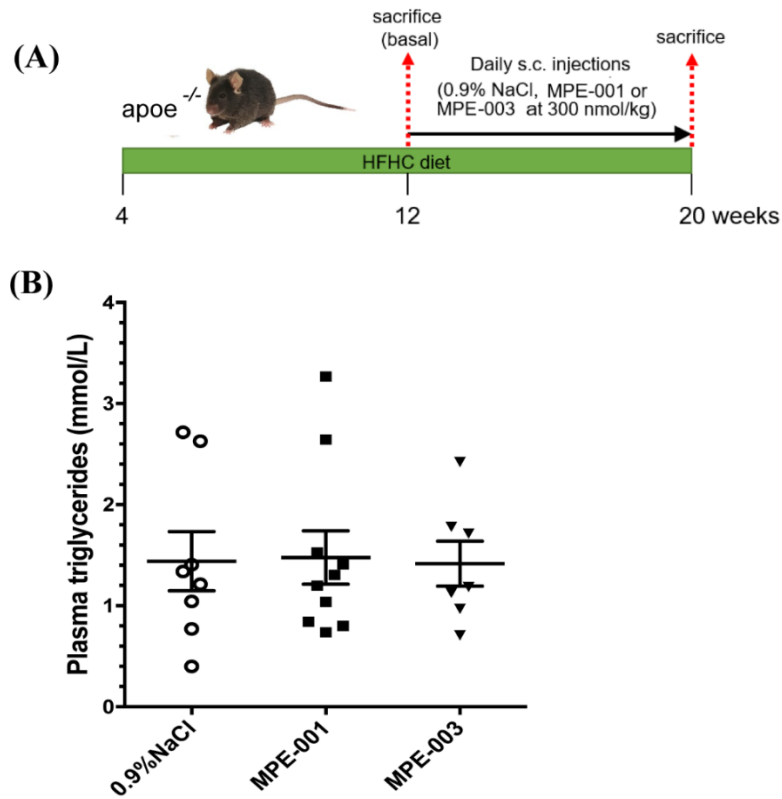
**Supplemental Figure 7:** Azapeptides did not alter collagen deposition nor cellularity of F4/80<sup>+</sup> cells within BCA lesion. MPE-003 reduced the iNOS<sup>+</sup>/YM1<sup>+</sup> cell ratio. **(A)** Study design. **(B)** Representative serial cross-sections of BCA from vehicle (0.9% NaCl)-, MPE-001- and MPE-003 (300 nmol/kg)-treated mice at week 28 stained with Lillie's trichrome at 10X magnification (scale bar: 100  $\mu$ m). **(C)** Percentage collagen in BCA lesions. **(D)** Cellularity of F4/80<sup>+</sup> cells per mm<sup>2</sup> of lesion. **(E)** iNOS<sup>+</sup>/YM1<sup>+</sup> cell ratio. Results are expressed as bar graphs  $\pm$  SEM of 2-4 sections per mice and 4-5 mice per group. \*\* *p* < 0.01, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison *post hoc* test.



**Supplemental Figure 8:** Azapeptide treatment reduces steady state mRNA levels of *Adgre1* and *Mmp14* in abdominal aortas. **(A)** Study design. **(B)** mRNA levels of *Adhesion g protein-coupled receptor e1 (Adgre1)* encoding for F4/80 protein, **(C)** *Cluster of differentiation 68 (CD68)*, **(D)** *ATP-binding cassette transporter a1 (ABCa1)*, **(E)** *Matrix metalloproteinase 14 (Mmp14)*, **(F)** *Matrix metalloproteinase 2 (Mmp2)* and **(G)** *Caspase-1 (Casp1)* in aortic tissue from 8-9 mice per group. Values were normalized to  $\beta$ -actin mRNA. Results are expressed as dot plots and mean fold change  $\pm$  SEM versus vehicle set as 1. \*  $p < 0.05$ , One-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison *post hoc* test.

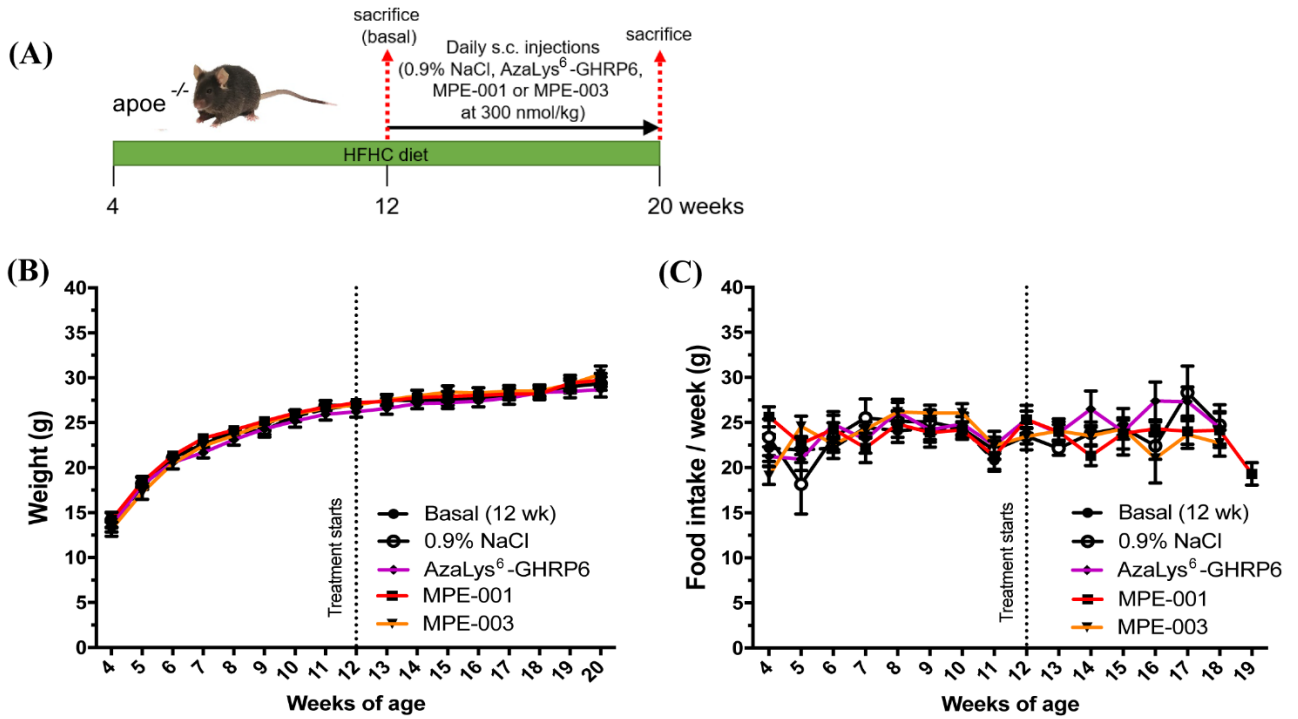


**Supplemental Figure 9:** Atheroprotective effects of azapeptide MPE-001 is CD36-dependent as no effects are observed in *apoe<sup>-/-</sup> cd36<sup>-/-</sup>*. **(A)** Schematic representation of the experimental protocol: *apoe<sup>-/-</sup> cd36<sup>-/-</sup>* mice fed a HFHC diet received a daily dose of 300 nmol/kg of MPE-001 (n = 11) or 0.9% NaCl vehicle (n = 11) from 12 to 20 weeks of age. A baseline group (n = 9), was sacrificed at week 12. **(B)** Representative *en face* oil red-O-stained aortas from 20-week-old *apoe<sup>-/-</sup> cd36<sup>-/-</sup>* mice. **(C)** Percent aortic lesion areas shown as dot plots and mean  $\pm$  SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison *post hoc* test.

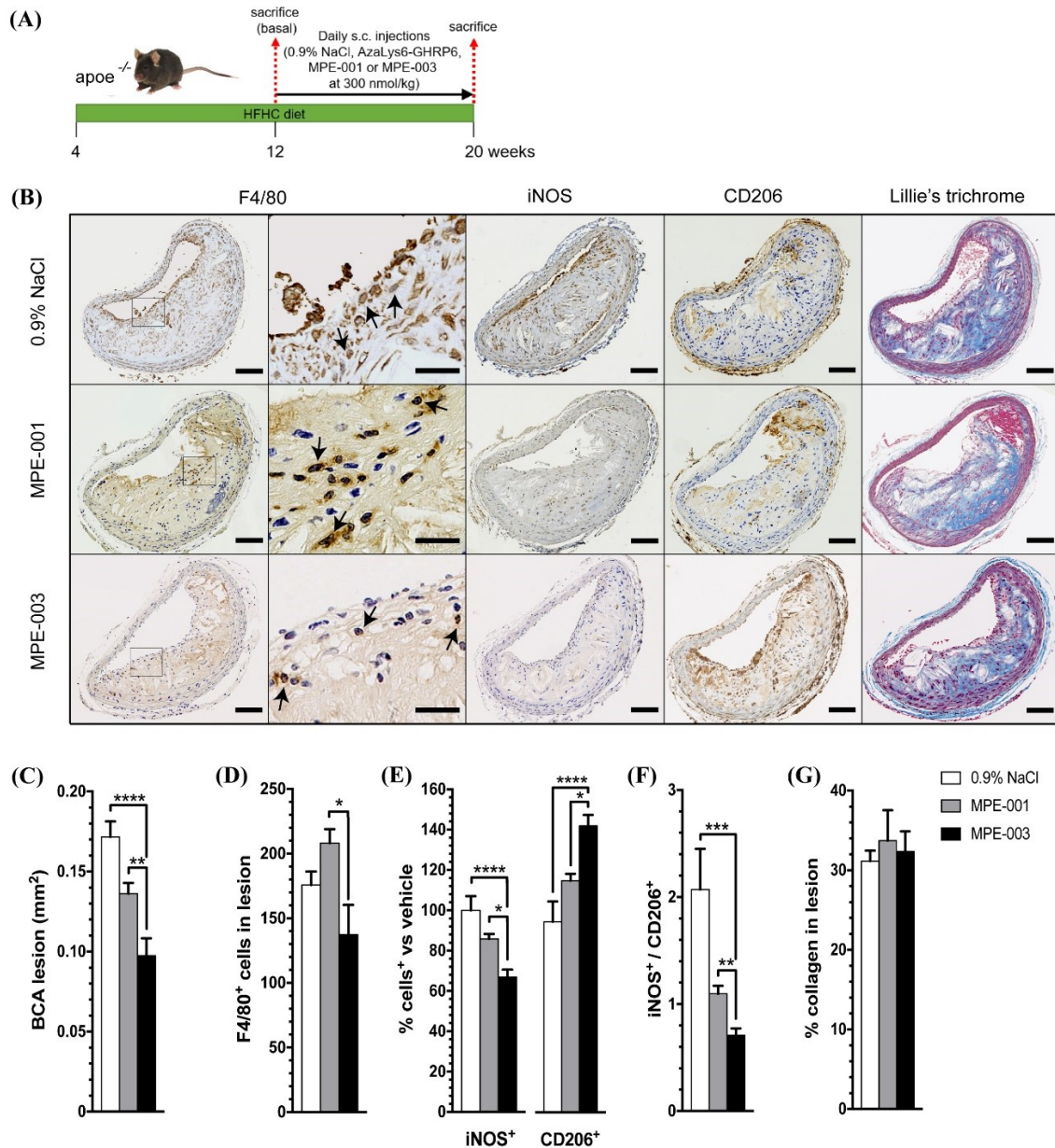


**Supplemental Figure 10:** Azapeptide treatment did not modulate plasma triglyceride levels. (A) Study design. (B) Plasma triglycerides of *apoe*<sup>-/-</sup> mice at 20 weeks of age. Results are shown as dot plots and mean  $\pm$  SEM (n = 7-10 mice per group).



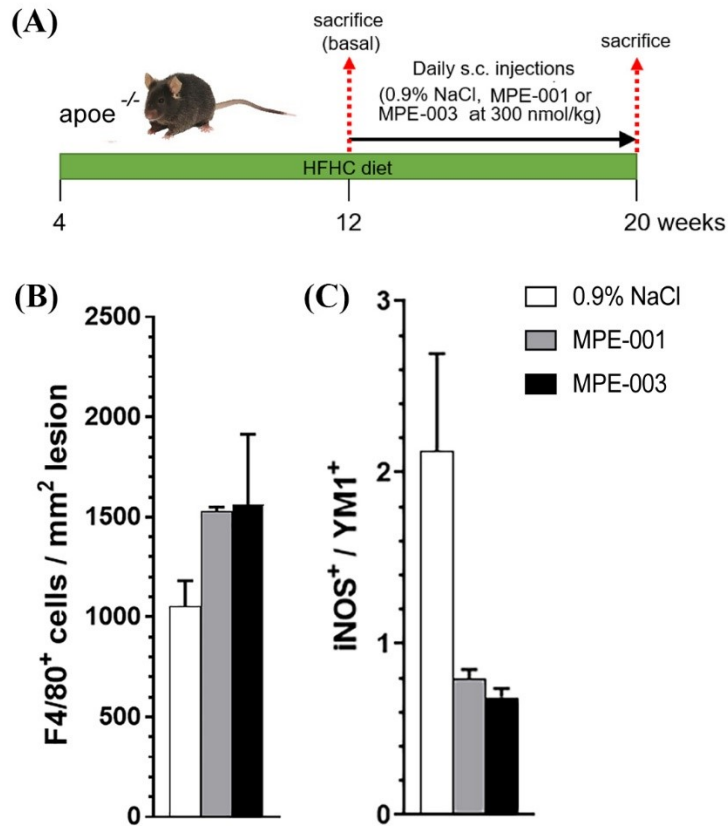


**Supplemental Figure 11:** Azapeptide treatment did not modulate body weight gain and weekly food intake. **(A)** Study design. **(B)** Weekly body weight gain and **(C)** weekly food intake. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM.



**Supplemental Figure 12:** Azapeptides skewed macrophages towards the anti-inflammatory phenotype. **(A)** Study design. **(B)** Representative serial cross-sections of BCA from vehicle (0.9% NaCl)-, MPE-001- and MPE-003 (300 nmol/kg)-treated mice at week 20, immunostained with antibodies against F4/80, iNOS and CD206, and with Lillie's trichrome at 10X magnification (scale bar: 100  $\mu$ m). Enlarged areas (100X) are displayed from the inset (scale bar: 100  $\mu$ m). **(C)** BCA

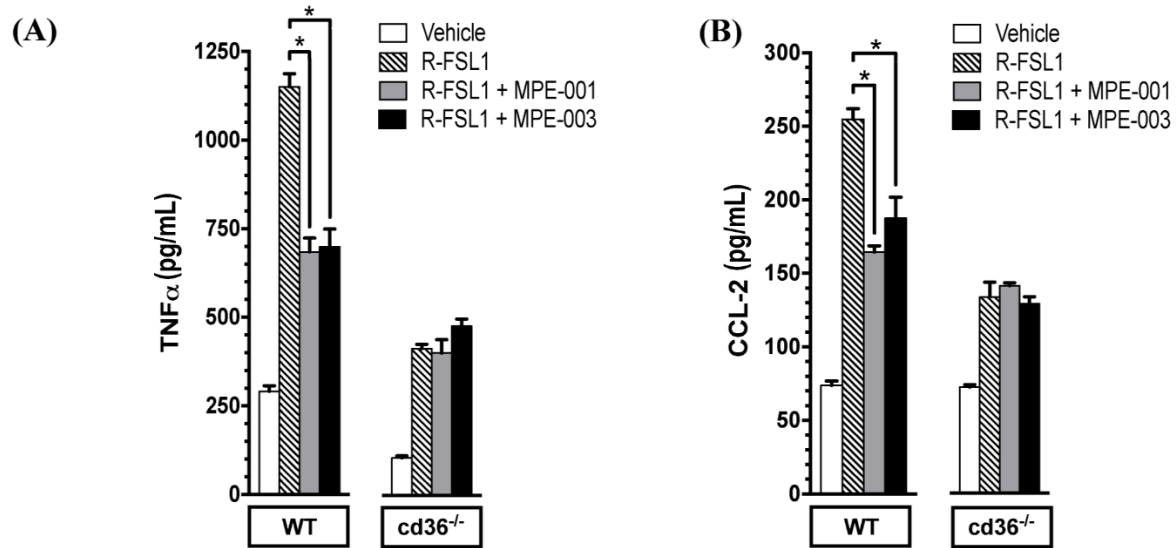
lesion areas expressed in mm<sup>2</sup>. **(D)** F4/80<sup>+</sup> cell counts in BCA lesion areas. **(E)** Relative percentage of iNOS<sup>+</sup> and CD206<sup>+</sup> versus vehicle. **(F)** Ratio of iNOS to CD206 positive cells in BCA lesions. **(G)** Percentage collagen in BCA lesions. Results are the mean ± SEM of 4 (0.9% NaCl), 5 (MPE-001 and MPE-003) mice per group, n = 3 sections per mice. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , nested one-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison *post hoc* test.



**Supplemental Figure 13:** Azapeptide treatment tended to reduce the iNOS<sup>+</sup>/YM1<sup>+</sup> cell ratio.

**(A)** Study design. **(B)** Cellularity of F4/80<sup>+</sup> cells per mm<sup>2</sup> of lesion **(C)** iNOS<sup>+</sup>/YM1<sup>+</sup> cell ratio.

Results are expressed as mean ± SEM of 3 sections per mice and 4-5 mice per group.



**Supplemental Figure 14:** Azapeptide reduced pro-inflammatory cytokines in peritoneal macrophages supernatants. Purified resident peritoneal macrophages from CD36<sup>+/+</sup> (wild type or WT) or *cd36*<sup>-/-</sup> mice were stimulated with 300 ng/mL R-FSL1 (a TLR2/6 selective agonist) in the presence of 10<sup>-7</sup> M MPE-001, MPE-003 or vehicle, and supernatants were assayed for **(A)** TNF $\alpha$  and **(B)** CCL-2. Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM (4 mice per group). \*  $p < 0.05$ , one-way ANOVA followed by Tukey's Multiple Comparison *post hoc* test.



### Chapitre 3 – Discussion

Malgré les avancements thérapeutiques des 20 dernières années, les maladies CV sont toujours la première cause de mortalité dans le monde (Dagenais *et al.*, 2019). Au Canada, les données de 2012 montrent qu'un Canadien sur 12 reçoit un diagnostic de maladie CV au cours de sa vie. Parmi les patients diagnostiqués, un va en décéder à chaque 5 minutes (GouvernementduCanada 2012). Ces chiffres alarmants s'expliquent entre autres par la présence de nombreux facteurs de risque tels que l'hypertension, des taux élevés de cholestérol sanguin, le tabagisme et la sédentarité. Par ailleurs, ce sont 9 Canadiens sur 10 qui souffrent d'au moins un de ces facteurs contribuant au développement de maladies CV (Heartandstroke 2020).

De plus, il a été rapporté que la pandémie actuelle due au virus SARS-CoV-2 est associée à un taux de mortalité plus élevé chez les patients atteints de comorbidités dont les plus fréquentes sont l'hypertension, le diabète et les maladies CV (Jordan *et al.*, 2020, Yang *et al.*, 2020). Étant donné que l'hypertension et le diabète sont des facteurs de risque d'athérosclérose, il est possible que l'athérosclérose contribue à la sévérité et donc à l'incidence d'hospitalisations due au virus (Bonow *et al.*, 2020). Le besoin de thérapies ciblant les maladies CV reste donc d'actualité et mérite l'attention des chercheurs.

D'autres facteurs dont l'hypercholestérolémie, le sexe masculin et les maladies inflammatoires chroniques telles l'arthrite rhumatoïde et les maladies inflammatoires de l'intestin contribuent au développement des lésions athérosclérotiques, notamment au niveau des artères coronariennes (Davies *et al.*, 1976, Skeoch *et al.*, 2015, Feng *et al.*, 2017). Plusieurs des traitements actuels visent à diminuer les niveaux de LDL sanguins et à contrôler les facteurs de risques tel l'hypertension. Les statines sont les plus utilisées et recommandées selon les lignes directrices de

l'*American College of Cardiology* (Washington, D.C., États-Unis) (Grundy *et al.*, 2019), du Canadian Cardiovascular Society Guidelines (Ottawa, ON, Canada)(Anderson *et al.*, 2016) et de l'*European Atherosclerosis Society* (Gothenburg, Götaland, Suède)(Authors/Task Force *et al.*, 2019). Leur mécanisme d'action consiste à inhiber une étape de la synthèse du cholestérol par l'inhibition de l'enzyme HMG-CoA (Endo 2010). Bien qu'il existe d'autres classes de médicaments visant la diminution du cholestérol sanguin, comme les anti-PCSK9, les fibrates, l'ézétimibe et la niacine, les statines forment encore aujourd'hui la première ligne de traitement pour la prévention primaire et secondaire des maladies CV découlant de l'athérosclérose (Grundy *et al.*, 2000). En prévention primaire, on vise une diminution de 35% du LDL, tandis qu'en prévention secondaire c'est plutôt 50%. Il faut d'abord évaluer le risque de développer une maladie CV sur 10 ans en se basant sur les facteurs de risque suivants : âge, sexe, tabagisme, hypertension, diabète et taux plasmatiques de LDL et HDL. Ensuite, on vise à diminuer les taux plasmatiques de LDL selon le niveau de risque du patient et également selon la concentration actuelle de LDL plasmatique. Des études ont déterminé que la diminution d'une mmol/L de LDL (39 mg/dL) chez les patients recevant des statines en prévention secondaire est associée à une diminution du risque de développer une maladie CV entre 20-25%. Il est important de choisir adéquatement la statine pour traiter chaque patient afin de la balance-bénéfice/risque soit positive. En effet, une thérapie agressive réduisant fortement les taux de LDL, mais associée à des effets indésirables plus sévères ne sera bénéfique que pour les patients à haut risque de complications cardiovasculaires. Les statines présentent aussi d'autres effets, notamment anti-inflammatoires, pouvant contribuer à leur effet anti-athérosclérotique (Schonbeck *et al.*, 2004). D'autre part, environ 15% des patients traités avec les statines auront des effets secondaires comme des douleurs musculaires, des crampes et des faiblesses. Le symptôme le plus sévère associé à la prise de statine est la myopathie grave, bien qu'elle n'ait été observée que chez 1 patient sur 23 millions (Fitchett *et al.*, 2015).



Ainsi, les lignes directrices américaines, canadiennes et européennes recommandent dans certains cas l'ajout de ézetimibe, ou d'anti-PCSK9, aux statines afin d'atteindre les taux de LDL sanguin visés. L'ézetimibe inhibe l'absorption intestinale du cholestérol et est surtout utilisé lorsque les patients ne tolèrent pas une haute dose de statine qui leur permettrait d'atteindre les taux de LDL visés. En monothérapie à 10 mg par jour pendant 12 semaines, l'ézetimibe réduit d'environ 15-25% les niveaux de LDL plasmatiques (Morrone *et al.*, 2012). Des études montrent d'ailleurs que l'ajout d'ezetimide aux statines chez les patients à haut risque est bénéfique puisque l'effet est additif.

Pour ce qui est des anti-PCSK9, qui induisent le recyclage à la membrane du récepteur LDL, ils sont surtout recommandés chez les patients à haut risque de maladies CV. En effet, des études évaluent que le rapport coût-efficacité de cette thérapie n'est pas favorable pour les patients à faible risque. En 2017 au Canada, le coût des anti-PCKS9 a été évalué à 7500\$ par année pour un patient (Lee *et al.*, 2018), alors que le coût des statines en 2007 tournait autour de 400-700\$ annuellement (Tran *et al.*, 2007). Depuis l'entrée en marché des molécules génériques en 2011, le coût des statines a diminué de 25% (Jackevicius *et al.*, 2012). De plus, très peu de compagnies d'assurance couvrent actuellement les anti-PCSK9, et si c'est le cas, seulement les patients à haut risque y sont admissibles. Les anti-PCSK9 peuvent diminuer entre 45-60% les taux circulants de LDL (Grundy *et al.*, 2000) et sont associés à un érythème cutané au site d'injection de l'anticorps (McKenney 2015), bien que ce soit transitoire.

La niacine et les fibrates font également partie des thérapies utilisées pour réduire les taux de LDL plasmatique, bien que leurs effets soient modestes en comparaison des statines. La niacine, aussi connue sous les noms de vitamine B3 et acide nicotinique, diminue la sécrétion hépatique des VLDL, ce qui permet une réduction d'environ 15-25% des LDL, mais elle est associée à plusieurs

effets secondaires (Grundy *et al.*, 2000). Le plus fréquent est la rougeur de la peau (70% des patients), et bien que rare, il y a également un risque de développer une résistance à l'insuline, ce qui est potentiellement grave chez les patients diabétiques (Goldberg *et al.*, 2008). Les fibrates, en tant que ligand du PPAR $\alpha$ , peuvent également diminuer les taux de LDL sanguin entre 5-15%. Ils vont diminuer la sécrétion de VLDL et augmenter la dégradation des LDLs en augmentant le catabolisme des VLDL et la synthèse de HDL. Les effets secondaires possibles de cette thérapie incluent les affections de la vésicule biliaire et un changement dans la créatinine sérique (Tenenbaum *et al.*, 2012). De plus, le risque de myopathie grave est augmenté lorsque les fibrates sont pris en concomitance avec les statines (Grundy *et al.*, 2000).

Ainsi, même si plusieurs patients bénéficient des thérapies actuellement disponibles, il existe malgré tout un risque résiduel de subir un évènement cardiovasculaire puisqu'avoir des taux élevés de LDL plasmatique n'est pas le seul facteur menant à l'accumulation de cholestérol dans l'intima des vaisseaux sanguins (Aday *et al.*, 2018). En effet, l'athérosclérose est une maladie ayant une composante inflammatoire importante dans l'initiation et la progression des lésions (Ridker *et al.*, 2002, Ridker *et al.*, 2009). L'endothélium dysfonctionnel exprime davantage de molécules d'adhérence ce qui favorise le recrutement de monocytes qui vont activer et perpétuer la réponse inflammatoire locale. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles thérapies efficaces visant des cibles différentes dans le but de diminuer la progression de l'athérosclérose ou encore mieux, diminuer les plaques préétablies dans les parois vasculaires.

La formation de cellules spumeuses à partir des macrophages s'infiltrant dans les plaques d'athérosclérose est en grande partie due à l'internalisation excessive de lipides modifiés, principalement du LDLox, par les récepteurs éboueurs CD36, SR-A et LOX-1 (Rahaman *et al.*, 2006, Pluddemann *et al.*, 2007). Plusieurs études ont montré le rôle dominant du récepteur CD36

dans l'internalisation du LDLox. Un des premiers essais réalisés avec des macrophages péritonéaux isolés de souris CD36<sup>-/-</sup>, lesquels ont été incubés avec des LDL modifiées par des MPO et marquées à l'iode 125 ont montré une diminution de 60% de l'internalisation de LDLox chez les souris déficientes en CD36 par comparaison à des macrophages de souris de type sauvage (Lougheed *et al.*, 1997). Des études additionnelles ont confirmé ces résultats. D'une part chez l'homme, où des macrophages péritonéaux dont le CD36 a été neutralisé via des anticorps anti-CD36 ont montré une diminution de 50% de l'internalisation de LDLox (Podrez *et al.*, 2000). D'autre part, une étude a été menée chez un modèle murin d'athérosclérose dans le but d'évaluer l'internalisation de LDL oxydées par une molécule de cuivre (Cu-LDLox) par des macrophages péritonéaux de souris apoE<sup>-/-</sup> à celui de souris apoE<sup>-/-</sup>CD36<sup>-/-</sup> (Febbraio *et al.*, 2000). Ces essais ont montré une diminution de 60% de l'internalisation des Cu-LDLox en l'absence du CD36.

Aussi appelé SR-B2, Scarb-3 ou *fatty acid translocase*, le récepteur CD36 a de nombreuses fonctions selon le type cellulaire qui l'exprime. Il joue entre autres un rôle dans la clairance des cellules apoptotiques (efférocytose), l'inflammation, l'angiogenèse, l'internalisation et le métabolisme des acides gras et lipoprotéines (Silverstein *et al.*, 2000, Febbraio *et al.*, 2001). Dans la pathologie d'athérosclérose, le catabolisme du LDLox induit une régulation positive de l'expression du CD36 par les macrophages par la génération d'acides gras qui vont activer les récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$  et LXRA (Chawla *et al.*, 2001, Glatz *et al.*, 2018).

La synthèse de sécrétagogues de l'hormone de croissance (*growth hormone releasing peptide*, GHRP), plus précisément du GHRP-6, est à la genèse des analogues azapeptidiques qui font l'objet de ce mémoire. Plus précisément, il y a d'abord eu l'identification du récepteur GHS-R1a au niveau du système nerveux central (Howard *et al.*, 1996), puis de son ligand endogène, la ghréline, au niveau de l'estomac (Kojima *et al.*, 1999). Des études ont ensuite montré que le GHS-

R1a était également exprimé au niveau des vaisseaux sanguins, dont ceux du cœur, et que la ghréline exerçait des effets cardioprotecteurs en s'y liant (Baldanzi *et al.*, 2002, Frascarelli *et al.*, 2003). Des études subséquentes ont montré qu'un nouveau peptide synthétique dérivé du GHRP-6, l'hexaréline, avait également un potentiel cardioprotecteur indépendant de l'hormone de croissance en préservant la contractilité des cellules musculaires cardiaques dans un modèle de rat soumis à une ischémie-reperfusion du myocarde (Berti *et al.*, 1998). Ces observations suggéraient donc que l'hexaréline exerçait ses effets via un autre type de récepteur cardiaque. Des essais de compétition de liaison sur des cœurs isolés de rat menés par l'équipe de Ong ont permis de caractériser les sites de liaisons de l'hexaréline au niveau cardiaque (Bodart *et al.*, 1999). Cette étude a mis de l'avant la présence de récepteurs distincts des récepteurs aux GHRP hypophysaires impliqués dans la sécrétion d'hormone de croissance. Par la suite, d'autres essais ont identifié ces récepteurs au niveau cardiaque comme étant le récepteur éboueur CD36 (Bodart *et al.*, 2002).

Subséquemment, le site de liaison de l'hexaréline au CD36 a été caractérisé comme étant au niveau de l'ectodomaine, chevauchant ainsi le site de liaison du LDLox (Demers *et al.*, 2004). Des études menées par notre groupe ont montré que le peptide synthétique EP80317 dérivé du GHRP-6 avait peu ou pas la capacité de sécréter de l'hormone de croissance, mais possédait toutefois un potentiel anti-athérosclérotique (Marleau *et al.*, 2005). En effet, notre groupe a rapporté que l'administration prolongée du EP80317 chez des souris déficientes en apoE a permis de réduire la progression des lésions d'athérosclérose au niveau de l'aorte et de diminuer les taux de cholestérol après une administration prolongée. Le EP80317 exercerait ses effets en agissant sur l'internalisation et le métabolisme des lipoprotéines modifiées, de même que sur l'efflux du cholestérol au niveau des macrophages, l'inflammation vasculaire et la régulation du trafic de cellules mononucléaires (Harb *et al.*, 2009). Ces effets n'étaient pas observés chez les souris apoE<sup>-</sup>

$^{-/-}$ CD36 $^{-/-}$ , ce qui a permis de montrer que les effets thérapeutiques du EP80317 dépendent de la présence du CD36 (Marleau *et al.*, 2005). Il a été démontré que ce peptide augmente l'efflux de cholestérol par l'activation de la voie PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ABCA-1/G-1 au niveau des macrophages (Bujold *et al.*, 2013). Des études additionnelles ont montré que le EP80317 augmente le transport inverse du cholestérol à partir des intestins et du foie, facilitant ainsi son excrétion dans les fèces (Bujold *et al.*, 2013).

Plus récemment, des analogues azapeptidiques du GHRP-6 ont été développés en tant que ligands puissants et sélectifs du récepteur CD36 (Sabatino *et al.*, 2011). Ces azapeptides possèdent un atome central de type azote, plutôt que carbone comme c'était le cas pour la première génération de ligands dérivés des GHRP.

Dans la littérature scientifique, les dérivés azapeptides ont été étudiés dans plusieurs contextes, notamment en tant que ligands pour certains récepteurs comme les intégrines et les récepteurs de la mélanocortine, mais aussi en tant qu'inhibiteurs d'enzymes comme la cystéine protéase (Proulx *et al.*, 2011). Des dérivés azapeptidiques du GHRP-6 ont également montré des propriétés intéressantes, principalement par leur sélectivité augmentée envers le récepteur CD36 et leur affinité réduite pour le GHS-R1a (Proulx *et al.*, 2011). Plus précisément, des essais de liaison par compétition ont montré qu'un analogue aza-Phe<sup>4</sup>, le CP-3 (iv), présente une sélectivité 1000 fois plus grande envers le CD36 comparée au GHRP-6. Dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion du myocarde, le CP-3 (iv) a diminué la génération d'espèces réactives de l'oxygène et l'apoptose des cardiomyocytes (Huynh *et al.*, 2018). L'analogue aza-Tyr<sup>4</sup>, nommé MPE-001 dans la présente étude, a démontré de nombreuses propriétés thérapeutiques intéressantes. En plus d'exercer une activité anti-angiogénique (Chingle *et al.*, 2017), le MPE-001 diminue l'accumulation de macrophages inflammatoires au niveau sous-rétinien dans un modèle de souris

exposées à un stress photo-oxydant via une lumière bleue (Mellal *et al.*, 2019). L'atténuation de l'inflammation rétinienne est due à l'activation de voies anti-inflammatoires comme PPAR $\gamma$ -PGC-1 $\alpha$  et à l'inhibition de la voie NK- $\kappa$ B et de l'inflammasome NLRP-3, ce qui diminue l'expression des cytokines inflammatoires TNF $\alpha$ , CCL-2 et IL-12. De surcroît, il a été rapporté que l'azapeptide MPE-001 réduit la production d'oxyde nitrique par les macrophages *in vitro*, ce qui réitère son rôle de médiateur anti-inflammatoire (Chignen Possi *et al.*, 2017).

Les expériences présentées dans ce mémoire ont été réalisées chez des souris mâles déficientes en apolipoprotéines E (apoE<sup>-/-</sup>) selon deux protocoles. Nous avons utilisé le modèle déficient en apoE plutôt que celui déficient en LDLR pour plusieurs raisons. D'abord, les souris apoE<sup>-/-</sup> nourries avec une diète HFHC développent rapidement des lésions, notamment au niveau des sinus aortiques du cœur et tout au long de l'aorte (Nakashima *et al.*, 1994), ont plus de cellules musculaires lisses et ont des niveaux de cholestérol plasmatiques plus élevés que le modèle déficient en récepteur au LDL (Getz *et al.*, 2016). Ensuite, ce modèle développe des lésions même lorsque les souris sont nourries avec une diète normale, ce qui n'est pas le cas des LDLR<sup>-/-</sup> (Getz *et al.*, 2016). Ainsi, le modèle déficient en apoE permet d'obtenir rapidement des souris en hypercholestérolémie ayant des plaques athérosclérotiques avancées, notamment au niveau de l'artère brachiocéphalique, sur diète normale ou en accéléré avec une diète HFHC (Getz *et al.*, 2016). Des études précédemment menées par l'équipe de la Dre Febbraio ont montré que les souris des deux sexes développent des lésions semblables (Febbraio *et al.*, 2000). Ainsi, des souris mâles ont été choisies par souci d'homogénéité dans les études présentées dans ce mémoire.

Dans une première étude, nous avons soumis les souris à une diète HFHC suivi d'une diète normale tandis que dans une deuxième étude, les souris ont plutôt été soumises à un régime HFHC tout au long du protocole. Nous avons choisi d'étudier l'effet des azapeptides dans ces 2 contextes

afin de caractériser plus exhaustivement leurs propriétés anti-athérosclérotiques. Lorsque la diète HFHC est maintenue pendant la période de traitement, la progression des lésions et le contexte inflammatoire sont plus prononcés que lorsque la diète normale est introduite en concomitance avec le traitement par les azapeptides. En effet, la diète HFHC est riche en cholestérol (1,25%) comparée à une diète normale (0%) ou de type Western (environ 0,2%), contribue à aggraver l'athérosclérose (Getz *et al.*, 2006). Ainsi, nous pouvons d'une part étudier la capacité des azapeptides à ralentir la progression des lésions lorsque la diète HFHC est maintenue tout au long de l'étude, et d'autre part le potentiel des azapeptides à réduire la taille des plaques existantes chez des souris dont les taux de LDL sont réduits. Il est important de noter que le changement de diète HFHC pour une diète normale garde tout de même les souris en hypercholestérolémie, bien que ce soit à un degré moindre que lorsque la diète HFHC est maintenue.

Nos résultats ont montré que le traitement de souris apoE<sup>-/-</sup> avec les azapeptides MPE-001 et MPE-003 a interrompu la progression des lésions au niveau des sinus aortiques du cœur à la suite du changement de régime alimentaire HFHC pour une diète normale. De plus, ce changement de diète nous a permis d'observer à ce site une régression des lésions à la suite des traitements quotidiens par les azapeptides. En effet, les souris soumises à un changement de diète et traitées avec un azapeptide pendant 9 semaines ont environ 20% moins de lésions au niveau des sinus que les souris sacrifiées à la semaine 19 avant le début des traitements (groupe basal). En accord avec ces observations, les azapeptides MPE-001 et MPE-003 ont également réduit la progression des lésions au niveau des sinus aortiques du cœur chez les souris nourries avec une diète HFHC tout au long de l'étude. Il semble donc que dans ces conditions, malgré le traitement par les azapeptides, les lésions prennent de l'expansion au niveau des sinus aortiques. En effet, les souris sont fortement hypercholestérolémiques. Il est possible que la progression des lésions soit plus rapide que la

résolution de celles-ci induite par les azapeptides MPE-001 et MPE-003, ou encore que les lésions soient à un stade trop avancé pour être résolues par le traitement. Cela expliquerait donc pourquoi la régression des lésions n'a pas été observée dans ce contexte.

De plus, le changement de diète n'a pas arrêté la progression des plaques au niveau de la crosse aortique, mais les azapeptides ont significativement ralenti leur accroissement d'environ 25% comparé au groupe contrôle traité avec le véhicule (NaCl 0,9%). En effet, bien que les taux plasmatiques diminuent à la suite du changement de diète, les souris restent hypercholestérolémiques et les lésions progressent à ce site. Chez les souris maintenues sur diète HFHC tout au long de l'étude, la progression des lésions dans l'ensemble du vaisseau aortique a été diminuée de 28% chez les groupes traités aux azapeptides en comparaison du groupe ayant reçu le véhicule uniquement. Quant au contrôle négatif aza-Lys<sup>6</sup>-GHRP-6, il n'a pas été en mesure d'atténuer les lésions, comme attendu.

Dans les 2 régimes alimentaires, les effets anti-athérosclérotiques des azapeptides étaient dépendants de la présence du récepteur CD36 puisqu'ils étaient absents chez les souris apoE<sup>-/-</sup> CD36<sup>-/-</sup>. Additionnellement, les taux plasmatiques de cholestérol total et de triglycérides n'ont pas été altérés par les traitements aux azapeptides et ce, dans les deux études. Ainsi, les effets athéroprotecteurs des MPE-001 et MPE-003 ne sont pas dus à la modulation des taux de lipides plasmatiques, comme c'est le cas pour les statines et les anti-PCSK9. Toutefois, les azapeptides ont significativement diminué les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  dans le contexte de changement de diète enrichie pour une diète normale, tandis que les marqueurs inflammatoires CRP, IL-6 et CCL-2 ont été réduits dans l'étude où la diète HFHC a été maintenue tout au long du protocole. Bien que les statines aient également des effets anti-inflammatoires, leurs effets indésirables sont tels que la balance bénéfico-risque n'est pas favorable pour tous les patients. La



sélectivité des azapeptides envers le CD36 pourrait toutefois de limiter les effets indésirables néfastes, comme la libération de l'hormone de croissance associée aux ligands du CD36 de première génération. Par exemple, les groupes de nos deux études sont comparables en termes de prise de poids, consommation de nourriture et nombre de leucocytes en circulation.

Dans l'étude où la diète HFHC a été changée pour une diète normale au moment où se sont amorcés les traitements quotidiens par un des azapeptides, nous avons conservé la portion abdominale de l'aorte afin d'y caractériser l'expression de gènes d'intérêts codant pour des protéines impliquées dans des mécanismes de progression ou de résolution des lésions. Nous avons d'abord extrait l'ARNm, puis déterminé par RT-qPCR l'expression relative de gènes codant pour les marqueurs de macrophages Adgre1 (F4/80) et CD68, le récepteur d'efflux de cholestérol ABCA-1, le marqueur d'apoptose caspase-1, de même que les enzymes de dégradation de matrice extracellulaire MMP-2 et MMP-14. Les expressions relatives de Adgre1 et de MMP14 ont été significativement diminuées pour les groupes traités avec un azapeptide par comparaison au groupe ayant reçu le véhicule, alors que la même tendance a été observée pour les autres gènes.

La diminution de gènes codant pour des marqueurs de macrophages suggère que les azapeptides MPE-001 et MPE-003 réduisent la présence de ces phagocytes au niveau de l'aorte, possiblement en raison d'une diminution de leur recrutement dans les lésions athérosclérotiques. Cette hypothèse est appuyée par nos études antérieures menées avec le ligand du CD36 EP80317. Effectivement, un traitement chronique avec le EP80317 a réduit l'accumulation de macrophages marqués à l' $^{111}\text{In}$  au niveau des lésions de l'aorte chez des souris apoE<sup>-/-</sup> par comparaison aux souris traitées avec le véhicule (Harb *et al.*, 2009). Fait intéressant, la caractérisation des macrophages au niveau des lésions de l'artère brachiocéphalique, là où les lésions les plus complexes ont été observées par d'autres groupes (Rosenfeld *et al.*, 2000), révèle une diminution en termes de nombre

absolu de macrophages, sans toutefois moduler leur densité cellulaire chez les souris traitées aux azapeptides, dans le contexte de changement de diète. Cela signifie que le nombre de macrophages a diminué, car les lésions sont plus petites, mais que le nombre de macrophages par mm<sup>2</sup> lésion reste inchangé à la suite du traitement.

On note un changement significatif du phénotype des macrophages au niveau de l'artère brachiocéphalique avec une réduction des marqueurs pro-inflammatoires (iNOS) et une augmentation des marqueurs anti-inflammatoires (CD206, YM1) suivant un changement de diète et neuf semaines de traitement par les azapeptides. Cela indique que le phénotype M2 est favorisé comparé au M1. Bien que l'immunohistochimie ne capture qu'une partie de la plasticité phénotypique des macrophages, la régression de lésions préétablies corrèle dans la littérature avec les marqueurs M2 (Stoger *et al.*, 2012, Rahman *et al.*, 2018). Ce phénotype est associé au remodelage tissulaire, à la réparation et la stabilité de la plaque, en plus d'exprimer plus fortement le récepteur CD36 (Feng *et al.*, 2000, Moore *et al.*, 2013). Nos études antérieures menées avec EP80317 ont montré que ce dernier stimule la voie PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ABCA-1/G-1 et favorise le transport inverse du cholestérol et l'efflux de cholestérol au niveau des macrophages. Cela coïncide avec la réduction de la progression des lésions et du ratio M1/M2 obtenus dans la présente étude. Ces résultats sont appuyés par un essai d'immunofluorescence dans lequel les images obtenues montrent la superposition des marqueurs F4/80 et iNOS sur les cellules fluorescentes. Cette observation appuie l'interprétation de nos résultats en immunohistochimie, car elle démontre que nous quantifions bien des macrophages (F4/80<sup>+</sup>) qui sont de type pro-inflammatoires, c'est-à-dire M1 (F4/80<sup>+</sup>iNOS<sup>+</sup>), ou non (F4/80<sup>+</sup>iNOS<sup>-</sup>).

La pyroptose, soit la mort cellulaire induite par l'activation de l'inflammasome NLRP3 par des DAMPs et PAMPs, active à son tour des caspases uniques à ce sous-type de mort (Bergsbaken

*et al.*, 2009). On compte parmi celles-ci la caspase-1 qui induit une cascade signalétique qui permet la sortie extracellulaire des cytokines inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18. Nos résultats montrent que les azapeptides auraient un effet anti-nécrotique. D'une part, nous avons observé une tendance à la diminution du gène caspase-1 par qPCR et d'autre part, une réduction de l'étendue des zones nécrotiques au sein des lésions de coupes de sinus aortiques chez les souris traitées avec un azapeptide lorsque comparé à celles ayant reçues le véhicule seulement.

De plus le traitement par les azapeptides n'affecte pas la stabilité de la plaque, comme le démontre la réduction des gènes codant pour la MMP-2 et MMP-14. Ces enzymes dégradent la matrice extracellulaire ce qui fragilise la plaque et amincit la chape fibreuse. Additionnellement, le pourcentage de collagène, quantifié par une coloration trichrome de Lillie au sein des lésions de coupe d'artères brachiocéphaliques, n'a pas été modulé par le traitement.

Enfin, des essais de consommation d'oxygène sur des monocytes dérivés de la moelle osseuse de souris de type sauvage puis exposé au découpleur de la phosphorylation oxydative, le phénylhydrazone carbonyl cyanide p-carbonyl cyanure trifluorométhoxyphényl hydrazone (FCCP) (Van den Bossche *et al.*, 2015), ont montré que le traitement avec les azapeptides a augmenté l'activité mitochondriale de ces cellules. Le passage au métabolisme aérobie coïncide avec le sous-type de macrophage anti-inflammatoire M2 qui présente des taux accrus de phosphorylation oxydative des acides gras par comparaison aux macrophages inflammatoires M1. En accord avec ces résultats, les azapeptides ont diminué la sécrétion des cytokines inflammatoires TNF $\alpha$  et CCL-2. Ces effets des MPE-001 et MPE-003 sont dépendants de la présence du CD36, comme démontré par l'absence de modulation de l'activité mitochondriale et de la sécrétion des cytokines chez les souris CD36<sup>-/-</sup>.

### **3.1. Conclusion**

En conclusion, les azapeptides exercent des effets athéroprotecteurs et athérorégressifs dans un modèle murin déficient en apoE en tant que ligands sélectifs du récepteur CD36. Plus précisément, ils modulent les voies signalétiques du CD36 de façon à diminuer la progression des lésions au sein de l'intima des vaisseaux sanguins, réduire l'inflammation en limitant la relâche de cytokines inflammatoires et favoriser le phénotype anti-inflammatoire des macrophages dont les principaux rôles sont de résoudre les lésions et promouvoir l'efférocytose. De plus, dans un contexte où une diète HFHC a été changée pour une diète normale, les azapeptides ont pu induire la régression de lésions préétablies au niveau des sinus aortiques du cœur. Ce résultat prometteur a été obtenu sans que les taux plasmatiques de cholestérol ne soient modulés. Bien que des patients bénéficient des thérapies qui réduisent les taux de LDL plasmatiques, une proportion de patients est toujours à risque de développer un événement cardiovasculaire dû à l'inflammation résiduelle. En effet, l'athérosclérose demeure une pathologie avec une grande composante inflammatoire stérile. Les azapeptides MPE-001 et MPE-003 diminuent l'inflammation locale et systémique, ce qui a permis une réduction de l'accumulation de cellules spumeuses et de la formation de noyau nécrotique au sein des lésions.

### **3.2. Perspectives futures**

Cibler le récepteur CD36 avec les azapeptides se présente comme une avenue thérapeutique très intéressante pour traiter l'athérosclérose. Bien que des effets athéroprotecteurs et athérorégressifs ont été observés dans la présente étude, le mécanisme d'action intracellulaire des azapeptides se doit d'être caractérisé de façon exhaustive. Des études se penchant sur les

évènements cellulaires et les molécules impliqués dans l'effet du traitement sur la migration des monocytes au niveau des lésions athérosclérotiques, l'apoptose des macrophages et l'efférocytose médiée par le CD36 restent à être évaluées. Pour ce faire, des essais déterminant l'effet des azapeptides sur l'efflux et le transport inverse de cholestérol au niveau des macrophages, notamment par l'activation de la voie PPAR $\gamma$ -LXR $\alpha$ -ABCA-1/G-1, se doivent d'être menées. De plus, des études confirmatoires chez des souris femelles déficientes en apoE devront être réalisées afin d'assurer que le sexe n'influence pas les effets des azapeptides.



## Références bibliographiques

Aday, A. W. and P. M. Ridker (2018). "Antiinflammatory Therapy in Clinical Care: The CANTOS Trial and Beyond." Front Cardiovasc Med **5**: 62.

Adiguzel, E., P. J. Ahmad, C. Franco and M. P. Bendeck (2009). "Collagens in the progression and complications of atherosclerosis." Vasc Med **14**(1): 73-89.

Akira, S. and K. Takeda (2004). "Toll-like receptor signalling." Nat Rev Immunol **4**(7): 499-511.

Alique, M., C. Luna, J. Carracedo and R. Ramirez (2015). "LDL biochemical modifications: a link between atherosclerosis and aging." Food Nutr Res **59**: 29240.

Allahverdian, S., P. S. Pannu and G. A. Francis (2012). "Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation." Cardiovasc Res **95**(2): 165-172.

Ananyeva, N. M., D. V. Kouiyavskaia, M. Shima and E. L. Saenko (2002). "Intrinsic pathway of blood coagulation contributes to thrombogenicity of atherosclerotic plaque." Blood **99**(12): 4475-4485.

Anderson, C. F. and D. M. Mosser (2002). "A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage." J Leukoc Biol **72**(1): 101-106.

Anderson, T. J., J. Gregoire, G. J. Pearson, A. R. Barry, P. Couture, M. Dawes, G. A. Francis, J. Genest, Jr., S. Grover, M. Gupta, R. A. Hegele, D. C. Lau, L. A. Leiter, E. Lonn, G. B. Mancini, R. McPherson, D. Ngui, P. Poirier, J. L. Sievenpiper, J. A. Stone, G. Thanassoulis and R. Ward (2016). "2016 Canadian Cardiovascular Society Guidelines for the Management of Dyslipidemia for the Prevention of Cardiovascular Disease in the Adult." Can J Cardiol **32**(11): 1263-1282.

Andrae, J., R. Gallini and C. Betsholtz (2008). "Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine." Genes Dev **22**(10): 1276-1312.

Atri, C., F. Z. Guerfali and D. Laouini (2018). "Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases." Int J Mol Sci **19**(6).

Auffray, C., M. H. Sieweke and F. Geissmann (2009). "Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells." Annu Rev Immunol **27**: 669-692.

Authors/Task Force, M., E. S. C. C. f. P. Guidelines and E. S. C. N. C. Societies (2019). "2019 ESC/EAS guidelines for the management of dyslipidaemias: Lipid modification to reduce cardiovascular risk." Atherosclerosis **290**: 140-205.

Babior, B. M. (2000). "Phagocytes and oxidative stress." Am J Med **109**(1): 33-44.

Back, M., A. Yurdagul, Jr., I. Tabas, K. Oorni and P. T. Kovanen (2019). "Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities." Nat Rev Cardiol **16**(7): 389-406.

Badimon, L. and G. Vilahur (2014). "Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture." J Intern Med **276**(6): 618-632.

Baetta, R. and A. Corsini (2010). "Role of polymorphonuclear neutrophils in atherosclerosis: current state and future perspectives." Atherosclerosis **210**(1): 1-13.

Baldanzi, G., N. Filigheddu, S. Cutrupi, F. Catapano, S. Bonisconi, A. Fubini, D. Malan, G. Baj, R. Granata, F. Broglio, M. Papotti, N. Surico, F. Bussolino, J. Isgaard, R. Deghenghi, F. Sinigaglia, M. Prat, G. Muccioli, E. Ghigo and A. Graziani (2002). "Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT." J Cell Biol **159**(6): 1029-1037.

Beckman, J. A., M. A. Creager and P. Libby (2002). "Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management." JAMA **287**(19): 2570-2581.

Beevers, G., G. Y. Lip and E. O'Brien (2001). "ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension." BMJ **322**(7291): 912-916.



Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer (2002). The Complex Regulation of Cholesterol Biosynthesis Takes Place at Several Levels. Biochemistry, Fifth Edition, W.H. Freeman.

Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer (2002). Important Derivatives of Cholesterol Include Bile Salts and Steroid Hormones. Biochemistry, Fifth Edition, W.H. Freeman.

Bergsbaken, T., S. L. Fink and B. T. Cookson (2009). "Pyroptosis: host cell death and inflammation." Nat Rev Microbiol 7(2): 99-109.

Berti, F., E. Muller, V. De Gennaro Colonna and G. Rossoni (1998). "Hexarelin exhibits protective activity against cardiac ischaemia in hearts from growth hormone-deficient rats." Growth Horm IGF Res 8 Suppl B: 149-152.

Bessi, V. L., S. M. Labbe, D. N. Huynh, L. Menard, C. Jossart, M. Febbraio, B. Guerin, M.

Bentourkia, R. Lecomte, A. C. Carpentier, H. Ong and S. Marleau (2012). "EP 80317, a selective CD36 ligand, shows cardioprotective effects against post-ischaemic myocardial damage in mice." Cardiovasc Res 96(1): 99-108.

Bodart, V., J. F. Bouchard, N. McNicoll, E. Escher, P. Carriere, E. Ghigo, T. Sejlitz, M. G. Sirois, D. Lamontagne and H. Ong (1999). "Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart." Circ Res 85(9): 796-802.

Bodart, V., M. Febbraio, A. Demers, N. McNicoll, P. Pohankova, A. Perreault, T. Sejlitz, E. Escher, R. L. Silverstein, D. Lamontagne and H. Ong (2002). "CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart." Circ Res 90(8): 844-849.

Bonow, R. O., G. C. Fonarow, P. T. O'Gara and C. W. Yancy (2020). "Association of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) With Myocardial Injury and Mortality." JAMA Cardiol.

Boren, J., K. Olin, I. Lee, A. Chait, T. N. Wight and T. L. Innerarity (1998). "Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects

proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding." J Clin Invest **101**(12): 2658-2664.

Boring, L., J. Gosling, M. Cleary and I. F. Charo (1998). "Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis." Nature **394**(6696): 894-897.

Bottomley, M. J., A. Cirillo, L. Orsatti, L. Ruggeri, T. S. Fisher, J. C. Santoro, R. T. Cummings, R. M. Cubbon, P. Lo Surdo, A. Calzetta, A. Noto, J. Baysarowich, M. Mattu, F. Talamo, R. De Francesco, C. P. Sparrow, A. Sitlani and A. Carfi (2009). "Structural and biochemical characterization of the wild type PCSK9-EGF(AB) complex and natural familial hypercholesterolemia mutants." J Biol Chem **284**(2): 1313-1323.

Bowers, C. Y., F. A. Momany, G. A. Reynolds and A. Hong (1984). "On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone." Endocrinology **114**(5): 1537-1545.

Bujold, K., K. Mellal, K. F. Zoccal, D. Rhainds, L. Brisette, M. Febbraio, S. Marleau and H. Ong (2013). "EP 80317, a CD36 selective ligand, promotes reverse cholesterol transport in apolipoprotein E-deficient mice." Atherosclerosis **229**(2): 408-414.

Bujold, K., D. Rhainds, C. Jossart, M. Febbraio, S. Marleau and H. Ong (2009). "CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPAR $\gamma$  activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages." Cardiovasc Res **83**(3): 457-464.

Buzello, M., J. Tornig, J. Faulhaber, H. Ehmke, E. Ritz and K. Amann (2003). "The apolipoprotein e knockout mouse: a model documenting accelerated atherogenesis in uremia." J Am Soc Nephrol **14**(2): 311-316.

Cardilo-Reis, L., S. Gruber, S. M. Schreier, M. Drechsler, N. Papac-Milicevic, C. Weber, O. Wagner, H. Stangl, O. Soehnlein and C. J. Binder (2012). "Interleukin-13 protects from

atherosclerosis and modulates plaque composition by skewing the macrophage phenotype." EMBO Mol Med **4**(10): 1072-1086.

Carlin, L. M., E. G. Stamatiades, C. Auffray, R. N. Hanna, L. Glover, G. Vizcay-Barrena, C. C. Hedrick, H. T. Cook, S. Diebold and F. Geissmann (2013). "Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal." Cell **153**(2): 362-375.

Chawla, A., W. A. Boisvert, C. H. Lee, B. A. Laffitte, Y. Barak, S. B. Joseph, D. Liao, L. Nagy, P. A. Edwards, L. K. Curtiss, R. M. Evans and P. Tontonoz (2001). "A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis." Mol Cell **7**(1): 161-171.

Chen, C. (2000). "Growth hormone secretagogue actions on the pituitary gland: multiple receptors for multiple ligands?" Clin Exp Pharmacol Physiol **27**(5-6): 323-329.

Chen, W., G. Chen, D. L. Head, D. J. Mangelsdorf and D. W. Russell (2007). "Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice." Cell Metab **5**(1): 73-79.

Chen, Y., D. J. Kennedy, D. P. Ramakrishnan, M. Yang, W. Huang, Z. Li, Z. Xie, A. C. Chadwick, D. Sahoo and R. L. Silverstein (2015). "Oxidized LDL-bound CD36 recruits an Na(+)/K(+)-ATPase-Lyn complex in macrophages that promotes atherosclerosis." Sci Signal **8**(393): ra91.

Chignen Possi, K., M. Mulumba, S. Omri, Y. Garcia-Ramos, H. Tahiri, S. Chemtob, H. Ong and W. D. Lubell (2017). "Influences of Histidine-1 and Azaphenylalanine-4 on the Affinity, Anti-inflammatory, and Antiangiogenic Activities of Azapeptide Cluster of Differentiation 36 Receptor Modulators." J Med Chem **60**(22): 9263-9274.

Chinetti, G., J. C. Fruchart and B. Staels (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation." Inflamm Res **49**(10): 497-505.

Chingle, R., C. Proulx and W. D. Lubell (2017). "Azapeptide Synthesis Methods for Expanding Side-Chain Diversity for Biomedical Applications." Acc Chem Res **50**(7): 1541-1556.

Chistiakov, D. A., I. A. Sobenin, A. N. Orekhov and Y. V. Bobryshev (2014). "Dendritic cells in atherosclerotic inflammation: the complexity of functions and the peculiarities of pathophysiological effects." Front Physiol **5**: 196.

Collins, R. G., R. Velji, N. V. Guevara, M. J. Hicks, L. Chan and A. L. Beaudet (2000). "P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." J Exp Med **191**(1): 189-194.

Collot-Teixeira, S., J. Martin, C. McDermott-Roe, R. Poston and J. L. McGregor (2007). "CD36 and macrophages in atherosclerosis." Cardiovasc Res **75**(3): 468-477.

Cooper, A. D. (1997). "Hepatic uptake of chylomicron remnants." J Lipid Res **38**(11): 2173-2192.

Croasdell, A., P. F. Duffney, N. Kim, S. H. Lacy, P. J. Sime and R. P. Phipps (2015). "PPARgamma and the Innate Immune System Mediate the Resolution of Inflammation." PPAR Res **2015**: 549691.

Crowther, M. A. (2005). "Pathogenesis of atherosclerosis." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 436-441.

Cuchel, M. and D. J. Rader (2006). "Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis?" Circulation **113**(21): 2548-2555.

Cushing, S. D., J. A. Berliner, A. J. Valente, M. C. Territo, M. Navab, F. Parhami, R. Gerrity, C. J. Schwartz and A. M. Fogelman (1990). "Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(13): 5134-5138.

Dagenais, G. R., D. P. Leong, S. Rangarajan, F. Lanas, P. Lopez-Jaramillo, R. Gupta, R. Diaz, A. Avezum, G. B. F. Oliveira, A. Wielgosz, S. R. Parambath, P. Mony, K. F. Alhabib, A. Temizhan, N. Ismail, J. Chifamba, K. Yeates, R. Khatib, O. Rahman, K. Zatonska, K. Kazmi, L. Wei, J. Zhu,

A. Rosengren, K. Vijayakumar, M. Kaur, V. Mohan, A. Yusufali, R. Kelishadi, K. K. Teo, P. Joseph and S. Yusuf (2019). "Variations in common diseases, hospital admissions, and deaths in middle-aged adults in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study." Lancet.

Dal-Secco, D., J. Wang, Z. Zeng, E. Kolaczowska, C. H. Wong, B. Petri, R. M. Ransohoff, I. F. Charo, C. N. Jenne and P. Kubes (2015). "A dynamic spectrum of monocytes arising from the in situ reprogramming of CCR2+ monocytes at a site of sterile injury." J Exp Med **212**(4): 447-456.

Dallinga-Thie, G. M., R. Franssen, H. L. Mooij, M. E. Visser, H. C. Hassing, F. Peelman, J. J. Kastelein, M. Peterfy and M. Nieuwdorp (2010). "The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight." Atherosclerosis **211**(1): 1-8.

Davies, M. J., N. Woolf and W. B. Robertson (1976). "Pathology of acute myocardial infarction with particular reference to occlusive coronary thrombi." Br Heart J **38**(7): 659-664.

Davignon, J. and P. Ganz (2004). "Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis." Circulation **109**(23 Suppl 1): III27-32.

De Gennaro Colonna, V., G. Rossoni, M. Bernareggi, E. E. Muller and F. Berti (1997). "Hexarelin, a growth hormone-releasing peptide, discloses protectant activity against cardiovascular damage in rats with isolated growth hormone deficiency." Cardiologia **42**(11): 1165-1172.

De Paoli, F., B. Staels and G. Chinetti-Gbaguidi (2014). "Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis." Circ J **78**(8): 1775-1781.

Deghenghi, R., M. M. Cananzi, A. Torsello, C. Battisti, E. E. Muller and V. Locatelli (1994). "GH-releasing activity of Hexarelin, a new growth hormone releasing peptide, in infant and adult rats." Life Sci **54**(18): 1321-1328.

Demers, A., N. McNicoll, M. Febbraio, M. Servant, S. Marleau, R. Silverstein and H. Ong (2004). "Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study." Biochem J **382**(Pt 2): 417-424.

Deshmane, S. L., S. Kremlev, S. Amini and B. E. Sawaya (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." J Interferon Cytokine Res **29**(6): 313-326.

Doens, D. and P. L. Fernandez (2014). "Microglia receptors and their implications in the response to amyloid beta for Alzheimer's disease pathogenesis." J Neuroinflammation **11**: 48.

Dong, Z. M., S. M. Chapman, A. A. Brown, P. S. Frenette, R. O. Hynes and D. D. Wagner (1998). "The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis." J Clin Invest **102**(1): 145-152.

Ehara, N., K. Ono, T. Morimoto, T. Kawamura, M. Abe and K. Hasegawa (2004). "The possible role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in heart failure." Exp Clin Cardiol **9**(3): 169-173.

Elliott, M. R., K. M. Koster and P. S. Murphy (2017). "Efferocytosis Signaling in the Regulation of Macrophage Inflammatory Responses." J Immunol **198**(4): 1387-1394.

Endo, A. (2010). "A historical perspective on the discovery of statins." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **86**(5): 484-493.

Etzerodt, A., M. Kjolby, M. J. Nielsen, M. Maniecki, P. Svendsen and S. K. Moestrup (2013). "Plasma clearance of hemoglobin and haptoglobin in mice and effect of CD163 gene targeting disruption." Antioxid Redox Signal **18**(17): 2254-2263.

Febbraio, M., D. P. Hajjar and R. L. Silverstein (2001). "CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism." J Clin Invest **108**(6): 785-791.

Febbraio, M., E. A. Podrez, J. D. Smith, D. P. Hajjar, S. L. Hazen, H. F. Hoff, K. Sharma and R. L. Silverstein (2000). "Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice." J Clin Invest **105**(8): 1049-1056.

Feingold, K. R. and C. Grunfeld (2000). Introduction to Lipids and Lipoproteins. Endotext. K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce et al. South Dartmouth (MA).

Feng, J., J. Han, S. F. Pearce, R. L. Silverstein, A. M. Gotto, Jr., D. P. Hajjar and A. C. Nicholson (2000). "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 **41**(5): 688-696.

Feng, W., G. Chen, D. Cai, S. Zhao, J. Cheng and H. Shen (2017). "Inflammatory Bowel Disease and Risk of Ischemic Heart Disease: An Updated Meta-Analysis of Cohort Studies." J Am Heart Assoc **6**(8).

Fernandez, G., E. S. Spatz, C. Jablecki and P. S. Phillips (2011). "Statin myopathy: a common dilemma not reflected in clinical trials." Cleve Clin J Med **78**(6): 393-403.

Ferro, J. M. (2003). "Cardioembolic stroke: an update." Lancet Neurol **2**(3): 177-188.

Fichtlscherer, S., G. Rosenberger, D. H. Walter, S. Breuer, S. Dimmeler and A. M. Zeiher (2000). "Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease." Circulation **102**(9): 1000-1006.

Fitchett, D. H., R. A. Hegele and S. Verma (2015). "Cardiology patient page. Statin intolerance." Circulation **131**(13): e389-391.

Fogg, D. K., C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D. R. Littman, A. Cumano and F. Geissmann (2006). "A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells." Science **311**(5757): 83-87.

Frascarelli, S., S. Ghelardoni, S. Ronca-Testoni and R. Zucchi (2003). "Effect of ghrelin and synthetic growth hormone secretagogues in normal and ischemic rat heart." Basic Res Cardiol **98**(6): 401-405.

Furie, B. and B. C. Furie (2008). "Mechanisms of thrombus formation." N Engl J Med **359**(9): 938-949.

Galis, Z. S., M. Muszynski, G. K. Sukhova, E. Simon-Morrissey and P. Libby (1995). "Enhanced expression of vascular matrix metalloproteinases induced in vitro by cytokines and in regions of human atherosclerotic lesions." Ann N Y Acad Sci **748**: 501-507.

Galis, Z. S., G. K. Sukhova, M. W. Lark and P. Libby (1994). "Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques." J Clin Invest **94**(6): 2493-2503.

Galkina, E. and K. Ley (2009). "Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (\*)." Annu Rev Immunol **27**: 165-197.

Garcia-Bonilla, L., L. Park and C. Iadecola (2014). "Commentary on Myers et al.: growing role of the innate immunity receptor CD36 in central nervous system diseases." Exp Neurol **261**: 633-637.

Geissmann, F., S. Jung and D. R. Littman (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity **19**(1): 71-82.

Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad and K. Ley (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.

Gelman, S. (2008). "Venous function and central venous pressure: a physiologic story." Anesthesiology **108**(4): 735-748.

Geraldes, P. and G. L. King (2010). "Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications." Circ Res **106**(8): 1319-1331.



Gerhard, G. T. and P. B. Duell (1999). "Homocysteine and atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **10**(5): 417-428.

Getz, G. S. and C. A. Reardon (2006). "Diet and murine atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(2): 242-249.

Getz, G. S. and C. A. Reardon (2016). "Do the Apoe<sup>-/-</sup> and Ldlr<sup>-/-</sup> Mice Yield the Same Insight on Atherogenesis?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **36**(9): 1734-1741.

Gimbrone, M. A., Jr. (1999). "Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis." Am J Pathol **155**(1): 1-5.

Glatz, J. F. and J. J. Luiken (2017). "From fat to FAT (CD36/SR-B2): Understanding the regulation of cellular fatty acid uptake." Biochimie **136**: 21-26.

Glatz, J. F. C. and J. Luiken (2018). "Dynamic role of the transmembrane glycoprotein CD36 (SR-B2) in cellular fatty acid uptake and utilization." J Lipid Res **59**(7): 1084-1093.

Goldberg, R. B. and T. A. Jacobson (2008). "Effects of niacin on glucose control in patients with dyslipidemia." Mayo Clin Proc **83**(4): 470-478.

Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol **3**(1): 23-35.

Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.

GouvernementduCanada. (2010). "Rapport personnalisé du fardeau économique de la maladie au Canada." 2019, from [https://cost-illness.canada.ca/custom-personnalise/results-national-resultats.php?report\\_type=cpi&lang=fra](https://cost-illness.canada.ca/custom-personnalise/results-national-resultats.php?report_type=cpi&lang=fra).

GouvernementduCanada. (2012). "Les maladies du coeur au Canada." Agence de la santé publique du Canada, from <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/publications/maladies-et-affections/maladies-coeur-canada.html>.

Goyal, T., S. Mitra, M. Khaidakov, X. Wang, S. Singla, Z. Ding, S. Liu and J. L. Mehta (2012). "Current Concepts of the Role of Oxidized LDL Receptors in Atherosclerosis." Curr Atheroscler Rep.

Grainger, D. J., P. R. Kemp, A. C. Liu, R. M. Lawn and J. C. Metcalfe (1994). "Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice." Nature **370**(6489): 460-462.

Greenwood, J., L. Steinman and S. S. Zamvil (2006). "Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation." Nat Rev Immunol **6**(5): 358-370.

Grundy, S. M. and K. R. Feingold (2000). Guidelines for the Management of High Blood Cholesterol. Endotext. K. R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce et al. South Dartmouth (MA).

Grundy, S. M. and N. J. Stone (2019). "2018 American Heart Association/American College of Cardiology/Multisociety Guideline on the Management of Blood Cholesterol-Secondary Prevention." JAMA Cardiol **4**(6): 589-591.

Gu, L., Y. Okada, S. K. Clinton, C. Gerard, G. K. Sukhova, P. Libby and B. J. Rollins (1998). "Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice." Mol Cell **2**(2): 275-281.

Gupta, S., A. M. Pablo, X. Jiang, N. Wang, A. R. Tall and C. Schindler (1997). "IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice." J Clin Invest **99**(11): 2752-2761.

Haghighat, A., D. Weiss, M. K. Whalin, D. P. Cowan and W. R. Taylor (2007). "Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor exacerbate atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." Circulation **115**(15): 2049-2054.

Hansson, G. K. and P. Libby (2006). "The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword." Nat Rev Immunol **6**(7): 508-519.

Hao, J. W., J. Wang, H. Guo, Y. Y. Zhao, H. H. Sun, Y. F. Li, X. Y. Lai, N. Zhao, X. Wang, C. Xie, L. Hong, X. Huang, H. R. Wang, C. B. Li, B. Liang, S. Chen and T. J. Zhao (2020). "CD36 facilitates fatty acid uptake by dynamic palmitoylation-regulated endocytosis." Nat Commun **11**(1): 4765.

Harb, D., K. Bujold, M. Febbraio, M. G. Sirois, H. Ong and S. Marleau (2009). "The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation." Cardiovasc Res **83**(1): 42-51.

Heartandstroke (2020). "Risk and prevention."

Heit, B., H. Kim, G. Cosio, D. Castano, R. Collins, C. A. Lowell, K. C. Kain, W. S. Trimble and S. Grinstein (2013). "Multimolecular signaling complexes enable Syk-mediated signaling of CD36 internalization." Dev Cell **24**(4): 372-383.

Helming, L., J. Winter and S. Gordon (2009). "The scavenger receptor CD36 plays a role in cytokine-induced macrophage fusion." J Cell Sci **122**(Pt 4): 453-459.

Hirano, K., T. Kuwasako, Y. Nakagawa-Toyama, M. Janabi, S. Yamashita and Y. Matsuzawa (2003). "Pathophysiology of human genetic CD36 deficiency." Trends Cardiovasc Med **13**(4): 136-141.

Hochreiter-Hufford, A. and K. S. Ravichandran (2013). "Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion." Cold Spring Harb Perspect Biol **5**(1): a008748.

Horton, J. D., H. Shimano, R. L. Hamilton, M. S. Brown and J. L. Goldstein (1999). "Disruption of LDL receptor gene in transgenic SREBP-1a mice unmasks hyperlipidemia resulting from production of lipid-rich VLDL." J Clin Invest **103**(7): 1067-1076.

Howard, A. D., S. D. Feighner, D. F. Cully, J. P. Arena, P. A. Liberators, C. I. Rosenblum, M. Hamelin, D. L. Hreniuk, O. C. Palyha, J. Anderson, P. S. Paress, C. Diaz, M. Chou, K. K. Liu, K. K. McKee, S. S. Pong, L. Y. Chung, A. Elbrecht, M. Dashkevich, R. Heavens, M. Rigby, D. J.

Sirinathsinghji, D. C. Dean, D. G. Melillo, A. A. Patchett, R. Nargund, P. R. Griffin, J. A. DeMartino, S. K. Gupta, J. M. Schaeffer, R. G. Smith and L. H. Van der Ploeg (1996). "A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release." Science **273**(5277): 974-977.

Huang, Y. and R. W. Mahley (2014). "Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases." Neurobiol Dis **72 Pt A**: 3-12.

Hughes, J., T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan and H. R. Morris (1975). "Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity." Nature **258**(5536): 577-580.

Husain, K., W. Hernandez, R. A. Ansari and L. Ferder (2015). "Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis." World J Biol Chem **6**(3): 209-217.

Huszar, D., M. L. Varban, F. Rinninger, R. Feeley, T. Arai, V. Fairchild-Huntress, M. J. Donovan and A. R. Tall (2000). "Increased LDL cholesterol and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice with attenuated expression of scavenger receptor B1." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(4): 1068-1073.

Huynh, D. N., V. L. Bessi, L. Menard, J. Piquereau, C. Proulx, M. Febbraio, W. D. Lubell, A. C. Carpentier, Y. Burelle, H. Ong and S. Marleau (2018). "Adiponectin has a pivotal role in the cardioprotective effect of CP-3(iv), a selective CD36 azapeptide ligand, after transient coronary artery occlusion in mice." FASEB J **32**(2): 807-818.

Ingersoll, M. A., R. Spanbroek, C. Lottaz, E. L. Gautier, M. Frankenberger, R. Hoffmann, R. Lang, M. Haniffa, M. Collin, F. Tacke, A. J. Habenicht, L. Ziegler-Heitbrock and G. J. Randolph (2010). "Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets." Blood **115**(3): e10-19.

Istvan, E. S. and J. Deisenhofer (2001). "Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase." Science **292**(5519): 1160-1164.

Itabe, H., T. Obama and R. Kato (2011). "The Dynamics of Oxidized LDL during Atherogenesis." J Lipids **2011**: 418313.

Jackevicius, C. A., M. M. Chou, J. S. Ross, N. D. Shah and H. M. Krumholz (2012). "Generic atorvastatin and health care costs." N Engl J Med **366**(3): 201-204.

Jakubzick, C. V., G. J. Randolph and P. M. Henson (2017). "Monocyte differentiation and antigen-presenting functions." Nat Rev Immunol **17**(6): 349-362.

Jeney, V., G. Balla and J. Balla (2014). "Red blood cell, hemoglobin and heme in the progression of atherosclerosis." Front Physiol **5**: 379.

Ji, A., J. M. Wroblewski, L. Cai, M. C. de Beer, N. R. Webb and D. R. van der Westhuyzen (2012). "Nascent HDL formation in hepatocytes and role of ABCA1, ABCG1, and SR-BI." J Lipid Res **53**(3): 446-455.

Jimenez, B., O. V. Volpert, S. E. Crawford, M. Febbraio, R. L. Silverstein and N. Bouck (2000). "Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1." Nat Med **6**(1): 41-48.

Jordan, R. E., P. Adab and K. K. Cheng (2020). "Covid-19: risk factors for severe disease and death." BMJ **368**: m1198.

Kannel, W. B., T. Gordon and M. J. Schwartz (1971). "Systolic versus diastolic blood pressure and risk of coronary heart disease. The Framingham study." Am J Cardiol **27**(4): 335-346.

Karlmark, K. R., R. Weiskirchen, H. W. Zimmermann, N. Gassler, F. Ginhoux, C. Weber, M. Merad, T. Luedde, C. Trautwein and F. Tacke (2009). "Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis." Hepatology **50**(1): 261-274.

Kashiwagi, H., Y. Tomiyama, S. Nozaki, T. Kiyoi, S. Tadokoro, K. Matsumoto, S. Honda, S. Kosugi, Y. Kurata and Y. Matsuzawa (2001). "Analyses of genetic abnormalities in type I CD36 deficiency in Japan: identification and cell biological characterization of two novel mutations that cause CD36 deficiency in man." Hum Genet **108**(6): 459-466.

Kattoor, A. J., N. V. K. Pothineni, D. Palagiri and J. L. Mehta (2017). "Oxidative Stress in Atherosclerosis." Curr Atheroscler Rep **19**(11): 42.

Kelley, N., D. Jeltema, Y. Duan and Y. He (2019). "The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation." Int J Mol Sci **20**(13).

King, V. L., S. J. Szilvassy and A. Daugherty (2002). "Interleukin-4 deficiency decreases atherosclerotic lesion formation in a site-specific manner in female LDL receptor<sup>-/-</sup> mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(3): 456-461.

Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo and K. Kangawa (1999). "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." Nature **402**(6762): 656-660.

Kojima, M., H. Hosoda, H. Matsuo and K. Kangawa (2001). "Ghrelin: discovery of the natural endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor." Trends Endocrinol Metab **12**(3): 118-122.

Kojima, M. and K. Kangawa (2005). "Ghrelin: structure and function." Physiol Rev **85**(2): 495-522.

Koltsova, E. K., C. C. Hedrick and K. Ley (2013). "Myeloid cells in atherosclerosis: a delicate balance of anti-inflammatory and proinflammatory mechanisms." Curr Opin Lipidol **24**(5): 371-380.

Korns, D., S. C. Frasch, R. Fernandez-Boyanapalli, P. M. Henson and D. L. Bratton (2011). "Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation." Front Immunol **2**: 57.

Kocsso, B., B. Csoka, E. Kokai, Z. H. Nemeth, P. Pacher, L. Virag, S. J. Leibovich and G. Hasko (2013). "Adenosine augments IL-10-induced STAT3 signaling in M2c macrophages." J Leukoc Biol **94**(6): 1309-1315.

Kourtzelis, I., G. Hajishengallis and T. Chavakis (2020). "Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation." Front Immunol **11**: 553.

Kratofil, R. M., P. Kubes and J. F. Deniset (2017). "Monocyte Conversion During Inflammation and Injury." Arterioscler Thromb Vasc Biol **37**(1): 35-42.

Kuchibhotla, S., D. Vanegas, D. J. Kennedy, E. Guy, G. Nimako, R. E. Morton and M. Febbraio (2008). "Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II." Cardiovasc Res **78**(1): 185-196.

Kullo, I. J., W. D. Edwards and R. S. Schwartz (1998). "Vulnerable plaque: pathobiology and clinical implications." Ann Intern Med **129**(12): 1050-1060.

Kzhyshkowska, J., C. Neyen and S. Gordon (2012). "Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis." Immunobiology **217**(5): 492-502.

Lee, T. C., M. Kaouache and S. A. Grover (2018). "Evaluation of the cost-effectiveness of evolocumab in the FOURIER study: a Canadian analysis." CMAJ Open **6**(2): E162-E167.

Lee, T. S., H. C. Yen, C. C. Pan and L. Y. Chau (1999). "The role of interleukin 12 in the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(3): 734-742.

Lemke, G. and T. Burstyn-Cohen (2010). "TAM receptors and the clearance of apoptotic cells." Ann N Y Acad Sci **1209**: 23-29.

Li, A. C. and C. K. Glass (2002). "The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention." Nat Med **8**(11): 1235-1242.

- Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-874.
- Libby, P., P. M. Ridker and G. K. Hansson (2011). "Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis." Nature **473**(7347): 317-325.
- Liu, Y. C., X. B. Zou, Y. F. Chai and Y. M. Yao (2014). "Macrophage polarization in inflammatory diseases." Int J Biol Sci **10**(5): 520-529.
- Locatelli, V., G. Rossoni, F. Schweiger, A. Torsello, V. De Gennaro Colonna, M. Bernareggi, R. Deghenghi, E. E. Muller and F. Berti (1999). "Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat." Endocrinology **140**(9): 4024-4031.
- Lougheed, M., C. M. Lum, W. Ling, H. Suzuki, T. Kodama and U. Steinbrecher (1997). "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 **272**(20): 12938-12944.
- Luan, Z., A. J. Chase and A. C. Newby (2003). "Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(5): 769-775.
- Luiken, J. J., D. Chanda, M. Nabben, D. Neumann and J. F. Glatz (2016). "Post-translational modifications of CD36 (SR-B2): Implications for regulation of myocellular fatty acid uptake." Biochim Biophys Acta **1862**(12): 2253-2258.
- Luo, D. X., D. L. Cao, Y. Xiong, X. H. Peng and D. F. Liao (2010). "A novel model of cholesterol efflux from lipid-loaded cells." Acta Pharmacol Sin **31**(10): 1243-1257.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-241.
- Mahdavian Delavary, B., W. M. van der Veer, M. van Egmond, F. B. Niessen and R. H. Beelen (2011). "Macrophages in skin injury and repair." Immunobiology **216**(7): 753-762.



Mallat, Z., S. Besnard, M. Duriez, V. Deleuze, F. Emmanuel, M. F. Bureau, F. Soubrier, B. Esposito, H. Duez, C. Fievet, B. Staels, N. Duverger, D. Scherman and A. Tedgui (1999). "Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis." Circ Res **85**(8): e17-24.

Marengo-Rowe, A. J. (2006). "Structure-function relations of human hemoglobins." Proc (Bayl Univ Med Cent) **19**(3): 239-245.

Marleau, S., D. Harb, K. Bujold, R. Avallone, K. Iken, Y. Wang, A. Demers, M. G. Sirois, M. Febbraio, R. L. Silverstein, A. Tremblay and H. Ong (2005). "EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions." FASEB J **19**(13): 1869-1871.

Maron, B. J., J. A. Towbin, G. Thiene, C. Antzelevitch, D. Corrado, D. Arnett, A. J. Moss, C. E. Seidman, J. B. Young, A. American Heart, H. F. Council on Clinical Cardiology, C. Transplantation, C. Quality of, R. Outcomes, G. Functional, G. Translational Biology Interdisciplinary Working, E. Council on and Prevention (2006). "Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention." Circulation **113**(14): 1807-1816.

Martinez, F. O. and S. Gordon (2014). "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment." F1000Prime Rep **6**: 13.

McGill, H. C., Jr., C. A. McMahan, E. E. Herderick, G. T. Malcom, R. E. Tracy and J. P. Strong (2000). "Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence." Am J Clin Nutr **72**(5 Suppl): 1307S-1315S.

McGirr, R., M. S. McFarland, J. McTavish, L. G. Luyt and S. Dhanvantari (2011). "Design and characterization of a fluorescent ghrelin analog for imaging the growth hormone secretagogue receptor 1a." Regul Pept **172**(1-3): 69-76.

McKenney, J. M. (2015). "Understanding PCSK9 and anti-PCSK9 therapies." J Clin Lipidol **9**(2): 170-186.

Medbury, H. J., H. Williams and J. P. Fletcher (2014). "Clinical significance of macrophage phenotypes in cardiovascular disease." Clin Transl Med **3**(1): 63.

Mellal, K., S. Omri, M. Mulumba, H. Tahiri, C. Fortin, M. F. Dorion, H. Pham, Y. Garcia Ramos, J. Zhang, S. Pundir, J. S. Joyal, J. F. Bouchard, F. Sennlaub, M. Febbraio, P. Hardy, S. P. Gravel, S. Marleau, W. D. Lubell, S. Chemtob and H. Ong (2019). "Immunometabolic modulation of retinal inflammation by CD36 ligand." Sci Rep **9**(1): 12903.

Michalik, L., B. Desvergne and W. Wahli (2004). "Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories." Nat Rev Cancer **4**(1): 61-70.

Miller, Y. I., S. H. Choi, P. Wiesner, L. Fang, R. Harkewicz, K. Hartvigsen, A. Boullier, A. Gonen, C. J. Diehl, X. Que, E. Montano, P. X. Shaw, S. Tsimikas, C. J. Binder and J. L. Witztum (2011). "Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity." Circ Res **108**(2): 235-248.

Momany, F. A., C. Y. Bowers, G. A. Reynolds, A. Hong and K. Newlander (1984). "Conformational energy studies and in vitro and in vivo activity data on growth hormone-releasing peptides." Endocrinology **114**(5): 1531-1536.

Moore, K. J. and M. W. Freeman (2006). "Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(8): 1702-1711.

Moore, K. J., F. J. Sheedy and E. A. Fisher (2013). "Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance." Nat Rev Immunol **13**(10): 709-721.

Moreno, P. R. and V. Fuster (2004). "The year in atherothrombosis." J Am Coll Cardiol **44**(11): 2099-2110.

Morrone, D., W. S. Weintraub, P. P. Toth, M. E. Hanson, R. S. Lowe, J. Lin, A. K. Shah and A. M. Tershakovec (2012). "Lipid-altering efficacy of ezetimibe plus statin and statin monotherapy and identification of factors associated with treatment response: a pooled analysis of over 21,000 subjects from 27 clinical trials." Atherosclerosis **223**(2): 251-261.

Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." J Leukoc Biol **73**(2): 209-212.

Mosser, D. M. and J. P. Edwards (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." Nat Rev Immunol **8**(12): 958-969.

Mukherjee, S., S. Karmakar and S. P. Babu (2016). "TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review." Braz J Infect Dis **20**(2): 193-204.

Mulder, M., P. Lombardi, H. Jansen, T. J. van Berkel, R. R. Frants and L. M. Havekes (1993). "Low density lipoprotein receptor internalizes low density and very low density lipoproteins that are bound to heparan sulfate proteoglycans via lipoprotein lipase." J Biol Chem **268**(13): 9369-9375.

Munder, M., K. Eichmann and M. Modolell (1998). "Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype." J Immunol **160**(11): 5347-5354.

Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." Nat Rev Immunol **11**(11): 723-737.

Naeini, M. B., V. Bianconi, M. Pirro and A. Sahebkar (2020). "The role of phosphatidylserine recognition receptors in multiple biological functions." Cell Mol Biol Lett **25**: 23.

Nagel, T., N. Resnick, C. F. Dewey, Jr. and M. A. Gimbrone, Jr. (1999). "Vascular endothelial cells respond to spatial gradients in fluid shear stress by enhanced activation of transcription factors." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(8): 1825-1834.

Nagenborg, J., P. Goossens, E. A. L. Biessen and M. Donners (2017). "Heterogeneity of atherosclerotic plaque macrophage origin, phenotype and functions: Implications for treatment." Eur J Pharmacol **816**: 14-24.

Nagy, L., P. Tontonoz, J. G. Alvarez, H. Chen and R. M. Evans (1998). "Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma." Cell **93**(2): 229-240.

Nakashima, Y., A. S. Plump, E. W. Raines, J. L. Breslow and R. Ross (1994). "ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree." Arterioscler Thromb **14**(1): 133-140.

Nathan, L. and G. Chaudhuri (1997). "Estrogens and atherosclerosis." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 477-515.

Nerenberg, K. A., K. B. Zarnke, A. A. Leung, K. Dasgupta, S. Butalia, K. McBrien, K. C. Harris, M. Nakhla, L. Cloutier, M. Gelfer, M. Lamarre-Cliche, A. Milot, P. Bolli, G. Tremblay, D. McLean, R. S. Padwal, K. C. Tran, S. Grover, S. W. Rabkin, G. W. Moe, J. G. Howlett, P. Lindsay, M. D. Hill, M. Sharma, T. Field, T. H. Wein, A. Shoamanesh, G. K. Dresser, P. Hamet, R. J. Herman, E. Burgess, S. E. Gryn, J. C. Gregoire, R. Lewanczuk, L. Poirier, T. S. Campbell, R. D. Feldman, K. L. Lavoie, R. T. Tsuyuki, G. Honos, A. P. H. Prebtani, G. Kline, E. L. Schiffrin, A. Don-Wauchope, S. W. Tobe, R. E. Gilbert, L. A. Leiter, C. Jones, V. Woo, R. A. Hegele, P. Selby, A. Pipe, P. A. McFarlane, P. Oh, M. Gupta, S. L. Bacon, J. Kaczorowski, L. Trudeau, N. R. C. Campbell, S. Hiremath, M. Roerecke, J. Arcand, M. Ruzicka, G. V. R. Prasad, M. Vallee, C. Edwards, P. Sivapalan, S. B. Penner, A. Fournier, G. Benoit, J. Feber, J. Dionne, L. A. Magee, A. G. Logan, A. M. Cote, E. Rey, T. Firoz, L. M. Kuyper, J. Y. Gabor, R. R. Townsend, D. M. Rabi,

S. S. Daskalopoulou and C. Hypertension (2018). "Hypertension Canada's 2018 Guidelines for Diagnosis, Risk Assessment, Prevention, and Treatment of Hypertension in Adults and Children." Can J Cardiol **34**(5): 506-525.

Nergiz-Unal, R., T. Rademakers, J. M. Cosemans and J. W. Heemskerk (2011). "CD36 as a multiple-ligand signaling receptor in atherothrombosis." Cardiovasc Hematol Agents Med Chem **9**(1): 42-55.

Newby, A. C., S. J. George, Y. Ismail, J. L. Johnson, G. B. Sala-Newby and A. C. Thomas (2009). "Vulnerable atherosclerotic plaque metalloproteinases and foam cell phenotypes." Thromb Haemost **101**(6): 1006-1011.

Newby, A. C. and A. B. Zaltsman (1999). "Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation." Cardiovasc Res **41**(2): 345-360.

Nozaki, S., H. Kashiwagi, S. Yamashita, T. Nakagawa, B. Kostner, Y. Tomiyama, A. Nakata, M. Ishigami, J. Miyagawa, K. Kameda-Takemura and et al. (1995). "Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects." J Clin Invest **96**(4): 1859-1865.

Ogedegbe, H. O. and D. W. Brown (2001). "Lipids, Lipoproteins, and Apolipoproteins and Their Disease Associations." Laboratory Medicine **32**(7): 384-389.

Ohashi, T. and M. Sato (2005). "Remodeling of vascular endothelial cells exposed to fluid shear stress: experimental and numerical approach." Fluid Dynamics Research **37**(1-2): 40-59.

Orbe, J., L. Fernandez, J. A. Rodriguez, G. Rabago, M. Belzunce, A. Monasterio, C. Roncal and J. A. Paramo (2003). "Different expression of MMPs/TIMP-1 in human atherosclerotic lesions. Relation to plaque features and vascular bed." Atherosclerosis **170**(2): 269-276.

Orso, E. and G. Schmitz (2017). "Lipoprotein(a) and its role in inflammation, atherosclerosis and malignancies." Clin Res Cardiol Suppl **12**(Suppl 1): 31-37.

Parham, P. and C. Janeway (2015). The immune system. New York, NY, Garland Science, Taylor & Francis Group.

Park, Y. M. (2014). "CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis." Exp Mol Med **46**: e99.

Passlick, B., D. Flieger and H. W. Ziegler-Heitbrock (1989). "Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood." Blood **74**(7): 2527-2534.

Peled, M. and E. A. Fisher (2014). "Dynamic Aspects of Macrophage Polarization during Atherosclerosis Progression and Regression." Front Immunol **5**: 579.

Pluddemann, A., C. Neyen and S. Gordon (2007). "Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands." Methods **43**(3): 207-217.

Podrez, E. A., M. Febbraio, N. Sheibani, D. Schmitt, R. L. Silverstein, D. P. Hajjar, P. A. Cohen, W. A. Frazier, H. F. Hoff and S. L. Hazen (2000). "Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species." J Clin Invest **105**(8): 1095-1108.

Proulx, C., E. Picard, D. Boeglin, P. Pohankova, S. Chemtob, H. Ong and W. D. Lubell (2012). "Azapeptide analogues of the growth hormone releasing peptide 6 as cluster of differentiation 36 receptor ligands with reduced affinity for the growth hormone secretagogue receptor 1a." J Med Chem **55**(14): 6502-6511.

Proulx, C., D. Sabatino, R. Hopewell, J. Spiegel, Y. Garcia Ramos and W. D. Lubell (2011). "Azapeptides and their therapeutic potential." Future Med Chem **3**(9): 1139-1164.

Rac, M. E., K. Safranow and W. Poncyłjusz (2007). "Molecular basis of human CD36 gene mutations." Mol Med **13**(5-6): 288-296.

Rader, D. J. and A. Daugherty (2008). "Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis." Nature **451**(7181): 904-913.

Raes, G., W. Noel, A. Beschin, L. Brys, P. de Baetselier and G. H. Hassanzadeh (2002). "FIZZ1 and Ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages." Dev Immunol **9**(3): 151-159.

Rahaman, S. O., D. J. Lennon, M. Febbraio, E. A. Podrez, S. L. Hazen and R. L. Silverstein (2006). "A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation." Cell Metab **4**(3): 211-221.

Rahman, K. and E. A. Fisher (2018). "Insights From Pre-Clinical and Clinical Studies on the Role of Innate Inflammation in Atherosclerosis Regression." Front Cardiovasc Med **5**: 32.

Rajamaki, K., J. Lappalainen, K. Oorni, E. Valimaki, S. Matikainen, P. T. Kovanen and K. K. Eklund (2010). "Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation." PLoS One **5**(7): e11765.

Ravichandran, K. S. (2010). "Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums." J Exp Med **207**(9): 1807-1817.

Reiner, Z. (2014). "Resistance and intolerance to statins." Nutr Metab Cardiovasc Dis **24**(10): 1057-1066.

Ridker, P. M., E. Danielson, F. A. Fonseca, J. Genest, A. M. Gotto, Jr., J. J. Kastelein, W. Koenig, P. Libby, A. J. Lorenzatti, J. G. Macfadyen, B. G. Nordestgaard, J. Shepherd, J. T. Willerson, R. J. Glynn and J. T. S. Group (2009). "Reduction in C-reactive protein and LDL cholesterol and cardiovascular event rates after initiation of rosuvastatin: a prospective study of the JUPITER trial." Lancet **373**(9670): 1175-1182.

Ridker, P. M., N. Rifai, L. Rose, J. E. Buring and N. R. Cook (2002). "Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events." N Engl J Med **347**(20): 1557-1565.

Ridker, P. M., M. J. Stampfer and N. Rifai (2001). "Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease." JAMA **285**(19): 2481-2485.

Rindi, G., V. Necchi, A. Savio, A. Torsello, M. Zoli, V. Locatelli, F. Raimondo, D. Cocchi and E. Solcia (2002). "Characterisation of gastric ghrelin cells in man and other mammals: studies in adult and fetal tissues." Histochem Cell Biol **117**(6): 511-519.

Ritchie H, R. M. (2016). "Causes of Death." Retrieved 6 nov, 2019, from <https://ourworldindata.org/causes-of-death>.

Rohrl, C., K. Eigner, K. Winter, M. Korbilius, S. Obrowsky, D. Kratky, W. J. Kovacs and H. Stangl (2014). "Endoplasmic reticulum stress impairs cholesterol efflux and synthesis in hepatic cells." J Lipid Res **55**(1): 94-103.

Rong, J. X., M. Shapiro, E. Trogan and E. A. Fisher (2003). "Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13531-13536.

Rosales, C. (2018). "Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?" Front Physiol **9**: 113.

Rosenfeld, M. E., P. Polinsky, R. Virmani, K. Kauser, G. Rubanyi and S. M. Schwartz (2000). "Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(12): 2587-2592.

Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.



Ross, R., J. Glomset and L. Harker (1977). "Response to injury and atherogenesis." Am J Pathol **86**(3): 675-684.

Roszer, T. (2015). "Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms." Mediators Inflamm **2015**: 816460.

Sabatino, D., C. Proulx, P. Pohankova, H. Ong and W. D. Lubell (2011). "Structure-activity relationships of GHRP-6 azapeptide ligands of the CD36 scavenger receptor by solid-phase submonomer azapeptide synthesis." J Am Chem Soc **133**(32): 12493-12506.

Sag, D., C. Cekic, R. Wu, J. Linden and C. C. Hedrick (2015). "The cholesterol transporter ABCG1 links cholesterol homeostasis and tumour immunity." Nat Commun **6**: 6354.

Salamat, M. S. (2010). "Robbins and Cotran: Pathologic Basis of Disease, 8th Edition." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **69**(2): 214-214.

Schonbeck, U. and P. Libby (2004). "Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents?" Circulation **109**(21 Suppl 1): II18-26.

Schonbeck, U., G. K. Sukhova, K. Shimizu, F. Mach and P. Libby (2000). "Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(13): 7458-7463.

Schrijvers, D. M., G. R. De Meyer, A. G. Herman and W. Martinet (2007). "Phagocytosis in atherosclerosis: Molecular mechanisms and implications for plaque progression and stability." Cardiovasc Res **73**(3): 470-480.

Schwenk, R. W., J. J. Luiken, A. Bonen and J. F. Glatz (2008). "Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease." Cardiovasc Res **79**(2): 249-258.

Selathurai, A., V. Deswaerte, P. Kanellakis, P. Tipping, B. H. Toh, A. Bobik and T. Kyaw (2014). "Natural killer (NK) cells augment atherosclerosis by cytotoxic-dependent mechanisms." Cardiovasc Res **102**(1): 128-137.

Seneviratne, A. N., B. Sivagurunathan and C. Monaco (2012). "Toll-like receptors and macrophage activation in atherosclerosis." Clin Chim Acta **413**(1-2): 3-14.

Shaw, S. K., P. S. Bamba, B. N. Perkins and F. W. Luscinikas (2001). "Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium." J Immunol **167**(4): 2323-2330.

Sheedy, F. J., A. Grebe, K. J. Rayner, P. Kalantari, B. Ramkhelawon, S. B. Carpenter, C. E. Becker, H. N. Ediriweera, A. E. Mullick, D. T. Golenbock, L. M. Stuart, E. Latz, K. A. Fitzgerald and K. J. Moore (2013). "CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation." Nat Immunol **14**(8): 812-820.

Shih, P. T., M. L. Brennan, D. K. Vora, M. C. Territo, D. Strahl, M. J. Elices, A. J. Lusis and J. A. Berliner (1999). "Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet." Circ Res **84**(3): 345-351.

Silverstein, R. L. (2009). "Type 2 scavenger receptor CD36 in platelet activation: the role of hyperlipemia and oxidative stress." Clin Lipidol **4**(6): 767.

Silverstein, R. L. and M. Febbraio (2000). "CD36 and atherosclerosis." Curr Opin Lipidol **11**(5): 483-491.

Silverstein, R. L. and M. Febbraio (2009). "CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior." Sci Signal **2**(72): re3.

Silverstein, R. L., W. Li, Y. M. Park and S. O. Rahaman (2010). "Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis." Trans Am Clin Climatol Assoc **121**: 206-220.

Sitia, S., L. Tomasoni, F. Atzeni, G. Ambrosio, C. Cordiano, A. Catapano, S. Tramontana, F. Perticone, P. Naccarato, P. Camici, E. Picano, L. Cortigiani, M. Bevilacqua, L. Milazzo, D. Cusi,

C. Barlassina, P. Sarzi-Puttini and M. Turiel (2010). "From endothelial dysfunction to atherosclerosis." Autoimmun Rev **9**(12): 830-834.

Skeoch, S. and I. N. Bruce (2015). "Atherosclerosis in rheumatoid arthritis: is it all about inflammation?" Nat Rev Rheumatol **11**(7): 390-400.

Smith, J. D., E. Trogan, M. Ginsberg, C. Grigaux, J. Tian and M. Miyata (1995). "Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8264-8268.

Soehnlein, O. (2012). "Multiple roles for neutrophils in atherosclerosis." Circ Res **110**(6): 875-888.

Soehnlein, O., L. Lindbom and C. Weber (2009). "Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment." Blood **114**(21): 4613-4623.

Soutar, A. K. and R. P. Naoumova (2007). "Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **4**(4): 214-225.

Spencer, M., A. Yao-Borengasser, R. Unal, N. Rasouli, C. M. Gurley, B. Zhu, C. A. Peterson and P. A. Kern (2010). "Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation." Am J Physiol Endocrinol Metab **299**(6): E1016-1027.

Stancu, C. and A. Sima (2001). "Statins: mechanism of action and effects." J Cell Mol Med **5**(4): 378-387.

Stary, H. C., A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull, Jr., M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner and R. W. Wissler (1995). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Arterioscler Thromb Vasc Biol **15**(9): 1512-1531.

Steinberg, D., S. Parthasarathy, T. E. Carew, J. C. Khoo and J. L. Witztum (1989). "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." N Engl J Med **320**(14): 915-924.

Stewart, C. R., L. M. Stuart, K. Wilkinson, J. M. van Gils, J. Deng, A. Halle, K. J. Rayner, L. Boyer, R. Zhong, W. A. Frazier, A. Lacy-Hulbert, J. El Khoury, D. T. Golenbock and K. J. Moore (2010). "CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer." Nat Immunol **11**(2): 155-161.

Stoger, J. L., M. J. Gijbels, S. van der Velden, M. Manca, C. M. van der Loos, E. A. Biessen, M. J. Daemen, E. Lutgens and M. P. de Winther (2012). "Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis." Atherosclerosis **225**(2): 461-468.

Summers, C., S. M. Rankin, A. M. Condliffe, N. Singh, A. M. Peters and E. R. Chilvers (2010). "Neutrophil kinetics in health and disease." Trends Immunol **31**(8): 318-324.

Swirski, F. K., M. Nahrendorf, M. Etzrodt, M. Wildgruber, V. Cortez-Retamozo, P. Panizzi, J. L. Figueiredo, R. H. Kohler, A. Chudnovskiy, P. Waterman, E. Aikawa, T. R. Mempel, P. Libby, R. Weissleder and M. J. Pittet (2009). "Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites." Science **325**(5940): 612-616.

Tabas, I. and K. E. Bornfeldt (2016). "Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis." Circ Res **118**(4): 653-667.

Tabas, I. and A. H. Lichtman (2017). "Monocyte-Macrophages and T Cells in Atherosclerosis." Immunity **47**(4): 621-634.

Tacke, F., D. Alvarez, T. J. Kaplan, C. Jakubzick, R. Spanbroek, J. Llodra, A. Garin, J. Liu, M. Mack, N. van Rooijen, S. A. Lira, A. J. Habenicht and G. J. Randolph (2007). "Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques." J Clin Invest **117**(1): 185-194.

Tall, A. R. and L. Yvan-Charvet (2015). "Cholesterol, inflammation and innate immunity." Nat Rev Immunol **15**(2): 104-116.

Tenenbaum, A. and E. Z. Fisman (2012). "Fibrates are an essential part of modern anti-dyslipidemic arsenal: spotlight on atherogenic dyslipidemia and residual risk reduction." Cardiovasc Diabetol **11**: 125.

Thorp, E. and I. Tabas (2009). "Mechanisms and consequences of efferocytosis in advanced atherosclerosis." J Leukoc Biol **86**(5): 1089-1095.

Torocsik, D., A. Szanto and L. Nagy (2009). "Oxysterol signaling links cholesterol metabolism and inflammation via the liver X receptor in macrophages." Mol Aspects Med **30**(3): 134-152.

Tran, Y. B., T. Frial and P. S. Miller (2007). "Statin's cost-effectiveness: a Canadian analysis of commonly prescribed generic and brand name statins." Can J Clin Pharmacol **14**(2): e205-214.

Van den Bossche, J., J. Baardman and M. P. de Winther (2015). "Metabolic Characterization of Polarized M1 and M2 Bone Marrow-derived Macrophages Using Real-time Extracellular Flux Analysis." J Vis Exp(105).

Vanlangenakker, N., T. Vanden Berghe and P. Vandenabeele (2012). "Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview." Cell Death Differ **19**(1): 75-86.

Vats, D., L. Mukundan, J. I. Odegaard, L. Zhang, K. L. Smith, C. R. Morel, R. A. Wagner, D. R. Greaves, P. J. Murray and A. Chawla (2006). "Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation." Cell Metab **4**(1): 13-24.

Vergadi, E., E. Ieronymaki, K. Lyroni, K. Vaporidi and C. Tsatsanis (2017). "Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization." J Immunol **198**(3): 1006-1014.

Vijayan, V., F. Wagener and S. Immenschuh (2018). "The macrophage heme-heme oxygenase-1 system and its role in inflammation." Biochem Pharmacol **153**: 159-167.

Virchow, R. (1856). "Phlogose und Thrombose im Gefassystem." Gesammelte Abhandlungen Zur Wissenschaftlichen Medizin. Frankfurt-am-Main: Von Meidinger Sohn & Comp: 458-521.

Watanabe, K., Y. Ohta, K. Toba, Y. Ogawa, H. Hanawa, Y. Hirokawa, M. Kodama, N. Tanabe, S. Hirono, Y. Ohkura, Y. Nakamura, K. Kato, Y. Aizawa, I. Fuse, S. Miyajima, Y. Kusano, T. Nagamoto, G. Hasegawa and M. Naito (1998). "Myocardial CD36 expression and fatty acid accumulation in patients with type I and II CD36 deficiency." Ann Nucl Med **12**(5): 261-266.

Weber, C. and H. Noels (2011). "Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options." Nat Med **17**(11): 1410-1422.

Wexler, R. K., T. Elton, A. Pleister and D. Feldman (2009). "Cardiomyopathy: an overview." Am Fam Physician **79**(9): 778-784.

Willemsen, L. and M. P. de Winther (2020). "Macrophage subsets in atherosclerosis as defined by single-cell technologies." J Pathol **250**(5): 705-714.

Witztum, J. L. and A. H. Lichtman (2014). "The influence of innate and adaptive immune responses on atherosclerosis." Annu Rev Pathol **9**: 73-102.

Wong, K. L., J. J. Tai, W. C. Wong, H. Han, X. Sem, W. H. Yeap, P. Kourilsky and S. C. Wong (2011). "Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets." Blood **118**(5): e16-31.

Yancey, P. G., J. Blakemore, L. Ding, D. Fan, C. D. Overton, Y. Zhang, M. F. Linton and S. Fazio (2010). "Macrophage LRP-1 controls plaque cellularity by regulating efferocytosis and Akt activation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(4): 787-795.

Yang, J., Y. Zheng, X. Gou, K. Pu, Z. Chen, Q. Guo, R. Ji, H. Wang, Y. Wang and Y. Zhou (2020). "Prevalence of comorbidities and its effects in patients infected with SARS-CoV-2: a systematic review and meta-analysis." Int J Infect Dis **94**: 91-95.

Yeap, W. H., K. L. Wong, N. Shimasaki, E. C. Teo, J. K. Quek, H. X. Yong, C. P. Diong, A. Bertolotti, Y. C. Linn and S. C. Wong (2016). "CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes." Sci Rep **6**: 34310.

Yona, S., K. W. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guillemins, A. Misharin, D. A. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer and S. Jung (2013). "Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis." Immunity **38**(1): 79-91.

Yvan-Charvet, L., N. Wang and A. R. Tall (2010). "Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 transporters in cholesterol efflux and immune responses." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(2): 139-143.

Zeng, Y., N. Tao, K. N. Chung, J. E. Heuser and D. M. Lublin (2003). "Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1." J Biol Chem **278**(46): 45931-45936.

Zhang, J., C. Proulx, A. Tomberg and W. D. Lubell (2014). "Multicomponent diversity-oriented synthesis of aza-lysine-peptide mimics." Org Lett **16**(1): 298-301.

Zimmer, S., A. Grebe and E. Latz (2015). "Danger signaling in atherosclerosis." Circ Res **116**(2): 323-340.

Zizzo, G., B. A. Hilliard, M. Monestier and P. L. Cohen (2012). "Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction." J Immunol **189**(7): 3508-3520.