

Université de Montréal

Étude des mécanismes impliqués dans l'athéroprotection en réponse à un traitement avec le MPE-298, un azapeptide macrocyclique ligand du CD36/SR-B2, chez les souris déficientes en apolipoprotéines E hypercholestérolémiques

Par Jade Gauvin

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté au comité des Études supérieures et postdoctorales en vue de l'obtention de la maîtrise (M.Sc.) en sciences pharmaceutiques

juin 2023

© Jade Gauvin, 2023

Ce mémoire intitulé

Étude des mécanismes impliqués dans l'athéroprotection en réponse à un traitement avec le MPE-298, un azapeptide macrocyclique ligand du CD36/SR-B2, chez les souris déficientes en apolipoprotéines E hypercholestérolémiques

Présenté par

Jade Gauvin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Rami Al Batran

Président-rapporteur

Sylvie Marleau

Directrice de recherche

David Rhains

Membre du jury

Résumé

L'athérosclérose est une maladie dyslipidémique et inflammatoire chronique, définie par l'accumulation de lipides dans l'intima des artères. Les plaques athérosclérotiques ainsi formées peuvent progresser vers un phénotype stable, mais obstructif du flot sanguin, ou vers un phénotype instable, susceptible à la rupture et donc à l'apparition de thrombose. En conséquence, l'athérosclérose est l'une des causes principales des maladies cardiaques ischémiques, comme l'infarctus du myocarde.

Les macrophages, pour une grande partie différenciés à partir des monocytes accumulés dans l'intima des vaisseaux artériels, internalisent les lipides oxydés présents dans les athéromes, induisant la formation de cellules spumeuses, un des principaux composants des lésions athérosclérotiques. L'un des récepteurs responsables de l'internalisation des lipides oxydés par les macrophages est le récepteur CD36, qui est non seulement un récepteur important dans l'initiation des lésions, mais également dans leur progression et leur résolution. Il s'agit donc d'une cible potentielle intéressante pour le traitement de l'athérosclérose. Dans des études antérieures, nous avons montré le potentiel anti-athérosclérotique de ligands linéaires du CD36 dérivés des peptides sécrétagogues de l'hormone de croissance, puis de leurs dérivés azapeptidiques. Dans cette étude, des souris déficientes en apolipoprotéine E, soumise à une diète riche en lipides et en cholestérol de 4 à 20 semaines de vie, ont été traitées par une injection sous-cutanée quotidienne de NaCl 0,9%, de MPE-003, utilisé ici comme contrôle positif ayant déjà montré un effet anti-athérosclérotique, ou de MPE-298 à une dose de 300 nmol/kg de 12 à 20 semaines de vie, afin d'investiguer le potentiel du MPE-298, un nouvel azapeptide cyclique, dans l'athérosclérose. Le MPE-298 a démontré un effet anti-athérosclérotique, ainsi qu'un effet dans la stabilisation des athéromes.

Mots clés : athérosclérose, CD36, azapeptides, macrophages, stabilité des lésions, nécrose, efférocytose.

Abstract

Atherosclerosis is a chronic dyslipidemia and inflammatory disease, defined by the accumulation of lipids in the intima of arteries. The atherosclerotic plaques then formed can progress either towards a stable but obstructive to the blood flow phenotype, or towards a more unstable phenotype, susceptible to rupture and potentially leading to thrombosis. Because of this, atherosclerosis is one of the principal causes of ischemic cardiovascular diseases, conductive to myocardial infarction.

Macrophages, mostly differentiated from monocytes accumulated in the arteries' intima, can internalize oxidized lipids within atherosclerotic lesions, and transform into foam cells, one of the principal components of atherosclerotic plaque. One of the receptors responsible for the internalization of oxidized lipids by macrophages is the receptor CD36, which is not only important for lesion initiation, but also for progression and resolution. This receptor is a potential target for the treatment of atherosclerosis. In previous studies, we showed the anti-atherosclerotic effect of linear CD36 ligands growth hormone-releasing peptides, and then study the pharmacological effect of their azapeptidic derivatives. In this study, mice deficient in apolipoprotein E, fed a high fat high cholesterol diet from 4 to 20 weeks of age, were treated by daily subcutaneous injection of 0.9% NaCl, MPE-003, used here as a positive control as its anti-atherosclerotic effect has already been shown, or MPE-298 from 12 to 20 weeks of age, to investigate the potential of MPE-298, a cyclic azapeptide, in atherosclerosis. MPE-298 showed an anti-atherosclerotic effect, as well as an effect in stabilization of atheroma.

Key words: atherosclerosis, CD36, azapeptides, macrophages, lesion stability, necrosis, efferocytosis.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	6
Liste des figures	9
Liste des abréviations.....	10
Remerciements.....	16
Chapitre 1 : Introduction.....	17
1.1. Maladies cardiovasculaires	17
1.2. Facteurs de risque des maladies cardiovasculaires	17
1.3. Athérosclérose.....	19
1.3.1. Développement de l'athérosclérose	19
1.3.3. Constituants des lésions	26
1.3.2. Progression de l'athérosclérose.....	37
1.3.4. Mort cellulaire dans l'athérosclérose	41
1.3.5. Composantes de l'athérosclérose	43
1.4. Récepteur CD36/SR-B2.....	47
1.4.1. Structure et rôles du récepteur CD36	47
1.4.2. Récepteur CD36 dans l'athérosclérose	50
1.4.3. Signalisation intracellulaire du récepteur CD36	51
1.4.4. Ligands synthétiques du récepteur CD36	53
1.5. Modèles animaux d'athérosclérose.....	57
1.6. Traitements de l'athérosclérose	62
1.6.1. Statines.....	62
1.6.2. Autres agents hypolipidémiants	66
1.6.3. Inhibiteurs de la protéine convertase subtilisine/kexine de type 9	64

1.6.4. Anti-inflammatoires	66
1.7. Hypothèse de recherche	69
1.8. Objectifs spécifiques.....	70
Chapitre 2 : A cyclic azapeptide ligand of the scavenger receptor CD36/SR-B2 reduces the atherosclerotic lesion progression and enhances plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice.....	71
Abstract.....	72
Introduction.....	73
Methods.....	75
Azapeptides.....	75
Mice	75
Experimental protocol	75
Morphometric analysis of aortic lesions	76
Plasma cholesterol and free fatty acids	77
Cytokines	77
Immunohistochemistry	77
Immunofluorescence.....	78
RT-qPCR analysis.....	79
Statistical analysis	79
Results	80
Azapeptides reduce atherosclerotic lesion progression and cell death.....	80
Azapeptides reduce cell apoptosis and promote plaque stability in brachiocephalic arteries ...	81
MPE-298 reduces biomarkers of plaque instability and systemic inflammation	82
Discussion	83
Data Availability Statement	88
Ethics statement	88
Author Contributions	88
Funding.....	89
Acknowledgments	89
Conflict of Interest	89
Publisher’s note.....	89
Supplementary material.....	90
References.....	90

Figures	97
Supplementary material	104
1 Supplementary Figures and Tables	104
Chapitre 3 : Discussion	112
3.1. Conclusion	123
3.2. Futures perspectives.....	125
Bibliographie.....	126

Liste des figures

Figure 1 – Chimioattractants dans le recrutement des monocytes dans l’athérosclérose.....	21
Figure 2 - Liaison de l’apoB aux GAGs.....	22
Figure 3 - Récepteurs éboueurs séparés par familles.....	23
Figure 4 - Métabolisme du cholestérol dans les macrophages et formation des cellules spumeuses.....	25
Figure 5 - Synthèse du cholestérol.....	29
Figure 6 - Différence entre la mort cellulaire programmée, l’apoptose, et la mort cellulaire non programmée, la nécrose.....	41
Figure 7 - Structure du récepteur CD36.....	48
Figure 8 : Cascade de signalisation inflammatoire induite par la liaison des LDLox au récepteur CD36.....	52
Figure 9. Structures des ligands du récepteur CD36.....	57

Liste des abréviations

5-LO : 5-lipoxygénase

AAV : *Adeno-associated viral vector*, vecteur adénoviral

ACAT : Acyl-CoA : cholestérol acyltransférase

ADP : Adénosine 5'-diphosphate

AP-1 : *Activator protein 1*, protéine activatrice 1

ApoE, A ou B: Apolipoprotéine E, A ou B

ApoER2 : *Apolipoprotein E receptor 2*, récepteur 2 de l'apolipoprotéine E

ATP : Adénosine triphosphate

AVCI : Années de vie corrigées au facteur d'invalidité

BCA : Artère brachiocéphalique

CCL-2, -3 ou -5 : *Chemokine ligand -2, -3 or -5*

CCR2 ou 5 : *Chemokine receptor 2 or 5*

CD- : *Cluster of differentiation*

CREB : *cAMP response element binding protein*, protéine liant l'élément de liaison répondant à l'AMPc

CRP : *C-reactive protein*, protéine C réactive

CXCL 1 ou 16 : *C-X-C Motif Chemokine Ligand 1 ou 16*, chimiokine ligand à motif C-X-C 1 ou

DAMPs : *Damage-associated molecular patterns*, motifs moléculaires associés au dommage

EGF : *Epidermal growth-factor*, facteur de croissance épidermique

GAG : Glycosaminoglycanes

GAS6 : *Growth Arrest Specific 6*, arrêt de croissance spécifique 6

GHRP : *Growth hormone-releasing peptide*, peptide sécrétagogue de l'hormone de croissance

GHS-R1a : *Growth hormone secretagogue receptor 1a*, récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance 1a

GM-CSF : *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages

HDL : *High density lipoprotein*, lipoprotéine de haute densité

HMGB1 : *High mobility group box 1 protein*, protéine de haute mobilité du groupe boîte 1

HMG-CoAR : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase

HODE : *Hydroxyoctadecadienoic acid*, Acide hydroxyoctadécadiénoïque

ICAM-1 : *Intercellular adhesion molecule-1*, molécule d'adhérence intercellulaire de type 1

IFN- γ : Interféron γ

Ig- : Immunoglobuline

IKK : I κ B kinase

IL : Interleukine

IRAK1 : *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*, kinase associée aux récepteurs de l'interleukine-1

JNK : *C-Jun N-terminal kinases*

LDL : *Low-density lipoprotein*, lipoprotéine de faible densité

LDLox : Lipoprotéine de faible densité oxydée

LDLR : Récepteur des LDL

LPC : Lysophosphatidylcholine

LPL : Lipoprotéine lipase

LP-PLA2 : Phospholipase A2 associée aux lipoprotéines

LRP1 : *LDL receptor-related protein 1*, protéine 1 apparente au récepteur des lipoprotéines de basse densité

LXR : *Liver X receptor*, récepteur nucléaire des oxystérols

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*, protéine kinase activée par un mitogène

MCP-1 : *Monocyte chemoattractant protein-1*, protéine chimiotactique 1 des monocytes

M-CSF : *Macrophage colony-stimulating factor*, facteur de stimulation des colonies de macrophages

MerTK : *Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*, récepteur myéloïde épithélial à activité tyrosine kinase

MFG-E8 : *Milk fat globule-EGF factor 8 protein*, lactadhérine

MIP : Protéine inflammatoire macrophagique

MMP : Métalloprotéinase matricielle

MyD88 : *Myeloid differentiation primary response 88*, réponse primaire de différenciation myéloïde 88

NEFA/AGL : *Non-esterified fatty acids*, acides gras non estérifiés

NFκB : *Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells*, facteur nucléaire kappa de chaîne légère-activateur de cellules B activées

NLRP3 : *NLR family pyrin domain containing 3*

NO : *Nitric oxide*, oxyde nitrique

NOS2 : *Nitric oxide synthase*, synthase de l'oxyde nitrique

PAF : *Platelet-activating factor*, facteur d'activation plaquettaire

PAPC : 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

PCSK9 : *Proprotein convertase subtilisin/kexin type-9*, proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9)

PF4 : *Platelet factor 4*, facteur plaquettaire 4

PGE2 : Prostaglandine E2

PGPC : 1-palmitoyl-2-glutaroyl-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

PLA2 : Phospholipase A2

POVPV : 1-palmitoyl-2-(5-oxovaléroyl)-*sn*-glycéro-3-phosphocholine

PPAR- γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor- γ* , Récepteur gamma activé par les proliférateurs de peroxyosomes

PS : Phosphatidylsérine

Rac1 : *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*, substrat de la toxine botulinique C3 reliée à Ras

RANTES : *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*, Cellule T normalement exprimée et sécrétée, régulée à l'activation

RCT : *Reverse cholesterol transport*, transport inverse du cholestérol

RhoA : *Ras homolog family member A*, membre de la famille homologue Ras A

S1P : Sphingosine-1-phosphate

sPLA2 : Phospholipase A2 sécrétée

SR-A ou -B2 : *Scavenger receptor*, récepteur éboueur A ou B2

SR-PSOX : *Scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized lipoprotein*, récepteur éboueur pour la phosphatidylsérine et les lipoprotéines oxydées

TAK1 : *Transforming growth factor β -activated kinase 1*, kinase activée par le TGF-bêta1

TGF : *Tumor growth factor*, facteur de croissance tumorale

TLR : *Toll-like receptor*, récepteur de type Toll

TNF : *Tumor necrosis factor*, facteur de nécrose tumorale

TRAF6 : *TNF receptor-associated factor 6*, facteur associé au récepteur TNF 6

TSP-1 : Thrombospondine 1

UTP : Uridine 5' triphosphate

VCAM-1 : Vascular adhesion molecule-1, molécule d'adhésion vasculaire-1

VLDL : *very low-density lipoprotein*, lipoprotéines de très faible densité

VLDLR : *very low-density lipoprotein receptor*, récepteur des lipoprotéines de très faible densité

VSMC : Vascular smooth muscle cell ; cellule musculaire lisse vasculaire

Remerciements

Je remercie tout d'abord ma directrice de mémoire, Dre Sylvie Marleau, pour son support et son mentorat tout au long de ma maîtrise et lors de l'écriture de ce mémoire.

Je remercie également les Drs Huy Ong et William D. Lubell, pour l'accès aux ligands du récepteur CD36 discutés dans ce mémoire.

Finalement, je remercie le président-rapporteur et le jury d'avoir accepté de consacrer de leur temps à mon mémoire.

Merci à tous ceux qui m'ont encouragée.

Chapitre 1 : Introduction

1.1. Maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires sont associées au fardeau de mortalité le plus important au monde, dépassant les cancers de tous types confondus et les désordres néonataux (1). En 2019, 523 millions d'individus atteints d'une maladie cardiovasculaire ont été rapportés dans le monde, en plus de compter 18,6 millions de décès associés aux maladies cardiovasculaires (2). Au Canada, l'athérosclérose est la 2^e cause de mortalité la plus importante, suivant les cancers de tous types confondus (3). De plus, il s'agit de la cause d'hospitalisation la plus importante au Canada. La perte d'années de vie corrigées au facteur d'invalidité (AVCI) est également un facteur à considérer dans les conséquences de la prévalence des maladies cardiovasculaires ischémiques, comme il s'agit de la cause la plus importante de perte d'AVCI au Canada. L'athérosclérose est considérée comme la cause première des maladies cardiaques ischémiques (3), et, dans le même ordre d'idée, le risque d'infarctus du myocarde associé à la progression de l'athérosclérose peut être multiplié selon la grosseur des plaques d'athérome (4). En effet, lorsque mesurées par échocardiographie transoesophagienne, les plaques de moins de 1 millimètre n'affectent pas le taux de risque, tandis que les plaques de 1 à 3 mm augmentent le taux de risque par 3,9, et celles de 4 mm et plus augmentent le taux de risque par 13,8 (4).

1.2. Facteurs de risque des maladies cardiovasculaires

Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés comme étant des paramètres favorisant le développement et la progression des maladies cardiovasculaires. Trois types de facteurs sont identifiables, soit les risques incontrôlables, les risques contrôlables et les risques associés au mode de vie. Tout d'abord, les risques incontrôlables incluent l'âge, le sexe et la race. Le vieillissement

affecte les risques de développement d'athérosclérose, au point où un individu de 60 ans ou plus a presque certainement développé des lésions athérosclérotiques (3), ce qui affecte à la hausse le risque de maladies cardiovasculaires. Du côté du sexe, lorsque les statistiques sont standardisées selon l'âge, les femmes sont généralement moins susceptibles de développer des lésions que les hommes, comme mentionné par Timmis et al. (5). Lorsque séparée par tranches d'âges, la distinction observée entre les sexes est spécifique aux individus âgés de plus de 50 ans, alors que pour les individus de 20 à 49 ans, la prévalence du développement d'athérosclérose ne montre pas de différence entre les hommes et les femmes (6). La différence observée indique que la prédisposition des hommes pour le développement de l'athérosclérose est augmentée plus intensément par le vieillissement. Concernant la race, les différences génétiques entre les populations induisent une variation du risque de développement de cardiopathies. En effet, lorsqu'investigué dans une population canadienne, donc avec l'influence des facteurs de risques environnementaux semblables, la prévalence des facteurs de risque de cardiopathies est plus élevée chez la population noire, où 11.1% des répondants présentent 2 ou plus de facteurs de risque majeurs des maladies cardiovasculaires, alors que la population sud-asiatique (Brunei, Myanmar, Cambodge, Timor-Leste, Indonésie, Laos, Malaisie, Philippines, Singapour, Thaïlande et Vietnam) montre une prévalence plus faible de 7.9%. Cependant, la population sud-asiatique possède un risque de cardiopathie plus élevé que la population noire soit 6.6% de la population sud-asiatique comparativement à 4,4% chez la population noire (7). Finalement, la qualité de l'air, soit la pollution ambiante, peut également avoir un impact (2, 5).

Pour ce qui est des risques contrôlables, dont les conditions médicales ou de comorbidités affectant le développement ou la progression des maladies cardiovasculaires, comme l'hypertension, une hyperglycémie à jeun et une hypercholestérolémie associée à une augmentation des lipoprotéines

de faible densité (LDL), sont des facteurs aggravants. Dans le même ordre d'idée, le diabète et l'obésité sont également des facteurs de risque associés aux cardiopathies ischémiques. Les facteurs de risque associés aux habitudes et mode de vie incluant la consommation d'alcool et de tabac, une faible consommation de fruits et légumes et la sédentarité peuvent affecter le développement de maladies cardiovasculaires chez un individu.

1.3. Athérosclérose

1.3.1. Développement de l'athérosclérose

L'athérosclérose est causée par une dysfonction endothéliale vasculaire et une accumulation lipidique au niveau de l'intima des artères, induisant la formation de plaques athérosclérotiques ou athéromes (8). Une des causes de la dysfonction endothéliale rencontrée dans le développement d'athérosclérose est la combinaison des effets de la diminution des forces de cisaillement au niveau de la paroi des vaisseaux artériels associés à la perturbation du flot laminaire, soit le flot sanguin normal parallèle aux parois artérielles. En effet, les forces de cisaillement affectent le flot sanguin normal, majoritairement dans les zones courbées ou encore au niveau des embranchements des vaisseaux, comme par exemple l'embranchement de l'aorte menant à l'artère brachiocéphalique, où le flot est perturbé pour former un flot non laminaire, soit non parallèle aux parois, formant des zones de turbulences. Ces zones induisent un changement des gènes exprimés par l'endothélium ainsi qu'une modification de leur cytosquelette, une adhésion des leucocytes, une augmentation du stress oxydatif et également une augmentation de l'inflammation de l'endothélium vasculaire (9). Ces facteurs, associés aux facteurs de risque externes de l'athérosclérose, comme par exemple l'hypertension, l'hypercholestérolémie ou le diabète, promeuvent le développement de plaques athérosclérotiques. De plus, certains facteurs de risque externes de l'athérosclérose, comme une

diète riche en gras, la sédentarité ou encore la consommation d'alcool et de produit du tabac, peuvent augmenter le taux de cholestérol sanguin, et de ce fait affecter l'homéostasie des lipides de l'organisme. La formation d'athérome perturbe encore plus le flot laminaire, et donc cause encore plus de turbulence avec les conséquences associées. En plus des effets directs de la perturbation du flot sanguin, la dysfonction endothéliale stimule la sécrétion de facteurs chimioattractants, comme par exemple la chimiokine ligand 2 (CCL2, aussi connue sous le nom MCP-1 pour monocyte-chemoattractant-protein-1), la chimiokine ligand à motif C-X-C 1 (CXCL1), chimiokine ligand à motif C-C 5 (CCL5 aussi connue sous l'acronyme RANTES pour *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), chimiokine ligand à motif C-X-C 4 (CXCL4) aussi connue sous le nom de PF4 pour *platelet factor 4* et chimiokine ligand à motif C-X3-C 1 (CX3CL1) aussi connue sous le nom de fractalkine, qui induisent le recrutement des lymphocytes et des monocytes (10) (Figure 1). Plusieurs des chimiokines sécrétées par l'endothélium seront attachées aux glycosaminoglycanes (GAGs) des protéoglycanes endothéliales et exerceront alors un effet haptotactique, soit le déplacement cellulaire en réponse aux substrats attachés par exemple à la matrice extracellulaire (11).

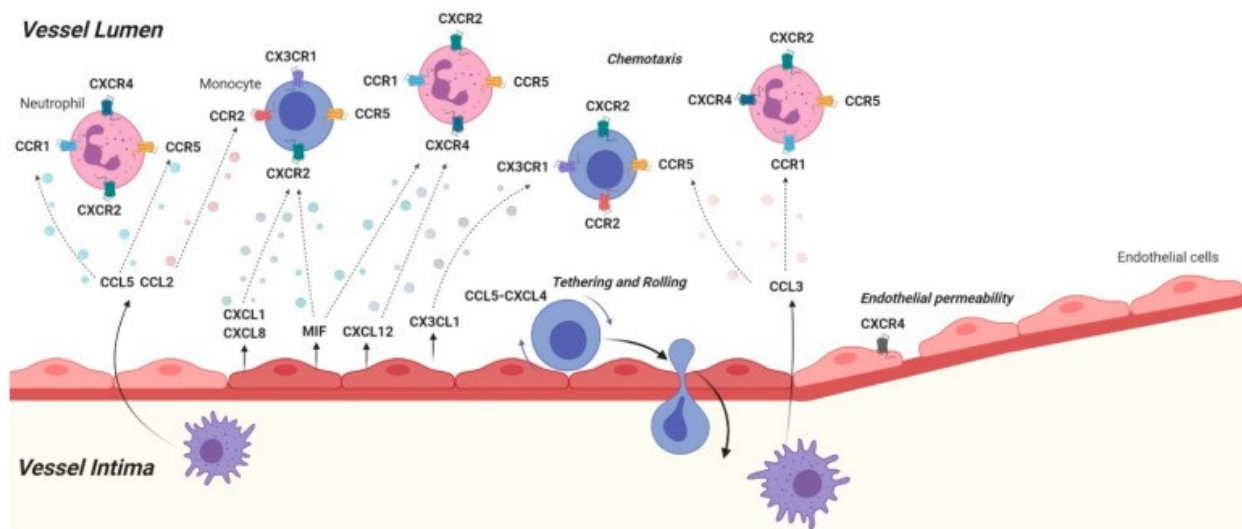


Figure 1 : Chimioattractants dans le recrutement des monocytes dans l'athérosclérose. Certaines chimiokines sont sécrétées par l'endothélium, comme CXCL1, CXCL4 et CX3CL1 et favorisent le recrutement des leucocytes, comme les monocytes. L'attachement, roulement et la transmigration des leucocytes est facilité par les chimiokines, qui augmentent la perméabilité de l'endothélium. Les macrophages activés peuvent également sécréter d'autres chimiokines, comme CCL2, qui favorisent également le recrutement des leucocytes (12) (CC by 4.0)

Également, l'endothélium dysfonctionnel favorise l'entrée des LDL de la circulation sanguine dans l'intima des vaisseaux. Les LDL sanguines augmentées par l'hypercholestérolémie, s'accumulent dans l'intima des vaisseaux et se lient à la matrice extracellulaire via une interaction ionique de l'apolipoprotéine B à la surface des LDL avec les protéoglycanes. Plus spécifiquement, cette interaction se produit au niveau des chaînes latérales, appelées GAGs, des protéoglycanes (13). L'attachement des apoB avec les GAGs se fait par une interaction ionique où les régions des apoB-100 chargées positivement se lient aux régions négativement chargées des GAGs (Figure 2).

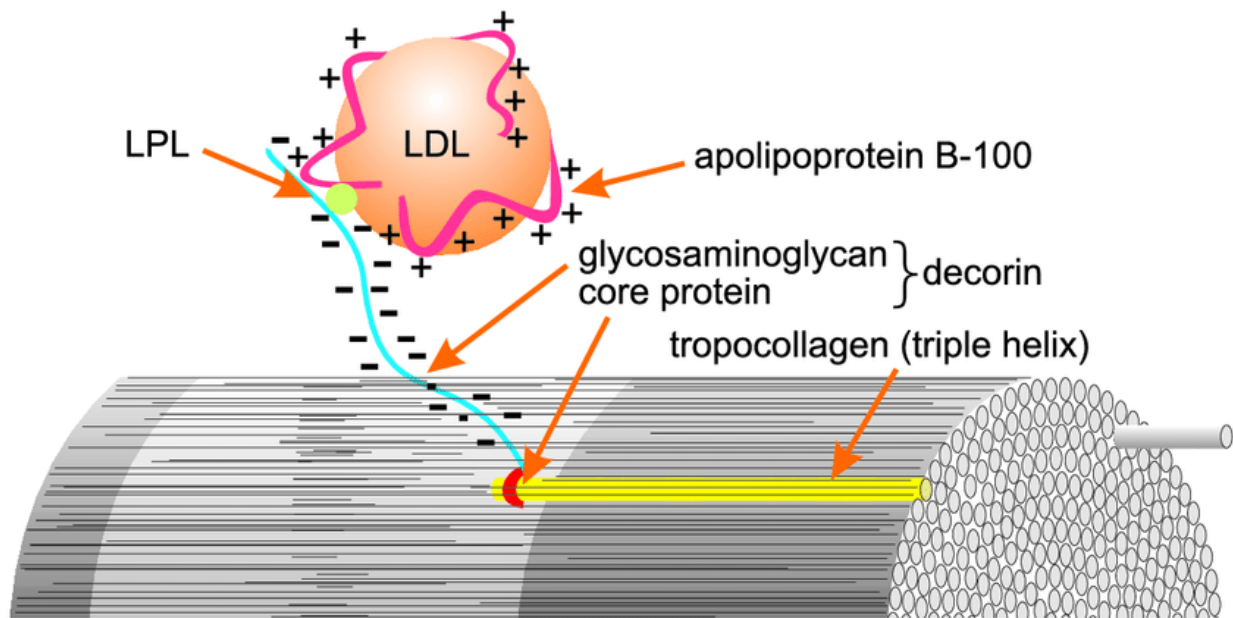


Figure 2 : Liaison de l'apoB aux GAGs (14). L'apoB se lie au GAGs par une interaction ionique assistée par la lipoprotéine lipase (LPL). Reproduction autorisée par les détenteurs du copyright.

La rétention des LDL au niveau de la matrice extracellulaire permet ainsi leur oxydation en LDL oxydées (LDLox) (15). Les monocytes recrutés sont différenciés en macrophages, et, avec les macrophages tissulaires résidents, causent l'internalisation des LDLox produites (16), principalement via leur liaison aux récepteurs éboueurs des classes A et B, qui sont les principaux récepteurs permettant l'internalisation des LDLox. Une certaine part de l'internalisation des LDLox est également attribuée au récepteur *lectin-like oxidized LDL receptor 1* (LOX1), de la classe E, alors que les autres classes ne présentent qu'une contribution minimale à l'internalisation. Plus spécifiquement, le récepteur *Cluster of differentiation 36*, aussi appelé *Scavenger receptor B2* (CD36/SR-B2), est responsable de la majorité des esters de cholestérol formés au niveau cytosolique via son internalisation des LDLox. Ce récepteur est donc crucial à la formation des

lésions athérosclérotiques, en plus des récepteurs SR-A1, SR-A2 et SR-B1, qui ont aussi un effet important sur le développement des lésions. (17). Les récepteurs éboueurs et leur classe sont illustrés sur la figure 3.

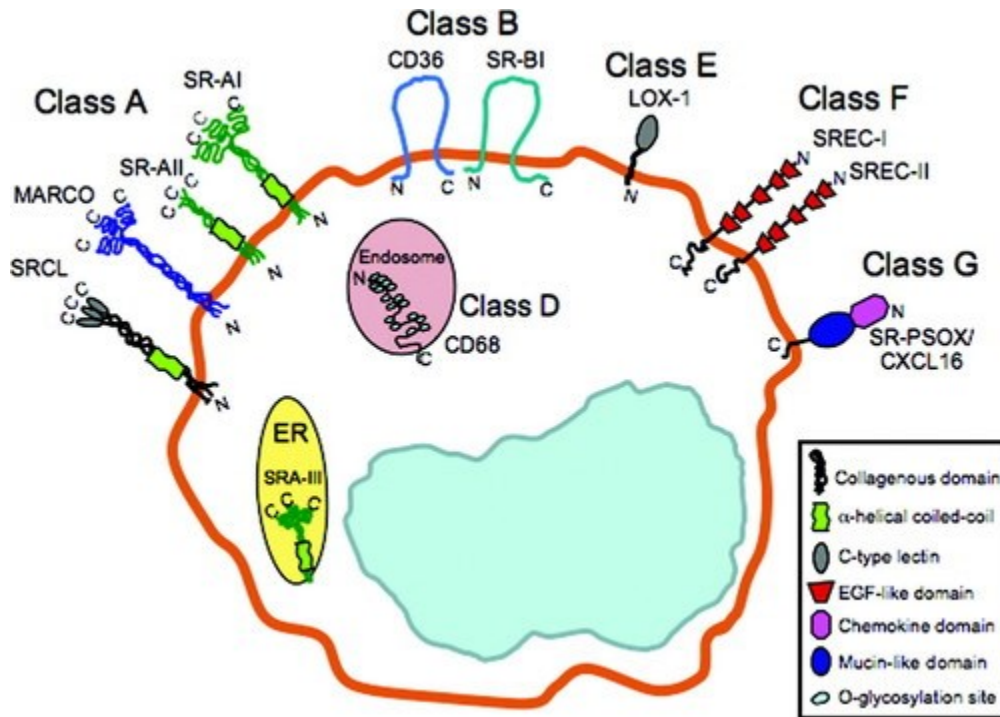


Figure 3 : Récepteurs éboueurs séparés par familles. Les familles A, B, E, F et G se retrouvent sur la membrane plasmique, et sont séparées selon leurs caractéristiques structurales et leurs différents domaines. Les récepteurs de la classe A possèdent des domaines de collagène et ceux de la classe B, incluant le récepteur CD36, possèdent 2 domaines transmembranaires, avec les extrémités N- et C-terminale intracellulaires. La classe E possède une lectine de type C, la classe F montre plusieurs domaines *epidermal growth-factor (EGF)-like* et les récepteurs de la classe G possèdent un domaine chimiokine et un domaine *mucin-like*. La classe D est intracellulaire, présente sur la membrane des endosomes (18). Reproduction autorisée par les détenteurs du copyright.

Une fois internalisées, les LDLox sont dégradées par les lysosomes et libèrent des particules de cholestérol libre et des acides gras, qui vont pouvoir suivre deux voies différentes (19). D'un côté, le cholestérol est transformé en oxystérols, qui migrent avec les *hydroxyoctadecadienoic acids* (HODE)-9 et 13, qui sont relâchés lors de la dégradation des LDLox, au niveau du noyau et agissent sur le récepteur nucléaire activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR γ) et le récepteur nucléaire des oxystérols (Liver X receptor, LXR) pour affecter la transcription des récepteurs LXR, ABCA1 et ABCG1, qui sont impliqués dans le transport, plus spécifiquement la sortie du cholestérol vers l'extérieur de la cellule. Du côté cytoplasmique, le cholestérol est estérifié par l'enzyme acyl-CoA cholestérol acyltransférase (ACAT) en esters de cholestérol, qui s'accumulent et forment des gouttelettes lipidiques au niveau du cytoplasme, ce qui induit la transformation des macrophages en cellules spumeuses (16, 20) (Figure 4). Les particules de cholestérol ayant été transportées hors de la cellule par les transporteurs ABCA1 et ABCG1 sont prises en charge par l'apoAI, l'apolipoprotéine principale responsable du transport inverse du cholestérol, mais l'apoE peut également remplir ce rôle (21). L'apoAI est une protéine structurale des pré-bêta-HDL (lipides de haute densité), qui sont transformés en HDL₃ par la lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT), puis, suite à une autre action de LCAT, peuvent être transformés en HDL₂. HDL₂ et HDL₃ sont deux sous-types de HDL mature (22). Les HDL permettent le transport inverse du cholestérol de la cellule vers la périphérie, soit au niveau du foie, puis son excrétion dans les sels biliaires et la biosynthèse des VLDL (23).

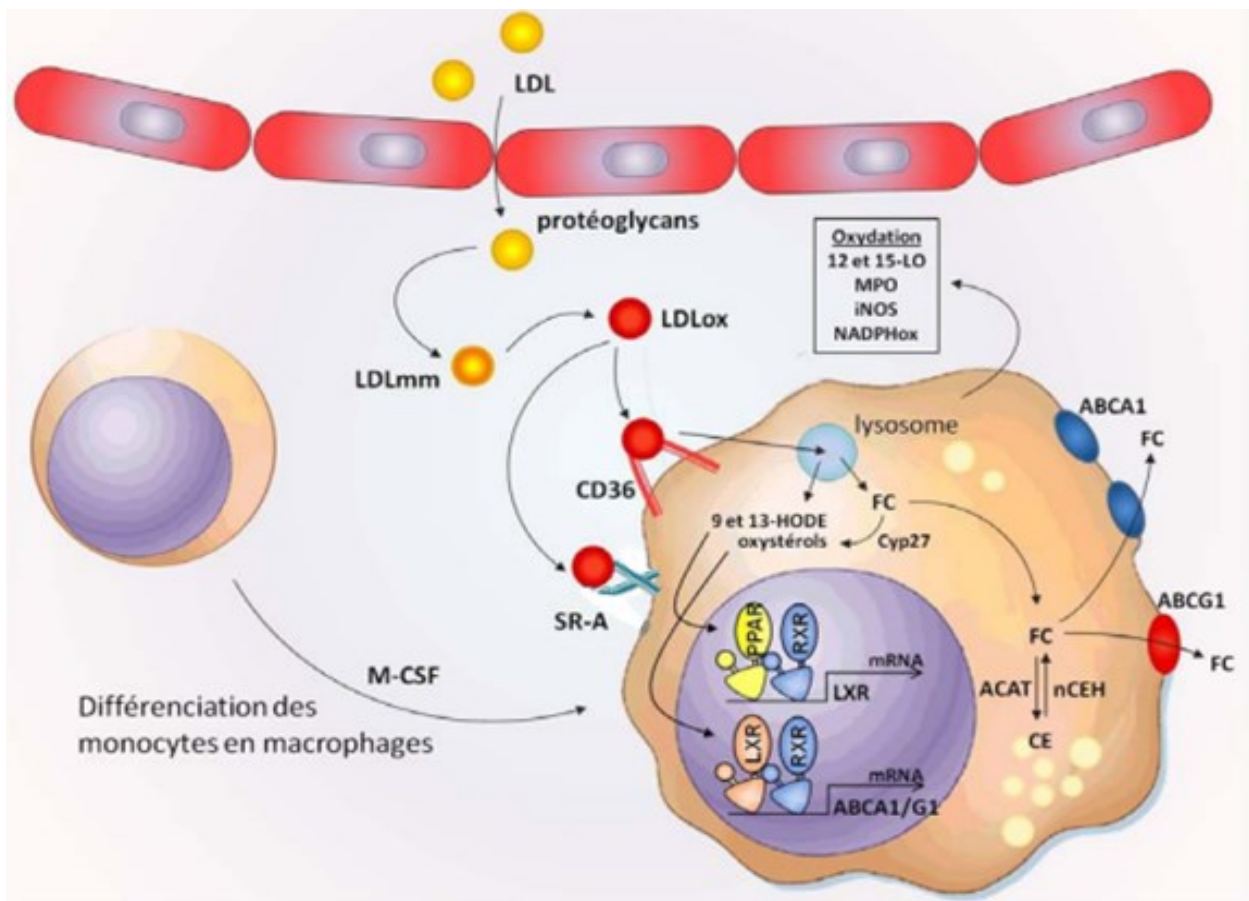


Figure 4 : Métabolisme du cholestérol dans les macrophages et formation des cellules spumeuses. Reproduction et modification autorisée par l'auteur.

Les lipoprotéines de basse densité (LDL) migrent au niveau de l'intima, où l'attachement aux protéoglycanes permet leur oxydation en LDL minimalement oxydées (LDLmm) puis oxydées (LDLox). Les LDLox sont ensuite internalisées par les macrophages via les récepteurs éboueurs *Cluster of differentiation 36* (CD36) ou *scavenger receptor A* (SR-A). Une fois internalisé, le cholestérol relâché des LDL peut être transformé en oxystérols, qui migrent au noyau et affectent la transcription des transporteurs de cholestérol ABCA1 ou ABCG1. Les acides hydroxyoctadécadiénoïques (HODE)-9 et 13, qui sont relâchés par la dégradation des LDL,

suivent le même chemin que les oxystérols, mais affectent la transcription d'un récepteur nucléaire, le LXR. Le cholestérol peut également s'accumuler dans le cytosol, où il est transformé en esters de cholestérol par l'enzyme acyl-coenzyme A (CoA): cholestérol acyltransférase (ACAT), ce qui favorise la transformation des macrophages en cellules spumeuses (20). Reproduction autorisée par l'auteur.

Les LDLox constituent donc un élément important du développement et de la progression de l'athérosclérose, les cellules spumeuses étant une composante majeure des plaques athérosclérotiques. En plus d'être à la base de la formation des cellules spumeuses, les monocytes et macrophages peuvent également sécréter des cytokines inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale (TNF), certains facteurs de croissance, les espèces réactives de l'oxygène et autres médiateurs. Les lésions initiales sont principalement composées de cellules immunitaires, notamment de monocytes et macrophages, de cellules spumeuses, et il est également possible de retrouver des dépôts lipidiques extracellulaires et même une petite quantité de plaquettes (15).

1.3.3. Constituants des lésions

Les lésions athérosclérotiques sont des lésions dynamiques qui sont constituées, d'un côté, de composants de la matrice extracellulaire comme le collagène, les protéoglycanes, les fibres de fibronectine, les phospholipides et les esters et cristaux de cholestérol, et de l'autre côté, de composants cellulaires tels que les monocytes, les macrophages dérivés des monocytes, les macrophages artériels résidents, les lymphocytes et les cellules musculaires lisses. Les plaques peuvent également présenter de la néovascularisation (8). Les monocytes et macrophages présents

au niveau des lésions peuvent internaliser les lipides au site lésionnel, et ainsi induire leur transformation en cellules spumeuses, un constituant retrouvé au niveau des lésions athérosclérotiques à toutes les étapes du développement et de la progression athérosclérotique, et ce dès l'initiation des lésions (24). Au fur et à mesure que les lésions athérosclérotiques se développent et que les dépôts lipidiques deviennent plus importants, les plaques peuvent devenir plus vulnérables ou plus stables, et à cet effet leurs constituants diffèrent. Les plaques athérosclérotiques vulnérables, donc plus à risque de rupture, montrent moins ou pas de calcifications, et leur cap fibreux, qui est composé de cellules musculaires lisses et de tissus conjonctifs comme la fibronectine, est moins épais et défini. De plus, les plaques vulnérables montrent plus de néovascularisation, de zones nécrotiques et d'hémorragies (25). De l'autre côté, les plaques stables montrent plus de calcifications, et leur cap fibreux est beaucoup plus épais, avec beaucoup plus de fibres de la matrice extracellulaire comme le collagène et de cellules musculaires lisses. De plus, les plaques stables ont une plus grande concentration de collagène, un constituant montrant une corrélation directe avec la stabilité des lésions (26). Les zones nécrotiques sont généralement moins étendues et moins nombreuses, même chose pour la néovascularisation et les zones d'hémorragie.

1.3.3.1. Cholestérol

Le cholestérol, au niveau physiologique, est distribué ubiquitairement dans les différents organes du corps (27), dans la membrane plasmique des cellules ainsi que dans la circulation sanguine au niveau des lipoprotéines circulantes. Lorsque le cholestérol est en circulation, en raison de sa nature lipophile, il est majoritairement retrouvé au niveau des lipoprotéines comme les LDL et les HDL (28). Les LDL permettent le transport du cholestérol à partir du foie jusqu'aux cellules

nécessitant l'apport de cholestérol, tandis que les HDL assurent le transport du cholestérol des cellules vers le foie, appelé le transport inverse du cholestérol (RCT), dont l'excès est éliminé dans la bile, car le cholestérol ne peut pas être dégradé par les cellules. Une autre voie d'élimination du cholestérol se fait par la voie transintestinale, soit par la sécrétion directe du cholestérol périphérique au niveau intestinal (20). Au niveau cellulaire, le cholestérol est ubiquitaire, quoique plus concentré au niveau de la membrane plasmique où il est essentiel. Le cholestérol provenant des LDL, suite à la liaison des particules aux récepteurs transporteur, comme par exemple le récepteur des LDL (LDLR), est internalisé avec le récepteur via des vésicules de clathrine et relayé aux endosomes précoces, où il est dissocié des récepteurs, qui sont ensuite recyclés à la membrane. Les LDL sont ensuite livrées aux endosomes tardifs, où les particules de LDL sont dégradées pour libérer le cholestérol. Le cholestérol peut être transporté à la membrane plasmique ou au réticulum endoplasmique, qui permet l'estérification du cholestérol en esters de cholestérol, qui peuvent sous cette forme être entreposés dans la cellule (29). Le cholestérol peut également être directement synthétisé au niveau de la cellule, via le réticulum endoplasmique (30). Le cholestérol est synthétisé à partir d'acétate, qui est condensé avec une autre molécule d'acétate par l'action de la thiolase pour former l'acétoatétyl-CoA. Cette molécule est ensuite condensée avec une troisième molécule d'acétate grâce à l'action de la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) synthase afin de former l'HMG-CoA. L'HMG-CoA est transformé en mévalonate par l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase (HMG-CoAR), une enzyme limitante de la réaction. Le mévalonate est ensuite transformé en squalène puis en lanostérol, et finalement en cholestérol (31-33). La figure 5 illustre le mécanisme de façon plus détaillée.

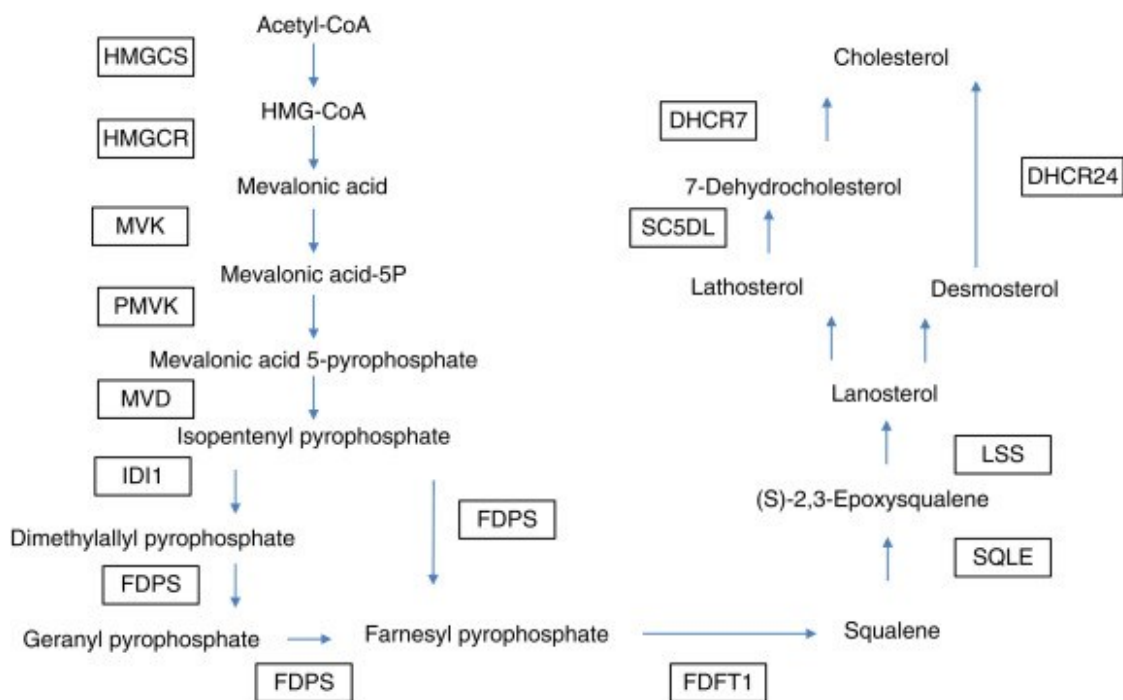


Figure 5 : Synthèse du cholestérol. L'acétyl-CoA, provenant de l'acétate, est transformé en HMG-CoA par l'HMG-CoA synthase (HMGCS), ensuite transformé en acide mévalonique par l'HMG-CoA réductase (HMGCR). La mévalonate kinase (MVK) induit la formation de l'acide mévalonique-5P, qui est transformé en acide mévalonique 5-pyrophosphate par la phosphomévalonate kinase (PMVK). Ce produit est ensuite transformé par la mévalonate diphosphate décarboxylase (MVD) en isopentenyl pyrophosphate, qui est éventuellement transformé farnesyl pyrophosphate. La transformation peut être directe par l'action de la farnesyl diphosphate synthase (FDPS), ou encore en passant par le diméthyllallyl pyrophosphate (transformé par l'IDI1 ou isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1) et le geranyl pyrophosphate (via l'action de FDPS). À partir du farnesyl pyrophosphate, le farnesyl-diphosphate farnesyltransférase 1 (FDFT1) permet la transformation en squalène, puis en (S)-2,3-époxy-squalène par l'action de la squalène époxidase (SQLE). Le lanostérol est ensuite formé via l'action de la lanostérol synthase (LSS). À partir du lanostérol, deux voies de synthèse permettent la formation du cholestérol, à partir du lathostérol ou du desmostérol. Le lathostérol est transformé

en 7-déshydrocholestérol par le stérol-C5-désaturase-like (SC5DL), puis en cholestérol via la 7-déshydrocholestérol réductase (DHCR7). De l'autre côté le desmostérol est directement transformé en cholestérol par la 24-déshydrocholestérol réductase (DHCR24) (34). Reproduction autorisée par les détenteurs du copyright.

L'homéostasie du cholestérol intracellulaire est donc régulée par l'internalisation par les LDL, la synthèse par le réticulum endoplasmique et l'efflux du cholestérol, soit leur exportation via la prise en charge du cholestérol par différentes apolipoprotéines.

1.3.3.2. Macrophages dans l'athérosclérose

Tout d'abord les monocytes, précurseurs des macrophages dans l'intima, peuvent être retrouvés au niveau des lésions athérosclérotiques, surtout à l'initiation des lésions, où les macrophages deviennent eux-mêmes précurseurs des cellules spumeuses. Ces monocytes proviennent de cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse avec un potentiel de différenciation myéloïde. À cet effet, les progéniteurs myéloïdes communs sont transformés en précurseurs granulocytes-monocytes-cellules dendritiques (GMDP), qui deviennent des progéniteurs monocytes-cellules dendritiques (MDP) pour finalement former les monocytes ou encore former les progéniteurs communs des cellules dendritiques (CDP), qui permettent la formation des trois sous-populations de cellules dendritiques. Les monocytes ainsi formés quittent la moelle osseuse pour se retrouver dans la circulation sanguine, où ils sont recrutés lors d'évènements inflammatoires (35, 36). Selon Kapellos et al. (24), les monocytes humains peuvent être classifiés en 3 catégories distinctes, selon leurs marqueurs de surface et leurs différents rôles dans

l'organisme, soit les monocytes classiques, intermédiaires et non classiques. Premièrement, les monocytes classiques, identifiés $CD14^+ CD16^-$ chez l'homme, ont été définis comme étant préparés à leurs rôles de phagocytose, de réponse et de migration immunitaire innée, migrant généralement en suivant les gradients de chimiokine ligand 2 et 3, CCL2 étant une chimiokine sécrétée par le dysfonctionnement endothélial au début du développement de l'athérosclérose. Les monocytes classiques montrent un phénotype proinflammatoire plus important que les autres types, majoritairement dû à leur habileté de sécrétion de médiateurs solubles, par exemple certaines interleukines, IL-6 et IL-8 et TNF, et de la capacité de différenciation des monocytes en cellules dendritiques dérivées des monocytes afin d'instituer un lien entre les réponses immunitaires innée et adaptative. Deuxièmement, les monocytes intermédiaires, avec marqueurs $CD14^+ CD16^+$, en plus d'être le seul type de monocyte à exprimer le récepteur à chimiokine C-C de type 5 (CCR5), possèdent des rôles de présentation d'antigènes, de sécrétion de cytokines, de régulation de l'apoptose ainsi que de différenciation en macrophages (24). En effet, ils expriment plus de molécules reliées à la présentation d'antigènes comparativement aux autres types, et ils peuvent également, si les récepteurs de type Toll (TLR) sont stimulés, sécréter certaines cytokines proinflammatoires, telles que TNF- α , les interleukines -1 β et -6 (IL-1 β et IL-6) et le ligand de chimiokine 3 (CCL3). Troisièmement, les monocytes non classiques, marqués $CD14^{dim} CD16^+$, sont impliqués dans l'activation du complément, dans la phagocytose médiée par les récepteurs Fc gamma et également dans l'adhésion cellulaire. Ils ont des capacités de présentateur d'antigènes comme les monocytes intermédiaires, mais sont aussi associés à certains processus de guérison de blessures, principalement via la transformation en macrophages M2, qui sont associés à la résolution de l'inflammation et la réparation des dommages. Les monocytes non classiques peuvent également jouer un rôle dans la réponse antivirale (24, 37). Pour ce qui est de la maturation

des monocytes en macrophages, les monocytes classiques sont généralement transformés en macrophages de type M1, alors que les macrophages non classiques sont plus susceptibles de devenir des macrophages de type M2 (38). Avant la transformation en macrophages, les monocytes classiques en circulation peuvent également se transformer en monocytes non classiques en passant par la forme intermédiaire, influençant la polarisation des macrophages résultants. Lors de la maturation des monocytes en macrophages, le marqueur CD14, utilisé chez les monocytes pour différencier les types classique, intermédiaire et non classique, est utilisé comme marqueur de différenciation, car le CD14 est exprimé uniquement au niveau des monocytes (39). Chez le modèle murin, les mêmes catégories de monocytes sont également retrouvées avec différents marqueurs, soit $Ly6C^{hi}CX3CR1^{lo}CD43^{lo}$ pour les monocytes classiques et $Ly6C^{lo}CX3CR1^{hi}CD43^{hi}$ pour les monocytes non classiques, avec les mêmes fonctions que chez les monocytes humains (37).

Plus spécifiquement au niveau de l'athérosclérose, les monocytes jouent un rôle important dans la formation et maturation des plaques athérosclérotiques. Des chimiokines, par exemple CCL2, permettent le recrutement des monocytes au niveau de l'intima où ceux-ci peuvent ensuite internaliser les lipoprotéines oxydées et se différencier en macrophages et cellules spumeuses. Comme les niveaux de CCL2 sont plus élevés dans les débuts du développement de lésions athérosclérotiques, et que les monocytes classiques migrent suivant le gradient de CCL2, ce type de macrophages serait le plus présent lors du développement initial des lésions, ce qui en ferait des monocytes classiques un marqueur prédictif d'athérosclérose, identifiable via ses récepteurs de surface. Du côté des monocytes intermédiaires, un compte plus élevé de ceux-ci serait plus associé à la croissance et à la stabilité des plaques, donc à une présence accrue dans les plaques déjà établies et non lors du développement (40-44). Finalement, pour ce qui est des monocytes non

classiques, il s'agit du type le plus fréquent chez les patients atteints d'athérosclérose, en plus d'avoir une capacité accrue de migration vers les macrophages présents dans les plaques, via la chimiokine ligand à motif C-X-C 16 (CXCL16, aussi appelée *scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized lipoprotein* (SR-PSOX)) que ces derniers sécrètent (45). Une population similaire est observable dans le modèle murin, où les monocytes non classiques représentent la majorité des monocytes circulants, et de ce fait sont les monocytes majoritairement relocalisés vers l'intima au travers l'endothélium activé (46). De ce fait, les monocytes non classiques seraient impliqués dans la clairance des cellules apoptotiques présentes au niveau des zones nécrotiques, et donc recrutés plus tardivement dans la progression des lésions (24).

Au niveau des lésions athérosclérotiques, les macrophages présents montrent différents phénotypes. Les types de macrophages retrouvés au niveau des plaques athérosclérotiques humaines sont M1, M2, et M4, où M1 et M4 sont athérogènes et M2 antiathérogène. Chez le modèle murin, les types de macrophages M1 et M2 sont également retrouvés, avec le type Mox (47). Le type M2 est séparé en 4 sous-types, soit M2a, M2b, M2c et M2d. Il est important de noter que la différenciation des macrophages en différents sous-types est très dynamique, soit que les macrophages peuvent être polarisés rapidement en fonction des changements de leur microenvironnement, et qu'une fois polarisés, ceux-ci peuvent facilement changer de phénotype si le microenvironnement est modifié (48). Les macrophages peuvent également être trouvés sous forme non activée, et l'activation des macrophages, qui est le phénomène permettant leur polarisation en différents phénotypes, peut être déclenchée par différents mécanismes immunitaires de l'organisme comme par exemple un dommage tissulaire d'origine endogène ou exogène, les médiateurs de l'inflammation, etc. Dans l'athérosclérose, les 2 types les plus documentés sont les phénotypes M1 et M2. Premièrement, les macrophages M1 présentent un

phénotype proinflammatoire, contribuant à l'augmentation et au maintien de la réponse inflammatoire via la sécrétion de cytokines proinflammatoires, comme l'IL-6, l'IL-1 β , le TNF- α , l'IL-12 et l'IL-23, ainsi que certains agents toxiques dans ce contexte, comme l'oxyde nitrique (NO) et les ROS. Au niveau chronique, une induction prolongée des macrophages M1 peut induire des dommages tissulaires (47). Plus spécifiquement dans athérosclérose, les macrophages M1 sont majoritaires dans les plaques vulnérables, qui sont caractérisées plus spécifiquement par un phénotype proinflammatoire (49). Deuxièmement, les macrophages M2 présentent un phénotype anti-inflammatoire, et à cet effet sont impliqués dans la réparation tissulaire et montrent des propriétés angiogéniques, profibrotiques, et de phagocytose (47). Ils sécrètent également certains facteurs anti-inflammatoires et anti-athérosclérotiques tels que l'IL-10 et le TGF- β (49). Au niveau des plaques athérosclérotiques, le compte de macrophages M2 diminue plus les lésions progressent, mais ils sont tout de même plus nombreux au niveau des plaques stables qu'au niveau des plaques vulnérables (47). Toutefois, une proportion plus élevée de macrophages M2 est nécessaire pour qu'il y ait une régression des plaques athérosclérotiques, qui est caractérisée par une diminution de la taille des lésions, une diminution des médiateurs proinflammatoires, ainsi qu'une diminution des cellules apoptotiques et nécrotiques (49). Généralement, le facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF) est associé avec le phénotype M1 alors que le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF) est associé aux macrophages M2. De ce fait, le GM-CSF est peu exprimé dans les artères en santé, mais augmente avec la progression des lésions athérosclérotiques, alors que le M-CSF est présent dans les artères en santé et au niveau des lésions athérosclérotiques (47). En résumé, les artères en santé présentent des macrophages majoritairement non activés ou sans phénotype avec une faible proportion de macrophages M2, qui sont polarisés en type M1 plus les lésions athérosclérotiques progressent.

Le phénotype M1 demeure prédominant dans les plaques vulnérables, mais est moins présent dans les plaques stables et/ou en régression, où le phénotype M2 est plus représenté. La polarisation des macrophages est directement associée à la quantité de calcification présente à l'intérieur des plaques athérosclérotiques. Deux types de calcifications peuvent être observés dans les lésions, soit la microcalcification, qui est associée aux plaques vulnérables et donc à la rupture, et la macrocalcification, qui est associée à la stabilité des plaques. Une plus grande proportion de macrophages M1 induit les dépôts calciques initiaux au niveau des zones nécrotiques, donc la microcalcification, alors qu'une plus grande proportion de macrophages M2 induit la macrocalcification (50).

Les macrophages jouent un rôle majeur dans l'homéostasie du cholestérol, autant dans l'organisme en santé que dans des conditions pathologiques comme l'athérosclérose. Si la balance du cholestérol fait défaut, par exemple à cause d'une augmentation de l'ingestion ou à cause de facteurs génétiques induisant des dépôts de cholestérol accrus, les mécanismes d'élimination du surplus de cholestérol ne peuvent plus disposer efficacement du cholestérol, qui s'accumule au niveau des LDL. Les LDL vont par ce fait être oxydées (LDLox) (51). L'internalisation de ces particules oxydées se fait via les récepteurs éboueurs des macrophages, un mécanisme qui n'est pas régulé par une rétroaction négative et donc induit une accumulation excessive de LDLox intracellulaire. Si le transport inverse du cholestérol fait défaut, ce qui est généralement observé lors du développement de l'athérosclérose, le cholestérol provenant des LDLox s'accumule au niveau du cytosol, et donc favorise la formation de cellules spumeuses. Un excès de cholestérol intracellulaire est toxique pour les cellules (29), donc l'internalisation de LDLox chez les autres cellules, par exemple les cellules endothéliales, peut causer l'apoptose des cellules et de

l'inflammation. Avec le temps, ces processus athérogènes peuvent avoir un effet négatif sur la clairance du cholestérol des lésions, induisant son accumulation directement au niveau de l'intima des vaisseaux, favorisant donc la formation de plaques athérosclérotiques (29).

Les macrophages jouent également un rôle important dans l'efférocytose, qui se définit comme étant l'engouffrement des cellules apoptotiques par des cellules phagocytaires, notamment par les macrophages qui en sont principalement responsables (52). Plus spécifiquement, les macrophages M2 sont responsables de la majorité de l'efférocytose (49). L'efférocytose ressemble à la phagocytose au niveau du mécanisme général, mais les signaux cellulaires, récepteurs, molécules ponts et les voies de signalisation intracellulaires impliquées sont différents (52). L'efférocytose ressemble plus à la micropinocytose au niveau du mécanisme de l'engouffrement des cellules (53). Le processus d'efférocytose s'amorce avec l'identification des cellules apoptotiques. Les cellules, lors du commencement du processus d'apoptose, exposent la phosphatidylsérine, qui se trouve normalement à la membrane plasmique, mais du côté intracellulaire, la phosphatidylsérine est donc déplacée du côté extracellulaire. Également au début du processus, les cellules apoptotiques sécrètent des chimiokines (54, 55), ou signaux « find-me », comme par exemple la lysophosphatidylcholine (LPC), le CX3CL1, l'adénosine triphosphate (ATP), l'uridine 5' triphosphate (UTP) et la sphingosine 1-phosphate (S1P), qui permettent le recrutement des macrophages au site d'apoptose. L'apparition des signaux « find-me » induisent une augmentation de l'expression de molécules ponts (bridging molecules), soit par exemple la lactadhérine (aussi appelée MFG-E8, milk fat globule-EGF factor 8 protein), l'arrêt de croissance spécifique 6 (GAS6), la protéine S, le récepteur myéloïde épithélial à activité tyrosine kinase (MerTK), par les macrophages, qui jouent un rôle dans l'attachement des cellules apoptotiques aux macrophages.

En plus des signaux « find-me », des molécules ponts et de leurs récepteurs, un signal « eat-me » est également nécessaire pour permettre l'engouffrement des cellules apoptotiques par les macrophages, dont la phosphatidylsérine (PS), la calréticuline, la molécule d'adhérence intercellulaire de type 3 (ICAM3) (52). Des signaux « don't eat me », présents sur les cellules non apoptotiques, doivent également être absents pour permettre l'efférocytose (56). Au niveau des voies de signalisation, le substrat de la toxine botulinique C3 reliée à Ras (Rac1) régule l'engouffrement des cellules apoptotiques ainsi que la formation d'efférosomes, soit les vésicules contenant les cellules apoptotiques en processus d'efférocytose, autour des cellules, alors que le membre de la famille homologue Ras A (RhoA), qui est responsable de la phagocytose, est réprimé (52). En éliminant les cellules apoptotiques, les macrophages empêchent la formation de nécrose secondaire, et donc à cet effet diminuent la nécrose totale au niveau lésionnel, ce qui est généralement considéré comme un effet anti-inflammatoire. L'effet est également exacerbé par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, tels que l'IL-10 et le TGF- β ainsi que par le PGE2, dont la sécrétion est induite par l'efférocytose (57). De plus, l'efférocytose diminue la congestion des tissus et favorise leur réparation (57, 58).

1.3.2. Progression de l'athérosclérose

Une fois les lésions athérosclérotiques initiales développées, il est possible d'observer un accroissement constant du cholestérol accumulé au niveau des lésions, ainsi qu'une augmentation générale des monocytes recrutés et du nombre de macrophages lésionnels (59). Les plaques athérosclérotiques initialement formées vont donc augmenter en taille, pouvant aller jusqu'à l'obstruction complète des vaisseaux touchés pour les plaques plus avancées. La progression des lésions se caractérise aussi par l'augmentation de la migration des cellules musculaires lisses de la

média vers l'intima ainsi que par la sécrétion de composantes de la matrice extracellulaire comme le collagène, les protéoglycanes et les fibres élastiques de fibronectine. Chez ces lésions plus avancées, l'apoptose et la nécrose des cellules contenues au niveau des plaques sont fréquemment observées, majoritairement au niveau des macrophages devenus cellules spumeuses, formant un noyau nécrotique constitué de cellules nécrotiques, de débris cellulaires relâchés par la perte d'intégrité de la membrane des cellules nécrotiques, et de cristaux de cholestérol. Ces cellules apoptotiques ou nécrotiques sont en partie nettoyées de la lésion via l'efférocytose effectuée par les macrophages, toutefois, ce système peut être dépassé si trop de morts cellulaires programmées se produisent, et le noyau nécrotique est donc maintenu. Les différents éléments de la matrice extracellulaire comme le collagène, les protéoglycanes et les fibres élastiques de fibronectine aident à la formation du cap fibreux des plaques athérosclérotiques, une sorte de fortification à la limite des lésions qui protège le noyau nécrotique et l'empêche d'entrer en contact avec la lumière des vaisseaux atteints, afin de limiter la possibilité de rupture des plaques, qui exposerait les éléments thrombogènes sous-jacents à la circulation sanguine. Les plaques matures sont également caractérisées par la formation de néovascularisation au niveau des athéromes, qui est généralement associée à la formation de zones hémorragiques. La présence de calcification est également possible chez les lésions avancées (8). En effet, la présence de calcification dans les plaques athérosclérotiques augmente avec la progression des lésions dans le temps, en plus d'être influencé par certains facteurs présents dans la matrice extracellulaire, comme l'augmentation du contenu lipidique, ou encore la présence de cytokines proinflammatoires, de phosphate, de complexes lipoprotéiques ou de foyers nécrotiques. Une accumulation de dépôt de calcium est donc engendrée par ce milieu extracellulaire, et les calcifications induites sont presque identiques à l'ostéogenèse observée au niveau des os (60). Chez la souris, la calcification peut également être observée, mais

ne se produit pas selon le même mécanisme, avec une formation similaire à l'ossification endochondrale, soit la transformation de cartilage en os (61). Les cellules spumeuses sont également retrouvées dans les lésions matures, car de nouvelles cellules spumeuses sont formées à toutes les étapes du développement et de la progression des lésions athérosclérotiques. Les cellules spumeuses sont cependant des cellules très instables étant donné leur contenu lipidique important, et sont donc à risque de mort cellulaire non programmée, ou nécrose. Dans le meilleur des cas, ces cellules entrent en apoptose et sont ensuite phagocytées par les macrophages. Cependant, tel que mentionné précédemment, ce système peut être dépassé dans les lésions plus avancées, induisant le développement du noyau nécrotique, riche en débris cellulaires et en cholestérol, qui forment des cristaux (62). De plus, la formation de zones nécrotiques peut être également attribuée à la mort des macrophages phagocytaires, qui à leur tour peuvent entrer en apoptose ou en nécrose après l'ingestion trop importante de cellules spumeuses apoptotiques et de leur contenu lipidique important (63, 64).

1.3.2.1. Progression des lésions obstructives

La formation de plaques athérosclérotiques induit la diminution de la lumière des vaisseaux, ce qui réduit la taille des vaisseaux disponible pour la circulation sanguine, et peut même induire une obstruction complète des vaisseaux, empêchant l'irrigation des tissus. Toutefois, la progression des lésions vers la voie obstructive est possible uniquement si les plaques observent un phénotype stable, caractérisé par un cap fibreux plus prononcé, induit par la migration plus importante des cellules musculaires lisses vasculaires vers la limite de la lésion. On observe également une augmentation du contenu fibreux de la matrice extracellulaire ainsi qu'une possible calcification

des plaques et une migration accrue des cellules musculaires lisses. Les plaques stables montrent également moins de néovascularisations, d'hémorragie et de nécrose.

1.3.2.2. Progression des lésions vers la rupture

D'un autre côté, les plaques peuvent également devenir instables, ou vulnérables, ce qui est caractérisé par une diminution de la calcification, de la quantité de collagène et autres fibres de la matrice extracellulaire des cellules musculaires lisses, et à l'augmentation de la néovascularisation et de zones hémorragiques, en plus de la formation de zones nécrotiques. À cet effet, il y a une possibilité de rupture de la plaque, ce qui induit l'exposition du contenu de la plaque à la circulation sanguine, l'activation plaquettaire et donc la formation de caillots qui peuvent aller se loger dans différents vaisseaux et causer une embolie, par exemple pulmonaire, ou encore un infarctus du myocarde ou un accident vasculaire cérébral, dépendant de l'emplacement de la plaque en rupture (65). Les caillots formés peuvent également être suffisamment étendus pour bloquer la circulation sanguine au site lésionnel, causant la formation de thrombose (29, 66). Le contenu de la plaque peut également être exposé par l'érosion du cap fibreux, sans nécessairement observer sa rupture (67). Généralement, les plaques vulnérables avec rupture montrent un noyau nécrotique plus étendu, jusqu'à un tiers ou même 50% de la plaque totale, comparativement aux plaques vulnérables sans rupture, qui montrent tout de même un noyau nécrotique constituant jusqu'à 25% de la lésion complète, ce qui est plus étendu que chez les plaques stables. Le phénotype de plaque instable est également associé à une augmentation de l'inflammation, et les macrophages inflammatoires de type M1 permettent la sécrétion de métalloprotéinases matricielles (MMPs), qui induisent l'amincissement du cap fibreux. De plus, sans rupture complète de la plaque, le cap fibreux peut être brisé, permettant l'entrée de sang au niveau des plaques, qui entre en contact avec

les éléments prothrombotiques présents à ce niveau. En effet, plusieurs éléments présents au niveau de la matrice extracellulaire, comme par exemple la thrombine, le collagène, le thromboxane A, le facteur d'activation plaquettaire (PAF), l'adénosine 5'-diphosphate (ADP) et la vasopressine, permettent l'induction de thromboses sans rupture complète de la plaque (68, 69).

1.3.4. Mort cellulaire dans l'athérosclérose

Comme mentionné précédemment, l'apoptose, soit la mort cellulaire programmée, dite non inflammatoire, et la nécrose, soit la mort cellulaire non programmée ou prématurée, dite inflammatoire, sont des phénomènes fréquemment observés dans le développement et la progression de l'athérosclérose (70) (Figure 6).

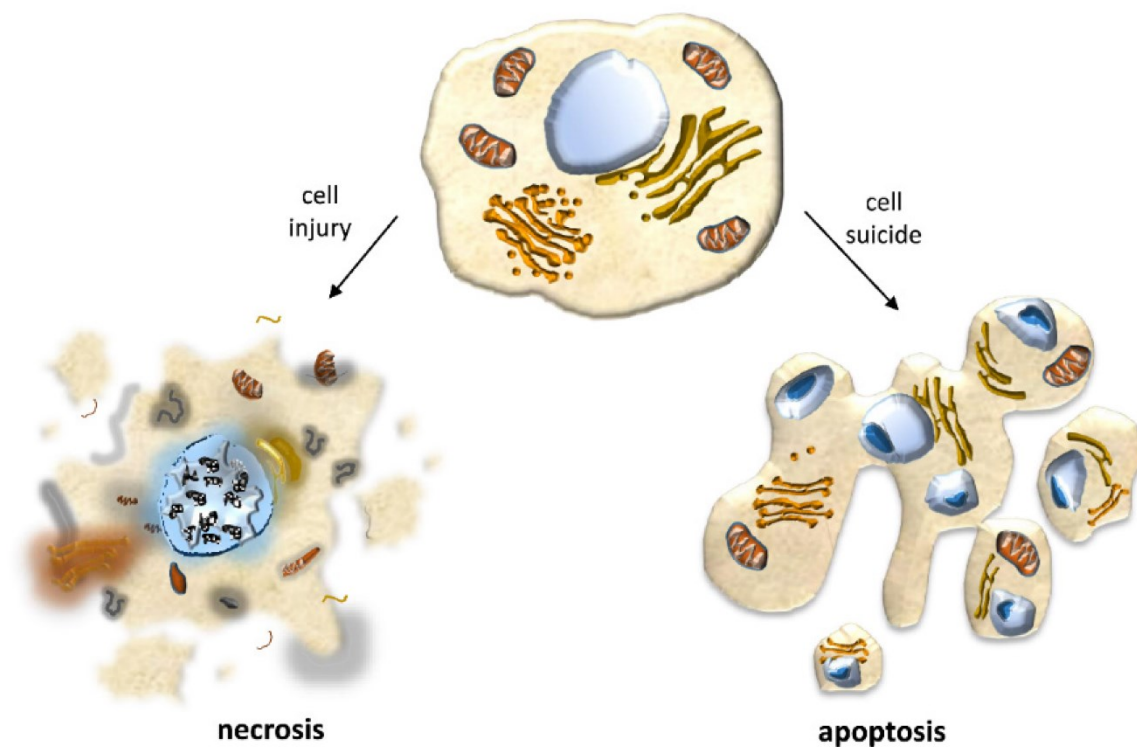


Figure 6 : Différence entre la mort cellulaire programmée, l'apoptose, et la mort cellulaire non programmée, la nécrose (71). Reproduction autorisée par les détenteurs du copyright.

Les 2 types de mort cellulaire sont généralement associés avec différents phénotypes de plaque athérosclérotique, une forte présence d'apoptose étant associée avec un phénotype de plaque plus stable, et, inversement, une forte présence de nécrose étant associée avec un phénotype de plaque instable (72). Cependant, l'association de l'apoptose avec une plaque plus stable peut être trompeuse, étant donné que l'apoptose est uniquement bénéfique à la régression des lésions quand les cellules apoptotiques sont adéquatement retirées du milieu via leur engouffrement par des cellules phagocytaires ou efférocytose. En effet, si les cellules apoptotiques ne sont pas phagocytées assez rapidement, soit dû à la faible présence de phagocytes au niveau des lésions ou encore dû à la présence de cellules apoptotiques en nombre trop important pour que la phagocytose puisse être faite efficacement, les cellules apoptotiques entrent en nécrose secondaire, causant un milieu plus inflammatoire et, en conséquence, une stabilité réduite des plaques est observée. La stabilité des sites lésionnels s'exprime préférentiellement par l'observation de marqueurs spécifiques exprimés par les cellules phagocytaires, comme par exemple MerTK, une molécule pont qui favorise l'efférocytose, ou encore par le ratio représentant le nombre de cellules apoptotiques par rapport au nombre de cellules phagocytaires. De son côté, la nécrose est généralement considérée comme un marqueur représentatif de l'instabilité des plaques athérosclérotiques, en raison des débris cellulaires qui sont libérés dans la matrice extracellulaire suite au bris de la membrane plasmique des cellules nécrotiques, ainsi que le déversement de plusieurs facteurs cellulaires qui induisent la sécrétion de médiateurs proinflammatoires. Par exemple le *High mobility group box 1 protein* (HMGB1), qui est normalement conservé au niveau du noyau cellulaire et relâché lors de la nécrose, se lie aux TLR2 et 4, induisant ainsi la sécrétion de facteurs inflammatoires tels que TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 et la protéine inflammatoire macrophagique (MIP-1a and MIP-1b (72).

Dans un contexte athérosclérotique, de cristaux de cholestérol sont également relâchés par les cellules nécrotiques. Le phénomène de nécrose est donc généralement considéré comme étant proinflammatoire, et participe à l'instabilité des plaques par l'accroissement de la taille des cœurs nécrotiques typiques des lésions athérosclérotiques avancées, en plus d'augmenter la quantité de dépôts lipidiques extracellulaires (72). Les débris cellulaires contiennent également des signaux induisant la phagocytose de ceux-ci, par exemple les peptides formylés, le peroxyde d'hydrogène, l'ATP et l'UTP, la leucotriène B4 (LTB4) et les chimiokines à motif CC et CXC, et si la phagocytose des débris est effectuée efficacement par les phagocytes, comme par exemple les macrophages, l'inflammation ainsi que la taille des zones nécrotiques est diminuée. La diminution de la nécrose peut donc être un marqueur de l'augmentation de la stabilité des lésions athérosclérotiques (73).

1.3.5. Composantes de l'athérosclérose

1.3.5.1 La dyslipidémie

Pour ce qui est de la composante dyslipidémique, les études chez différents modèles expérimentaux de même que chez l'humain ont démontré que l'accumulation de LDL dans l'intima est nécessaire pour le développement et la progression de l'athérosclérose. En effet, le développement des plaques athérosclérotiques débute par l'accumulation des LDL dans l'intima (74), ce qui est favorisé par l'activation de l'endothélium. Les LDL sont ensuite attachées à la matrice extracellulaire via une interaction avec les GAGs, permettant leur oxydation en LDLox par la myéloperoxydase et les espèces réactives d'oxygène sécrétées par les macrophages environnants. Les LDLox peuvent également induire des dommages à l'endothélium, ce qui favorise le recrutement des cellules immunitaires et des monocytes ainsi que l'augmentation de

l'expression des molécules d'adhésion, et favorise également la prolifération de ces cellules et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (75). Certaines composantes spécifiques des LDL induisent l'activation des cellules endothéliales et favorisent l'adhésion des monocytes pour leur entrée dans l'intima, soit le 1-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PGPC) et le 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (POVPC) (76). Dans le même ordre d'idée, les lipoprotéines modifiées, comme par exemple les LDLox peuvent sécréter des phospholipides et médiateurs lipidiques dérivés des phospholipides, comme les prostaglandines formées de l'acide arachidonique provenant des phospholipides, qui vont permettre l'activation de l'endothélium (74). Les lipoprotéines modifiées par oxydation peuvent également générer différents peroxydes ou produits de dégradation, et une oxydation plus importante peut aussi altérer les acides aminés de l'apoprotéine et oxyder le cholestérol (77). Au niveau des plaques matures, les lésions avancées montrent un noyau lipidique, constitué d'un dépôt de cholestérol et de ses métabolites, encapsulé par un cap de fibres de collagène. En plus du cholestérol et de ses métabolites, comme par exemple les oxystérols et l'époxycholestérol (78, 79), plusieurs autres types de lipides peuvent être retrouvés au niveau des plaques, tels que des acides gras oxydés, des phospholipides, des triglycérides et des produits de l'oxydation des lipides (isoprostanes, acides gras hydroxylés, acides gras peroxydés et aldéhydes réactifs) (74).

1.3.5.2 Composante inflammatoire

La composante inflammatoire de la pathologie, cette dernière contribue aux dommages observés au niveau des lésions, notamment avec l'activation précoce des cellules endothéliales, l'accumulation et l'oxydation des LDL, ainsi que l'apparition de cristaux de cholestérol, qui est due à la nécrose des macrophages ou des cellules spumeuses. Les motifs moléculaires associés

aux dommages, ou DAMPs, induisent l'activation de l'inflammasome NLRP3, qui à son tour active la caspase-1, l'agent de clivage qui permet la formation de l'IL-1 β à partir du pro-IL-1 β . Cette activation de l'IL-1 β induit une augmentation de CCL2, une chimiokine sécrétée par les macrophages qui augmente l'expression des molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1 (57). La sécrétion de l'IL-1 β induit également la sécrétion d'IL-6, et de ce fait contribue à l'exacerbation du milieu inflammatoire.

Chez l'être humain, les récepteurs Toll (TLR1, TLR2 et TLR4) sont les plus exprimés dans l'athérosclérose, et sont responsables de l'inflammation qui lui est associée, au moins en partie (68). Les DAMPs activent la signalisation par les TLRs membranaires, notamment la voie de signalisation myeloid differentiation primary response 88 (MyD88), qui permet l'activation de facteurs de transcription proinflammatoires tels que NF κ B. Le TLR4 régule majoritairement le transporteur ABCG1, diminuant son expression, ce qui affecte négativement le transport inverse du cholestérol et donc favorise l'accumulation du cholestérol dans le cytosol. L'accumulation intracellulaire de cholestérol induit donc l'activation des voies de signalisation proinflammatoire. La voie de signalisation du NF- κ B induite par le TLR4 joue un rôle central dans le développement de l'inflammation en athérosclérose. De plus, l'activation de NF κ B augmente la transcription des gènes codant pour le TNF- α , CCL2, IL-8, ICAM-1, VCAM-1 et les sélectines-E et -P, entre autres. Ces facteurs permettent le recrutement des lymphocytes et des monocytes.(10). Les lymphocytes et les monocytes, une fois infiltrés au niveau de l'intima, vont contribuer à la réponse inflammatoire et à sa progression (10, 80). Une autre cytokine contribuant à l'inflammation, TNF- α , peut être synthétisée après l'activation des voies de signalisation de NF- κ B induite par l'activation des TLRs, puis sécrétée (81). Le TNF- α joue un rôle important dans l'initiation de l'athérosclérose, plus spécifiquement dans l'activation et la maturation des leucocytes, la sécrétion

des cytokines proinflammatoires et des chimiokines. Le TNF- α peut également induire la production d'espèces réactive d'oxygène et d'oxyde nitrique, deux facteurs impliqués dans les dommages cellulaires, notamment dans la dysfonction endothéliale, un évènement important de l'initiation des lésions athérosclérotiques. Dans les lésions plus avancées, le TNF- α induit également une augmentation de la mort cellulaire par nécrose, donc inflammatoire, au détriment de la mort cellulaire par voie apoptotique, dite non inflammatoire. D'autres cellules immunitaires, telles que les cellules dendritiques, les cellules T et B ainsi qu'une faible proportion de neutrophiles, sont également recrutées afin de participer au maintien de l'inflammation au niveau des lésions athérosclérotiques via la sécrétion de médiateurs proinflammatoires comme par exemple l'IL-1 β , l'IL-6 ou encore le TNF- α (10). Les cellules T recrutées pendant la progression de la pathologie peuvent à leur tour induire l'expression de cytokines proinflammatoires, par exemple IFN- γ et TNF- β (aussi appelé lymphotoxine), et également stimuler les macrophages, les cellules de l'endothélium et les cellules musculaires lisses vasculaires (80). Dans les lésions avancées, les cytokines proinflammatoires induisent la sécrétion de MMPs, principalement par les cellules musculaires lisses vasculaires de type sécrétoire qui ont migré dans l'intima, et dégradent les fibres de collagène au niveau de la matrice extracellulaire des plaques athérosclérotiques, induisant la formation de plaques vulnérables (10, 82). Les plaques sont ensuite plus à risque de rupture, d'hémorragie et de thrombose (82). Le TNF- α , en plus d'augmenter la formation de zones nécrotiques et de contribuer à l'instabilité des plaques athérosclérotiques, favorise la dégradation de la matrice extracellulaire, et de ce fait est un marqueur de l'instabilité des plaques en plus d'être un marqueur d'inflammation. Certains autres marqueurs inflammatoires jouent également un rôle important dans l'athérosclérose, comme par exemple l'IL-6, qui est considéré comme le signal en amont de l'inflammation athérosclérotique, orchestrant le développement du milieu inflammatoire

des athéromes. L'IL-6, qui est majoritairement sécrété par les monocytes et macrophages en réponse à l'augmentation de la sécrétion d'IL-1, est retrouvée dans les plaques athérosclérotiques dès l'initiation des lésions, et demeure une des principales cytokines favorisant la progression des plaques vers un phénotype instable (83). IL-6, augmente l'expression d'ICAM-1 à la surface endothéliale, en agissant comme un récepteur des intégrines pour les monocytes et augmente la polarisation des macrophages vers le type inflammatoire M1. De plus, IL-6 induit la synthèse hépatique de la protéine C réactive (CRP), qui est elle-même un médiateur important de l'inflammation dans l'athérosclérose (84). Les concentrations plasmatiques de CRP ne sont pas retrouvées dans la circulation sanguine de sujets sains, mais elles augmentent au début du développement des plaques athérosclérotiques et contribuent à la progression des lésions (85). En effet, la CRP contribue à la dysfonction de l'endothélium, au recrutement des leucocytes et peut également lier les LDLox afin de favoriser l'internalisation de celles-ci par les macrophages et donc la formation de cellules spumeuses. La CRP contribue aussi directement à l'inflammation via l'induction de la voie de signalisation de NF- κ B, ainsi qu'en favorisant la sécrétion de CCL2, IL-8 et IL-6, et indirectement en favorisant la polarisation des macrophages en macrophages inflammatoire de type M1. Finalement, CRP joue également un rôle important dans l'instabilité des athéromes via l'augmentation de la sécrétion des MMPs. La CRP joue plusieurs rôles qui augmentent directement ou indirectement l'inflammation (85).

1.4. Récepteur CD36/SR-B2

1.4.1. Structure et rôles du récepteur CD36

Le récepteur CD36 est un récepteur impliqué dans le développement et la progression de l'athérosclérose, et à cet effet représente une cible thérapeutique intéressante pour la pathologie.

Le gène codant pour le CD36, chez l'humain, se trouve sur le chromosome 7, et la séquence de nucléotides correspondante permet le codage de 472 acides aminés, qui forment ensuite le polypeptide mature (86) (Figure 7). Le récepteur a une masse finale de 78–88 kDa, la variation du poids moléculaire dépend du niveau de glycosylation post-traductionnelle du domaine extracellulaire, étant donné que le CD36 a le potentiel d'être grandement glycosylé (86).

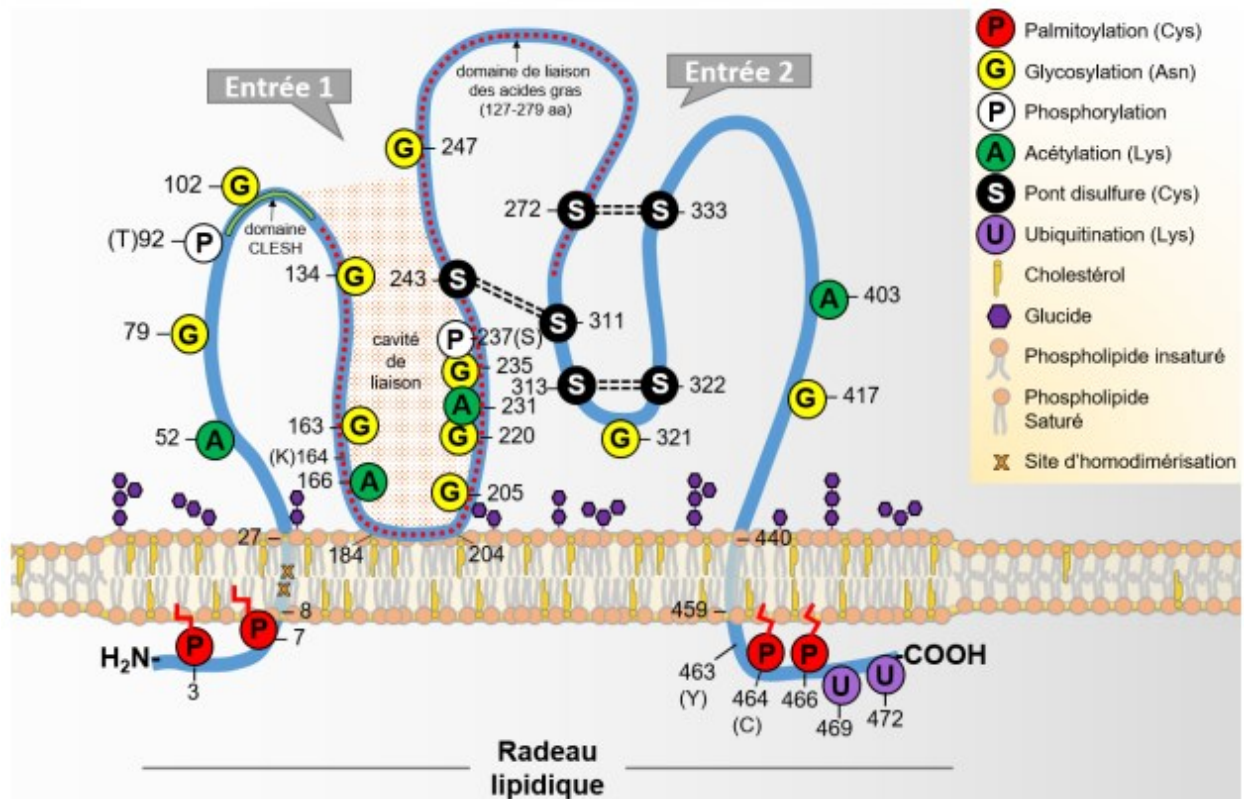


Figure 7 : Structure du récepteur CD36 (87). Reproduit avec permission de l'auteur.

Le récepteur possède deux domaines transmembranaires, avec les extrémités N- et C-terminale intracellulaires et très courtes, et un domaine extracellulaire très étendu. Trois ponts disulfures sont présents au niveau du domaine extracellulaire (88), et des sites de phosphorylation sont retrouvés au niveau des extrémités intracellulaires. Deux sites d'ubiquitination sont présents à l'extrémité intracellulaire C-terminale. Plusieurs ligands du récepteur CD36 montrent des sites de liaison à

différents niveaux du domaine extracellulaire, notamment un site de liaison de la TSP-1 aux acides aminés 93-120 et deux sites associés aux LDLox, dont un majeur aux acides aminés 120-155 et un mineur, mais tout de même significatif aux acides aminés 28-93 (89). Un site de liaison a également été découvert pour les cellules apoptotiques, soit entre les acides aminés 155-183 (89). Le récepteur est exprimé de façon ubiquitaire dans l'organisme, notamment au niveau de l'endothélium microvasculaire, des adipocytes, des cellules musculaires lisses, plaquettes, des monocytes et macrophages, et des pneumocytes de type II, pour ne nommer que les principaux sites (88, 89).

Dépendamment des ligands, le récepteur CD36 peut avoir différents rôles au niveau de l'organisme, toutefois un des rôles les plus reconnus du CD36 est celui de transporteur des acides gras, d'où son ancienne appellation comme récepteur FAT, pour *fatty acid transporter*. Il est possible d'identifier cette fonction du CD36 à plusieurs endroits différents de l'organisme, par exemple au niveau des adipocytes, des cardiomyocytes, des cellules musculaires, des entérocytes et même chez les pneumocytes de type II (88). Par exemple, le CD36 est impliqué au niveau de l'intestin dans l'absorption des lipides et également des vitamines liposolubles (90). En plus d'agir dans la fonction normale de l'organisme, le CD36 possède un rôle au niveau pathologique, soit par exemple dans l'intolérance au glucose, l'hypertension artérielle, le diabète, les cardiomyopathies, l'Alzheimer et également plusieurs types de cancer (88). Le récepteur CD36 a également un rôle important dans l'angiogenèse, via son interaction avec TSP-1, et de ce fait agit au niveau de plusieurs phénomènes non pathologiques, comme la réparation des dommages tissulaires ou encore l'inflammation, mais est également impliqué dans certains phénomènes pathologiques impliquant l'angiogenèse, comme la croissance tumorale. Le CD36 possède la capacité de reconnaître différentes molécules pour activer la phagocytose de particules potentiellement

dommageables pour l'organisme, comme par exemple Staphylococcus, les mycobactéries et certains champignons en plus de différents DAMPs, et est aussi impliqué dans l'immunité innée (90, 91)

1.4.2. Récepteur CD36 dans l'athérosclérose

Le récepteur CD36 est également impliqué dans le développement de l'athérosclérose, où il est exprimé à la membrane des macrophages. Il permet l'internalisation des LDLox, et de ce fait est impliqué directement dans la formation des cellules spumeuses, l'une des composantes importantes des plaques athérosclérotiques (92). Les cellules musculaires lisses expriment également le CD36 et peuvent migrer vers l'intima durant le développement de l'athérosclérose, où elles internalisent également les LDLox et peuvent donc devenir des cellules spumeuses (93). De manière générale, au niveau du système cardiovasculaire, la surexpression du récepteur CD36 induit une accumulation des lipides au niveau du myocarde, en plus d'altérer négativement la fonction cardiaque chez les souris plus âgées. À l'opposé, la déficience en CD36 a un effet cardioprotecteur, par l'utilisation préférentielle du glucose comme base énergétique, ce qui empêche l'apparition de cardiomyopathies dues à la lipotoxicité (94). Son rôle dans l'angiogenèse peut également être observé dans l'athérosclérose, où la formation de nouveaux vaisseaux est caractéristique des plaques athérosclérotiques avancées (95). Comme mentionné précédemment, le CD36 est également impliqué dans la reconnaissance et l'internalisation des cellules apoptotiques, d'un côté en tant que molécule pont (bridging molecule) liant le complexe d'intégrines $\alpha V\beta 3$ dans l'efférocytose, et de l'autre côté par son association aux TLRs pour la reconnaissance des DAMPs et PAMPs (96). Ce rôle est important dans la résolution de

l'athérosclérose, et sa dysfonction induit l'augmentation de la taille des plaques par l'augmentation de leur noyau nécrotique.

1.4.3. Signalisation intracellulaire du récepteur CD36

L'activation du récepteur CD36 par différents ligands permet d'induire différentes cascades de signalisation intracellulaires. Tout d'abord, la liaison des LDLox au récepteur induit l'internalisation de ces particules, et la signalisation intracellulaire subséquente a été décrite précédemment dans la section 1.3.1. La liaison des LDLox au récepteur est également capable d'activer la cascade de signalisation inflammatoire via l'activation de la protéine MyD88, qui permet le recrutement de *l'interleukin-1 receptor-associated kinase 1* (IRAK1), qui ensuite forment un complexe avec le TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) pour activer la *transforming growth factor β -activated kinase 1* (TAK1). TAK1 permet, premièrement, l'activation de la cascade de signalisation des *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), permettant l'activation des protéines p38 (classe de MAPK) et *C-Jun N-terminal kinases* (JNK), et deuxièmement la phosphorylation du complexe I κ B kinase (IKK), activant NF κ B. L'activation de p38 et JNK permet l'activation des facteurs de transcription cAMP response element binding

(CREB) et l'activator protein 1 (AP-1), qui sont transloquées au noyau avec NFκB et agissent directement sur la transcription des cytokines inflammatoires (97) (Figure 8).

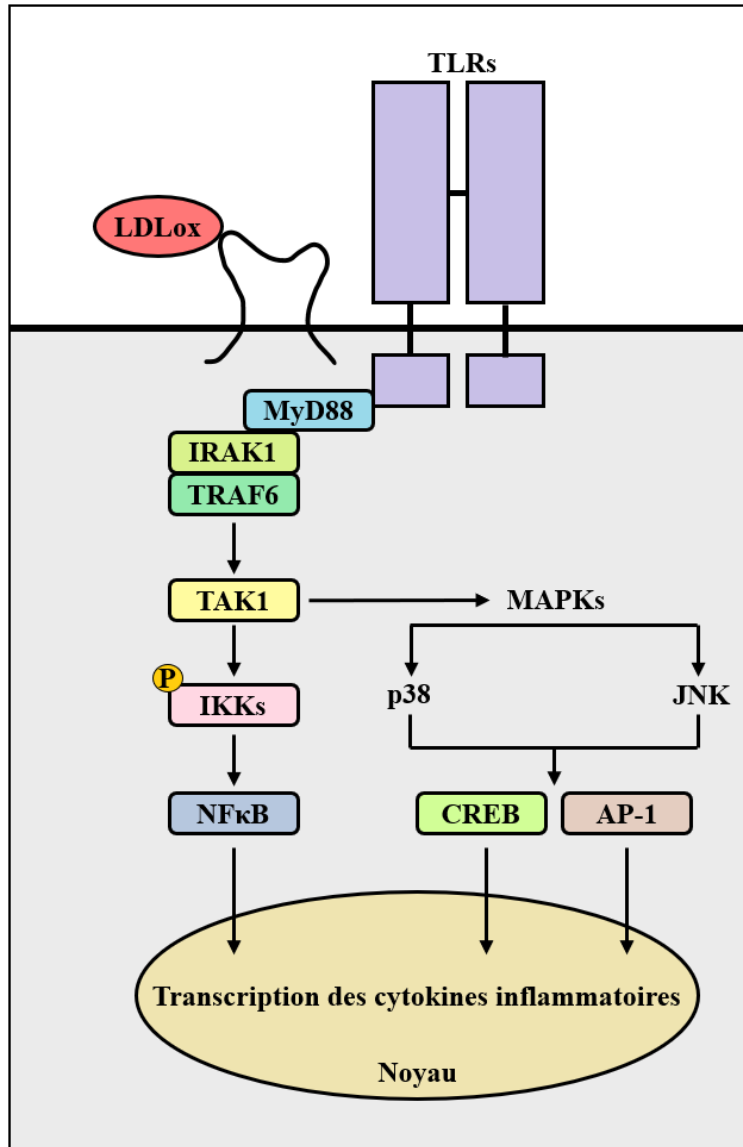


Figure 8 : Cascade de signalisation inflammatoire induite par la liaison des LDLox au récepteur CD36. P : phosphorylation

De son côté, au niveau des cellules endothéliales, la liaison de la TSP-1 au CD36 permet l'interaction du récepteur avec la kinase pp59^{l^yn}, qui est phosphorylée, permettant la formation de la caspase-8 à partir de la procaspase-8, qui active la procaspase-3 en caspase-3. Celle-ci permet l'activation des MAPK, qui ont pour effet d'activer la p38, et donc induit l'apoptose, ce qui inhibe l'angiogenèse (98). En résumé, le récepteur CD36 possède plusieurs ligands endogènes et exogènes différents, qui induisent plusieurs cascades intracellulaires complexes.

1.4.4. Ligands synthétiques du récepteur CD36

Plusieurs ligands synthétiques du CD36 ont été synthétisés. Le sulfo-N-succinimidyl oleate (SSO), est le premier ligand synthétique du récepteur CD36 utilisé dans la littérature, et sa liaison au récepteur inhibe l'internalisation des LDLox par les macrophages (99). À cet effet, le SSO a été étudié comme un traitement potentiel de l'athérosclérose en raison d'une atténuation de la formation des cellules spumeuses. Cependant, le SSO n'est pas un ligand sélectif au récepteur CD36, et agit de manière non spécifique comme bloqueur du transport des acides gras dans plusieurs tissus (100). À cet effet, le SSO n'est plus proposé comme candidat pour l'investigation de traitements potentiels de l'athérosclérose en faveur de composés plus spécifiques, et l'interprétation des résultats obtenus antérieurement doit prendre en compte la non-spécificité du composé. Ensuite, le GHRP-6, His-DTrp-Ala-Trp-Dphe-Lys-NH₂, un ligand plus spécifique et avec une affinité légèrement meilleure pour le CD36, avec un IC₅₀ de 2 µM (101), comparativement au SSO avec un IC₅₀ de 4 µM (102), a été pour la première fois synthétisé et décrit dans une publication dans *Endocrinology* en 1984 (103), est un ligand dérivé de la Met-enképhaline faisant partie du groupe de *growth hormone releasing peptides* (GHRPs). Le GHRP-6 possède une activité neuroendocrine importante, soit la sécrétion de l'hormone de croissance via

sa liaison au récepteur de la ghréline. L'hexaréline, un dérivé du GHRP-6, possède également la même activité neuroendocrine que les autres GHRPs, avec en plus des effets pléiotropes non endocrines au niveau du système cardiovasculaire (104). En plus de leur liaison au récepteur de la ghréline, le GHRP-6 et l'hexaréline peuvent également se lier au CD36, comme la plupart des GHRPs, respectivement aux sites Asn132-Gln177 pour le GHRP-6 (101) et Asn132-Met169 pour l'hexaréline (104), les deux sites chevauchants celui des LDLox, au niveau des acides aminés 120 à 155. Au niveau du récepteur CD36, l'hexaréline possède une affinité légèrement meilleure que le GHRP-6, avec un IC_{50} de 1 μ M (104). L'avantage de l'hexaréline par rapport au GHRP-6 est sa meilleure stabilité pour l'administration *in vivo*, avec une demi-vie de 76 minutes (105), comparativement à la demi-vie de 20 minutes du GHRP-6 (106). La liaison au récepteur CD36 induit un effet cardioprotecteur indépendant de la liaison au récepteur de la ghréline, comme par exemple dans les modèles d'infarctus du myocarde ou d'anévrisme de l'aorte abdominale, où l'hexaréline atténue la formation des lésions (107). Dans la publication de Demers, A. (2004), il a également été démontré que les GHRPs ont un effet sur l'athérosclérose lorsqu'administrés à long terme chez des souris hypercholestérolémiques déficientes en apolipoprotéine E. Le traitement induit donc une diminution des plaques athérosclérotiques de manière dépendante du récepteur CD36 (108).

Dans la banque d'analogues du GHRP-6, l'EP80317 présente une affinité de liaison supérieure envers le CD36 (IC_{50} 1 μ M) par comparaison au récepteur de la ghréline (IC_{50} 3.7 μ M), appelé le *growth hormone secretagogue receptor 1a* (GHS-R1a), et renommé ultérieurement récepteur de la ghréline (109), ce qui lui confère une sélectivité relative envers le récepteur CD36. De plus, la présence d'une lysine en position 3 dans sa séquence lui octroie des propriétés antagonistes du récepteur de la ghréline (101, 108, 110). Donc, comparativement aux sécrétines de l'hormone de

croissance, l'EP80317 n'affecte donc pas de façon significative la sécrétion d'hormone de croissance aux doses utilisées (94). Au niveau de son effet médié par sa liaison au récepteur CD36, l'administration chronique de l'EP80317 dans un contexte pathologique d'athérosclérose réduit l'internalisation des LDLox au niveau des macrophages et augmente l'efflux du cholestérol en augmentant l'expression de différents gènes associés, par exemple PPAR γ , LXR α , ABCA1 et ABCG1, ce qui diminue la formation de cellules spumeuses. Le traitement des souris déficientes en apoE, avec l'EP80317 permet donc une diminution des lésions athérosclérotiques observées au niveau de l'aorte complète, en plus de diminuer le taux de cholestérol plasmatique (108). L'EP80317 altère également la sécrétion des cytokines inflammatoires par les monocytes et macrophages, plus spécifiquement diminue de la sécrétion de l'IL-1 β , de l'IL-6, du TNF- α , du CCL3 et du PGE2, prouvé *in vitro* (111). De plus, toujours au niveau cardiovasculaire, le prétraitement par l'EP 80317 avant une ischémie transitoire au niveau du ventricule gauche a montré un effet cardioprotecteur chez la souris, diminuant la taille de l'infarctus. Les acides gras non estérifiés (AGL, ou non-esterified fatty acids, NEFA) sont également affectés par le traitement, qui diminue leur internalisation par les cardiomyocytes, en plus d'induire une diminution transitoire (48h) des AGL plasmatiques (94).

Ces résultats ont encouragé le développement d'une banque de composés azapeptidiques linéaires comme ligands du récepteur CD36, présentant un groupement Aza, soit le remplacement d'un atome de carbone par un atome d'azote, au niveau de différents acides aminés. Cette banque a été synthétisée par l'équipe du professeur Dr Willam D. Lubell (112-114), du Département de chimie de l'Université de Montréal. Dans ce groupe de molécules, deux azapeptides ont montré des effets thérapeutiques potentiels dans diverses pathologies, MPE-001 ([aza-Tyr⁴]-GHRP-6) et MPE-003 (His-D-Trp-Ala-[aza-(N,N-diallylaminobut-2-ynyl)Gly⁴]-D-Phe-Lys-NH₂). Ces azapeptides

montrent aussi une affinité comparable à leurs prédécesseurs, avec un IC₅₀ d'environ 1 µM (115). Le MPE-001 a été utilisé dans un contexte pathologique de dégénérescence maculaire, où le peptide a montré des effets anti-inflammatoires, notamment au niveau des phagocytes mononucléés. En effet, le MPE-001 induit la dissociation du récepteur CD36 du TLR2, réduisant l'activation de l'inflammasome NLRP3 ainsi que de NFκB, en plus de modifier le métabolisme des phagocytes mononucléés. De plus, il permet d'activer le PPAR-γ, qui induit un effet anti-inflammatoire en inhibant l'effet de NFκB et donc diminue la production de l'IL-1β, l'IL-6, le TNFα, COX-2 et iNOS (116). La diminution de l'inflammation permet de diminuer les dommages au niveau de la macula qui sont caractéristiques de la pathologie. Le MPE-001 permet donc la préservation de la fonction des photorécepteurs et inhibe leur dégradation (97). Le MPE-001 a également été utilisé chez la souris dans le traitement de l'athérosclérose, où une diminution de la progression des lésions athérosclérotiques est associée à une diminution de VCAM-1 et des macrophages totaux et de type M1 inflammatoire, indiquant un phénotype moins inflammatoire de la pathologie (117). Pour ce qui est du MPE-003, le peptide a été testé chez un modèle murin d'athérosclérose, où il a montré, similairement au MPE-001, une diminution des lésions athérosclérotiques. De plus, le peptide a également montré une diminution du ratio de cellules iNOS⁺/CD206⁺, ce qui suggère une réduction du nombre de macrophages inflammatoires, associé à une réduction de plusieurs cytokines inflammatoires au niveau plasmatique (118).

Une nouvelle série de peptides azapeptidiques cycliques a été synthétisée montrant une stabilité et une sélectivité accrue *in vitro* (119). L'azapeptide MPE-298 (Ala-AzapropargylGly-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys(allyl)-NH₂) ayant montré une forte affinité envers le récepteur CD36 (IC₅₀ de 0,1 µM) a été sélectionné pour l'investigation de ses effets anti-athérosclérotiques potentiels dans

l'athérosclérose (120). Le MPE-298 et ses prédécesseurs linéaires sont représentés dans la Figure 9.

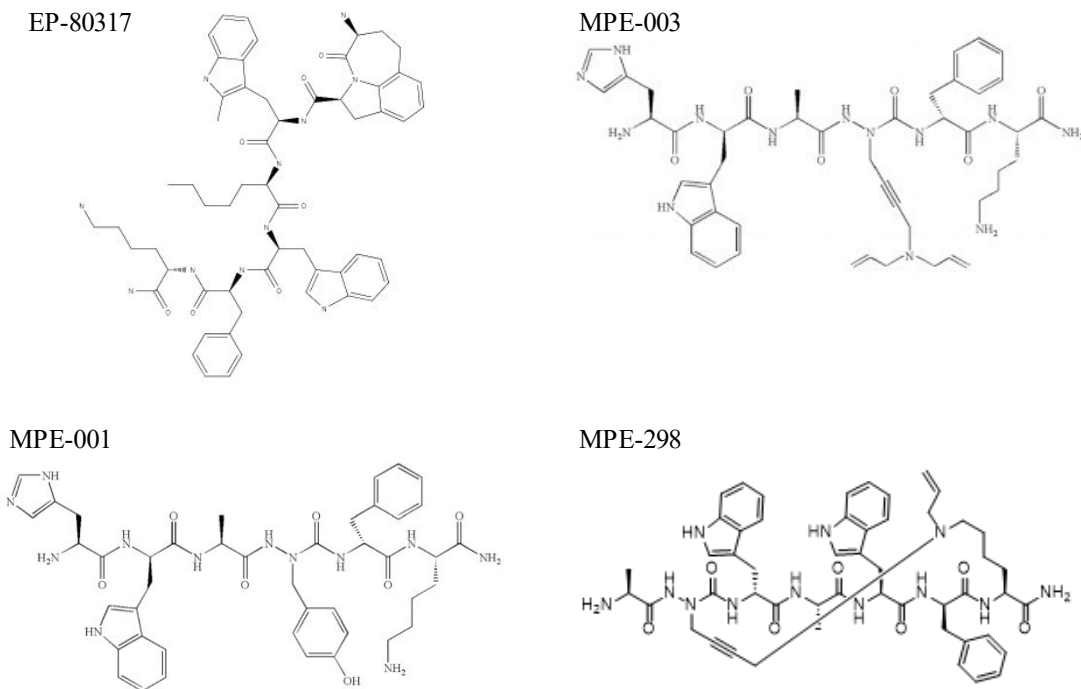


Figure 9. Structures des ligands du récepteur CD36.

1.5. Modèles animaux d'athérosclérose

Pour l'expérimentation *in vivo* de l'athérosclérose, certains modèles sont plus utilisés que d'autres. Pour ce qui est des espèces fréquemment utilisées dans l'expérimentation en athérosclérose, les deux modèles principaux sont les lapins et les souris. Le lapin est un modèle au coût relativement raisonnable, et est généralement facile à manipuler. Cependant, les diètes permettant le développement d'athérosclérose chez le lapin sont très éloignées de sa diète normale, et, de ce fait, une haute teneur en cholestérol, nécessaire pour le développement d'une

hypercholestérolémie, cause une inflammation sévère ainsi qu'une toxicité hépatique chez le lapin (121). La souris est le modèle le plus répandu en recherche, majoritairement dû à son faible coût comparativement à d'autres espèces, en plus d'être facilement manipulable génétiquement et d'avoir une reproduction rapide. De plus, le développement de l'athérosclérose se produit dans un laps de temps raisonnable. Les souris sont également modifiables génétiquement, ce qui permet l'utilisation d'un modèle modifié pour être plus proche de la pathologie chez l'humain. D'autres modèles utilisés moins fréquemment que le lapin et la souris sont le cochon, qui se rapproche beaucoup plus de l'humain au niveau physiologique et anatomique, mais qui est assez coûteux et également difficile à manipuler, et finalement le primate, qui est le modèle le plus rapproché de la physiopathologie humaine, mais représente un des modèles d'étude le plus coûteux et le plus régulé, en plus de nécessiter des installations spécialisées et d'être un modèle difficile à manipuler. Ces deux modèles ne sont donc généralement pas les plus populaires pour l'athérosclérose (121).

Chez la souris, qui est généralement acceptée comme étant un modèle pratique et peu coûteux, la formation d'athérosclérose chez les souris sauvages (*Wild Type*) non modifiées n'est pas possible, étant donné que la taille de leurs lipoprotéines en circulation est plus importante, soit une majorité de HDL, qui sont impliquées dans la clairance du cholestérol, et une quantité plus faible de LDL, qui sont à la base de la formation de lésions athérosclérotiques. Le cholestérol libre pour la formation des lésions athérosclérotiques n'est donc pas, seul, suffisamment important pour l'accumulation lipidique au niveau de l'intima, et rend donc les souris sauvages résistantes au développement de l'athérosclérose (121). La modification génétique est donc nécessaire pour l'utilisation du modèle pour cette pathologie, afin de contourner leur résistance. Toutefois, plusieurs modifications génétiques peuvent être effectuées pour produire l'hypercholestérolémie et déclencher la formation de lésions athérosclérotiques. Deux modèles génétiquement modifiés,

les souris déficientes en LDLR et celles déficientes en apoE, sont les 2 modèles les plus communément utilisés. Premièrement, le modèle déficient en LDLR résulte en l'accumulation des LDL dans l'intima des vaisseaux, étant donné que les récepteurs des LDL sont responsables de la clairance des LDL du milieu extracellulaire et leur internalisation par les cellules, montre un niveau plasmatique de cholestérol plus élevé que les souris *Wild Type*, ce qui est légèrement visible lorsque les souris sont placées sous une diète normale, mais beaucoup plus prononcé sous une diète riche en lipides comme par exemple une diète dite occidentale (western diet). La modification génétique permet le développement de petites lésions athérosclérotiques même sans être soumise à une diète riche en lipides, mais l'effet est beaucoup plus visible lorsque la diète est administrée (121). Deuxièmement, chez les souris déficientes en apoE, une glycoprotéine ligand de la protéine 1 liée au récepteur des lipoprotéines de basse densité (LRP1), impliquée dans la clairance des résidus de chylomicrons et de VLDL qui empêche la formation de cellules spumeuses caractéristique du développement de l'athérosclérose. La déficience permet une augmentation du cholestérol plasmatique total tout comme les souris LDLR^{-/-}, une augmentation qui peut être exacerbée jusqu'à quatre fois les niveaux observés avec une diète normale lorsque les souris sont nourries avec une diète riche en lipides et en cholestérol. En effet, la clairance des lipoprotéines est réduite, ce qui augmente l'accumulation lipidique au niveau des vaisseaux sanguins, favorisant le développement athérosclérotiques (122). Toutefois, contrairement aux souris LDLR^{-/-} qui sans l'apport d'une diète appropriée ne peuvent pas développer une hypercholestérolémie suffisamment avancée pour le développement des lésions athérosclérotiques, les souris apoE^{-/-} sont capable d'induire une hypercholestérolémie suffisamment sévère pour le développement d'athérosclérose sans l'appui d'une diète riche en lipides (123). L'absence d'apoE rend également les souris plus susceptibles aux lipides de la diète, ce qui augmente le taux plasmatique de cholestérol et donc

augmente la vitesse de progression des lésions athérosclérotiques, ce qui en fait un modèle de développement plus rapide que le LDLR^{-/-}. Le développement des lésions chez les souris apoE^{-/-} suit également les étapes développementales observées chez d'autres espèces plus grandes et chez l'humain. Cependant, un point négatif du modèle est qu'il génère une inflammation plus intense que celle observée chez le modèle humain, ce qui peut être à considérer selon le sujet de la recherche (121).

Un autre modèle intéressant pour l'investigation de l'athérosclérose est le modèle apoE3-Leiden, qui est associé à une forme génétique d'hypercholestérolémie présente dans certaines familles néerlandaises. Sous une diète normale, les souris démontrent une faible formation de cellules spumeuses, pas suffisamment pour induire le développement d'athérosclérose, mais les souris montrent une réactivité accrue aux lipides, aux sucres et au cholestérol dans leur diète, de sorte que leurs profils lipidiques sont grandement augmentés par ces facteurs. Leur grande réactivité à la diète permet donc la formation de lésions avancées très rapidement. Un autre modèle de souris pour l'athérosclérose est le modèle PCSK9-DY (D377Y) - adeno-associated viral vector (AAV), qui est induit par une injection virale. L'effet de l'injection peut être observé seulement 4 semaines post-injection, les souris montrant une hypercholestérolémie avec un taux plasmatique de cholestérol doublé par rapport aux valeurs préinjections, et qui est maintenu sans réinjection, indiquant que celle-ci permet d'induire une hypercholestérolémie chronique. L'effet d'une seule injection du vecteur viral permet la formation de lésions athérosclérotiques similaires à celles obtenues avec un modèle de souris LDLR^{-/-}, et plus la dose injectée est importante, plus les lésions induites sont importantes. La formation de lésions peut être expliquée par le gain de fonction de la PCSK9 induit par l'injection, qui est une protéine qui dégrade les LDLR et donc induit une accumulation des LDL dans l'intima des vaisseaux due à la diminution de leur clairance (124).

Ces lésions peuvent être augmentées par l'utilisation d'une diète haute en lipides en plus de l'injection. L'injection peut également être administrée à des souris transgéniques comme les souris apoE^{-/-}, chez lesquelles les lésions observées peuvent même doubler de superficie. Tous les modèles décrits précédemment peuvent être utilisés pour l'investigation du développement et de la progression de l'athérosclérose, en prenant compte de leurs faiblesses et de leurs forces. Cependant, ces modèles montrent une lacune commune qui les éloigne du modèle athérosclérotique humain, c'est-à-dire que ces modèles montrent rarement des plaques athérosclérotiques instables, prédisposées à la rupture. En effet, ces modifications induisent plutôt un phénotype de plaques rigides, forte en collagène et fibrine, avec de grandes chances de calcification. À cet effet, les plaques sont rarement sujettes à la rupture, donc ne causent généralement pas de complications comme des thromboses, ce qui est une caractéristique assez commune des plaques athérosclérotiques humaines. Un autre modèle a donc été créé pour l'investigation de l'instabilité et de la rupture des plaques, soit le modèle apoE^{-/-} Fbn1^{C1039G+/-}. La mutation du gène Fbn1 induit le syndrome de Marfan, qui est un désordre génétique agissant sur la fragmentation des fibres élastiques, et de ce fait induit la formation de plaques hautement instables, qui sont donc à risque de rupture. Les plaques athérosclérotiques résultantes de cette mutation ont donc une plus grande superficie, avec un cœur nécrotique plus étendu et moins de collagène, en plus de montrer un phénotype généralement plus inflammatoire, avec plus de macrophages inflammatoires M1 ainsi qu'avec une augmentation locale des cytokines inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IL-6. Toutefois, même s'il s'agit d'un modèle idéal pour l'investigation des plaques athérosclérotiques instables et de leur rupture, les souris apoE^{-/-} Fbn1^{C1039G+/-} ne sont pas un modèle viable pour l'investigation du développement et de la progression de l'athérosclérose à long terme, car la formation de plaques hautement instables

augmente les chances de thrombus et autres conséquences du même type, et à cet effet le taux de mortalité de ces souris est très élevé comparativement aux autres modèles. En effet, la mort spontanée des souris est souvent observée avec ce modèle, causée par un infarctus du myocarde, surtout avec une diète riche en lipides (124).

1.6. Traitements de l'athérosclérose

Des agents pharmacologiques sont actuellement disponibles pour le traitement de l'athérosclérose, comme les statines et l'anti-PCSK9, et d'autres sont présentement en développement, comme les inhibiteurs de la phospholipase A2. Les cibles de ces traitements sont variées, tout comme leurs mécanismes.

1.6.1. Hypolipémiants

1.6.1.1. Statines

Premièrement, les statines, comme l'atorvastatine, la fluvastatine, la pravastatine, etc. font partie de la catégorie de molécules les plus souvent mentionnées dans la littérature quand il s'agit du traitement des lésions athérosclérotiques, en plus d'être un des médicaments les plus utilisés dans le monde. Les statines inhibent la synthèse du cholestérol en inhibant l'enzyme hydroxyméthylglutaryl-CoA réductase (HMG-CoAR) (10). L'HMG-CoAR est l'enzyme limitante de la biosynthèse du cholestérol, qui catalyse la formation du mévalonate. Si la HMG-CoAR est inhibée, le mévalonate ne sera pas synthétisé, ni transformé en squalène, puis en lanostérol, et finalement en cholestérol (31, 32). La quantité de cholestérol intracellulaire est donc diminuée, ce qui diminue la quantité d'ions calciques au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique,

déclenchant l'activation du facteur de transcription SREBP-2 (125). Le SREBP-2 permet l'augmentation du gène du LDLR, de la PCSK-9 et également de la HMG-CoA réductase. Les LDLR induits ont pour effet d'augmenter la clairance des LDL circulantes, alors que la PCSK-9, dégradant directement les LDLR, entrave directement l'effet des LDLR. L'HMG-CoA réductase est induite pour compenser la perte de la biosynthèse du cholestérol occasionnée par les statines (126, 127). En somme, les statines permettent tout de même à diminuer le cholestérol circulant (10). Comme l'accumulation de cholestérol est nécessaire pour la formation des LDL et donc pour le développement des lésions athérosclérotiques, l'utilisation des statines inhibe la formation de plaques athérosclérotiques. Plus récemment, il a été déterminé que les statines possédaient également une composante anti-inflammatoire, via la réduction de la synthèse de molécules inflammatoires telles que la CRP (128), des molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1, réduisant ainsi l'adhérence et l'infiltration des monocytes, un type cellulaire important pour l'initiation de l'inflammation dans l'athérosclérose (10). Dans des plaques d'athérosclérose avancées, les statines peuvent réduire la sécrétion des MMPs par les cellules vasculaires lisses de type sécrétoire et les macrophages. En réduisant l'expression des MMPs, les statines augmentent la stabilité des plaques et les rendent moins à risque de rupture (129). Toutefois, les statines ont plusieurs effets secondaires possibles qui peuvent être potentiellement graves, le plus fréquemment mentionné étant les douleurs musculaires, ou myalgies (130). En effet, la prise de statines peut induire une myopathie, un désordre des muscles qui peut induire de la fatigue, des douleurs et/ou faiblesses musculaires, des crampes nocturnes, ou de la douleur au niveau des tendons, et des changements morphologiques chez les cellules musculaires (131), incluant une possible dysfonction mitochondriale et un stockage des lipides augmenté (130). Par rapport aux effets secondaires plus rares, les statines peuvent induire une protéinurie et une hématurie, en plus d'un

potentiel d'effet secondaire neurologique, étant donné que les statines sont des molécules lipophiles et peuvent traverser la barrière hématoencéphalique (130).

1.6.1.2. Inhibiteurs de la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9

La proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9) est une protéine impliquée dans la dégradation du LDLR, plus spécifiquement via sa liaison directe au récepteur. Au niveau intracellulaire, la PCSK9 peut lier le LDLR afin de le guider du trans-Golgi aux lysosomes, où il est ensuite dégradé (132). La PCSK9 sécrétée peut également se lier aux motifs *epidermal growth-factor-like domain A* (EGF-A) des LDLR présents au niveau de la membrane cellulaire, ce qui empêche le recyclage des récepteurs après leur internalisation, ce qui induit éventuellement sa dégradation avec la PCSK9 liée (133-135). Une augmentation de la PCSK9 est généralement associée à un effet proathérogène, étant donné que la perte du LDLR induit une augmentation de l'athérosclérose, via l'induction d'hypercholestérolémie causée par la diminution de l'internalisation des LDL et donc l'accumulation extracellulaire du cholestérol, et, en contrepartie, la perte de fonction de la PCSK9 induit le maintien des LDLR à la membrane pour une plus longue période, ce qui permet une diminution des niveaux plasmatiques de LDL (136, 137) et est donc généralement associé à un effet anti-athérosclérotique. La PCSK9 est exprimée à différents endroits au niveau des plaques athérosclérotiques, où la PCSK9 augmente l'internalisation des LDLox, d'une part en induisant l'internalisation des LDLox par les récepteurs éboueurs, par exemple CD36 et LOX1, et d'autre part en inhibant l'action du récepteur ABCA1 (138). De plus, la PCSK9 peut se lier au récepteur ApoER2 et induire son internalisation et sa dégradation, et comme le récepteur ApoER2 est un ligand majeur du LDLR est impliqué dans le transport inverse du cholestérol, sa perte induit l'accumulation de cholestérol intracellulaire. En somme, en affectant

le transport du cholestérol à plusieurs endroits, la PCSK9 contribue à la formation des cellules spumeuses (138). La PCSK9 est majoritairement exprimée par le foie, ainsi que les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) (139). En plus d'agir directement sur la composante dyslipidémique de l'athérosclérose, la PCSK9 agit également sur l'entrée des monocytes au niveau des lésions athérosclérotiques, via la dégradation des LDLR sur les monocytes qui augmente les LDL cholestérol en circulation (140). L'augmentation des LDL cholestérol induit l'augmentation de l'expression de CCR2 à la surface des monocytes, qui, en raison de l'expression de CCL2 au niveau des lésions athérosclérotiques, sont recrutés de façon plus importante (140). Comme les monocytes jouent un rôle important dans la progression du phénotype inflammatoire via l'augmentation des cytokines et médiateurs inflammatoires, la PCSK9 affecte donc également la composante inflammatoire de la maladie (141). L'utilisation d'anticorps contre la PCSK9 agit donc à différents niveaux de la progression de l'athérosclérose, autant en diminuant l'accumulation lipidique au niveau de l'intima qu'en inhibant indirectement l'inflammation. D'autres cibles de la PCSK9 incluent le récepteur des lipoprotéines de très basse densité (VLDLR), le récepteur CD36, le récepteur 2 de l'apolipoprotéine E (apoER2) et la LRP1 (142). Les anticorps contre la PCSK9, plus spécifiquement l'evolocumab, un anticorps monoclonal immunoglobuline G2 (IgG2), et l'alirocumab, un anticorps monoclonal IgG1, sont deux inhibiteurs de la PCSK9 présentement disponibles au Canada qui sont généralement bien tolérés, les patients rapportant très peu d'effets secondaires importants. Les effets secondaires les plus notables rencontrés sont des symptômes similaires à une infection à l'influenza (28%), des nasopharyngites (16%), de l'inconfort abdominal (12%) ainsi que de possibles myalgies (10%), en plus de possibilités de réaction au site d'injection (143). D'autres effets plus rares incluent la fatigue,

les maux de tête, les maux de dos et l'arthralgie. Les probabilités des différents effets secondaires diffèrent selon les inhibiteurs utilisés (143).

1.6.1.3. Inhibiteurs de la phospholipase A2

Les inhibiteurs de la phospholipase A2 (PLA₂), agissent majoritairement sur 2 types de PLA₂ impliqués dans l'athérosclérose, la phospholipase A2 associée aux lipoprotéines (LP-PLA₂), inhibée par des molécules telles que le darapladib, et la phospholipase A2 sécrétée (sPLA₂), qui est inhibée par exemple par le varespladib, un inhibiteur enzymatique (144, 145). Dans l'athérosclérose, les différents types de PLA₂, LP-PLA₂ et sPLA₂, sont associés aux lipoprotéines et à la modification des phospholipides au niveau des particules de LDL, et de ce fait favorisent le développement d'athérosclérose, soit plus précisément en diminuant l'efflux de cholestérol cellulaire et en augmentant la formation de cristaux de cholestérol en plus de favoriser l'inflammation au niveau des plaques athérosclérotiques et de réduire leur stabilité en favorisant l'apoptose et la nécrose des cellules (10, 144-147). L'utilisation des inhibiteurs de la PLA₂ a donc un effet à tous les niveaux de la progression de l'athérosclérose, en inhibant autant le développement que la progression de l'athérosclérose, en plus de réduire les dépôts lipidiques et la mort cellulaire. Des traitements ciblant les deux PLA₂ séparément sont à l'étude (144).

1.6.1.4. Autres agents hypolipidémiant

Plusieurs médicaments hypolipidémiant sont présentement disponibles au Canada pour la prévention d'évènements cardiovasculaires. La cholestyramine est un séquestrant des sels biliaires, qui se présente sous forme de larges polymères liants les sels biliaires au niveau de l'intestin grêle,

afin d'empêcher leur réabsorption dans la circulation. Le traitement permet la diminution du LDL-cholestérol plasmatique, et de ce fait permettrait de diminuer le développement de lésions athérosclérotiques (148). Cependant, plusieurs essais cliniques ont montré des effets mitigés par rapport à l'effet des séquestrants des acides biliaires sur la diminution du risque de maladie cardiovasculaire, où seulement un effet modeste est observé (149). De ce fait, la cholestyramine est rarement utilisée dans des conditions associées à l'hypercholestérolémie, comme l'athérosclérose (150).

Ensuite, les fibrates sont des ligands agonistes spécifiques du récepteur PPAR γ , un régulateur du métabolisme lipidique (151). Le traitement permet la diminution des triglycérides ainsi que l'augmentation des HDL, en plus d'avoir un effet anti-inflammatoire indirect en diminuant VCAM et CCL2. De plus, les fibrates favorisent l'internalisation des acides gras par les transporteurs d'acides gras au niveau du foie ainsi qu'une réduction modeste des LDL en circulation (152). L'effet général des fibrates permet une certaine diminution du risque d'angine et d'infarctus, mais ne permet pas cependant de réduire l'incidence des décès associés aux maladies cardiovasculaires (153). À cet effet, comparativement aux statines, le traitement le plus utilisé en athérosclérose présentement, les fibrates sont considérés comme étant moins efficaces, et sont donc généralement moins utilisés dans la prévention d'événements cardiovasculaires (152). Cependant, les fibrates peuvent être utilisées en association avec les statines afin d'augmenter leur potentiel thérapeutique et normaliser le profil lipidique des patients (154, 155).

1.6.2. Anti-inflammatoires

Comme mentionné précédemment, l'athérosclérose comporte une importante composante inflammatoire, et à cet effet l'augmentation des différents facteurs inflammatoires favorise la

progression de l'athérosclérose. De ce fait l'expression augmentée de plusieurs médiateurs inflammatoires dans l'athérosclérose représente généralement un phénotype de plaque plus vulnérable, comportant des zones nécrotiques étendues. Plus spécifiquement, les concentrations de plusieurs cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation sont augmentés lors de l'athérosclérose, dont IL-1 β , IL-6, TNF- α et IFN- γ , ainsi que l'expression de l'enzyme 5-lipoxygénase (5-LO), qui jouent un rôle important dans le développement et la progression de l'athérosclérose (10), d'où l'intérêt pour les thérapies agissant sur ces différentes molécules inflammatoires. L'intérêt de l'utilisation des anti-inflammatoires pour le traitement de l'athérosclérose est qu'il s'agit généralement de traitements déjà approuvés pour l'utilisation clinique dans le traitement de différentes pathologies, et donc que la molécule est déjà considérée sécuritaire. Quelques exemples de traitements possibles sont le tocilizumab, un anticorps monoclonal humanisé contre le récepteur de l'IL-6 (10), et la colchicine, un anti-inflammatoire communément utilisé contre la goutte, la péricardite et la fièvre intermittente méditerranéenne (156). Toutefois, les différentes cibles des anti-inflammatoires ont montré une efficacité variable en athérosclérose. Par exemple, le canakinumab, un anticorps monoclonal de type IgG_k inhibiteur de l'IL-1 β , a été testé pour déterminer son potentiel anti-athérosclérotique dans une étude clinique internationale (157, 158), mais a montré des effets mitigés, soit que le canakinumab, en inhibant l'IL-1 β , permet de diminuer, mais ne permet pas d'éliminer complètement le risque inflammatoire observé dans l'athérosclérose par l'action de l'IL-18 et de l'IL-6. En effet, l'inhibition de l'IL-1 β permet de diminuer les niveaux d'IL-6, mais n'a pas d'effet significatif sur le développement de l'athérosclérose, car l'IL-18, une autre cytokine clivée en forme active par l'inflammasome NLRP3 induit également la sécrétion de l'IL-6 (158). Par contre, l'utilisation d'un inhibiteur de l'inflammasome NLRP3 aurait un effet anti-athérosclérotique plus puissant, car il agit en amont

de la voie de signalisation, et à cet effet permettrait de contourner la problématique de redondance entre les effets de l'IL-1 β et de l'IL-18 sur la sécrétion de l'IL-6. Cependant, les inhibiteurs du NLRP3 ont seulement atteint récemment la phase d'expérimentation clinique (159). L'utilisation d'anti-inflammatoires non-spécifiques est également une avenue thérapeutique possible, car leur effet généralisé permet de contourner le problème de redondance des cytokines. La colchicine, un anti-inflammatoire général a été récemment approuvé au Canada et aux États-Unis pour le traitement des maladies cardiovasculaires, et a montré son potentiel pour diminuer les risques d'accidents cardiovasculaires (160). En conclusion, bien que les anti-inflammatoires spécifiques soient toujours en développement, les anti-inflammatoires généraux sont déjà une avenue de traitement importante afin de contourner l'effet de redondance des cytokines.

1.7. Hypothèse de recherche

Le chapitre précédent nous indique que de nouvelles avenues thérapeutiques dans le traitement de l'athérosclérose seraient souhaitables. Comme mentionné précédemment, le MPE-298 fait partie d'une nouvelle série d'azapeptides synthétisée avec l'objectif d'obtenir des molécules chimiquement plus stables. À cet effet, le MPE-298 a été choisi parmi la série d'azapeptides cycliques, car il s'agit du peptide avec la meilleure affinité pour le récepteur CD36. Notre hypothèse était donc « qu'un traitement prolongé avec l'azapeptide cyclique réduirait la progression des plaques et augmenterait la stabilité des lésions en réduisant l'apoptose et la nécrose chez des souris soumises à une diète riche en lipides et en cholestérol. »

Cette hypothèse était largement basée sur nos études antérieures avec les azapeptides linéaires lesquels ont montré un effet anti-athérosclérotique et anti-inflammatoire (118). L'effet anti-

inflammatoire, pouvant être associé à une augmentation de la stabilité des plaques, a été étudiée dans la présente étude.

1.8. Objectifs spécifiques

L'objectif du projet était donc de caractériser les effets de l'azapeptide MPE-298 dans l'athérosclérose en utilisant un modèle murin déficient en ApoE hypercholestérolémique, comparé à un groupe véhicule (NaCl 0.9%) et à un azapeptide linéaire de référence, le MPE-003, connu pour ses propriétés anti-athérosclérotiques (118).

En particulier, nous avons déterminé

- 1) La surface des lésions au niveau de la crosse et du sinus aortiques
- 2) La présence de marqueurs d'efférocytose au niveau de lésions matures des BCA
- 3) L'apoptose, la nécrose et la mesure de certains marqueurs d'instabilité des plaques au niveau des sinus aortiques et des BCA
- 4) La fibrose et la polarisation des lésions au niveau des artères brachiocéphaliques

Chapitre 2 : A cyclic azapeptide ligand of the scavenger receptor CD36/SR-B2 reduces the atherosclerotic lesion progression and enhances plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice

Publié le 30 mai 2023 dans le journal *Frontiers in Pharmacology*, dans la section *Experimental Pharmacology and Drug Discovery*

<https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1204905> (161)

A cyclic azapeptide ligand of the scavenger receptor CD36/SR-B2 reduces the atherosclerotic lesion progression and enhances plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice

Jade Gauvin¹, Geneviève Frégeau¹, Hanan Elimam^{2,3}, Liliane Ménard¹, David Huynh¹, Catherine Lê¹, Ahsanullah^{4,5}, William D. Lubell⁴, Huy Ong¹, Sylvie Marleau^{1*}

¹Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

² Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Sadat City, Sadat City 32958, Egypt

³Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Sinai University-Kantara Branch, Ismailia 41636, Egypt.

⁴Department of Chemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

⁵Department of Chemistry, Quaid-i-Azam University, Islamabad, 45320, Pakistan

* **Correspondence:** Sylvie Marleau, sylvie.marleau@umontreal.ca

Keywords: Atherosclerosis¹, CD36², azapeptide³, lesion stability⁴, efferocytosis⁵, macrophages⁶, necrosis⁷.

Abstract

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease of the arterial walls that develops at predisposed sites. As a major risk factor for adverse cardiovascular pathology, atherosclerosis can progress to myocardial infarction and stroke, due to the rupture of unstable atherosclerotic lesions. Macrophage uptake of modified lipoproteins and metabolic dysfunction contributes significantly to the initiation and development of atherosclerotic lesions. The cluster of differentiation 36 receptor [CD36 (SR-B2)] plays a key role in atherosclerotic lesion progression and acts as an efferocytic molecule in the resolution of advanced plaque. In previous studies, linear azapeptide CD36 ligands were shown to exhibit anti-atherosclerotic properties. In the present study, a novel potent and selective macrocyclic azapeptide CD36 ligand, MPE-298, has proven effective in protecting against atherosclerosis progression. Features of greater plaque stability were observed after 8 weeks of daily injections with the cyclic azapeptide in apolipoprotein E-deficient mice fed a high-fat high-cholesterol diet.

Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) account for the highest number of non-communicable disease deaths and premature deaths globally (Khan et al., 2020; Roth et al., 2020). In spite of advances in preventive measures and hypolipidemic therapy, the number of patients suffering from CVDs has nearly doubled over the last 30 years (Roth et al., 2020). The most prevalent manifestation of CVDs is ischemic heart disease (IHD), which is commonly caused by atherosclerosis, a chronic fibrofatty and inflammatory disease of the artery wall (Libby et al., 2019). Inflammation during atherosclerosis is a major factor in lesion initiation, progression, and, at advanced stages, plaque disruption (Libby et al., 2002). In the initiation and progression of atherosclerosis, blood monocytes and tissue macrophages contribute significantly. Macrophage uptake of modified lipoproteins can lead to conversion into inflammatory foam cells, which undergo apoptosis and secondary necrosis in advanced stages of the disease (Wilson, 2022). Efferocytosis, the uptake of apoptotic cells by phagocytes such as macrophages, acts as a compensatory mechanism to reduce cell necrosis and lipid necrotic core formation in atherosclerotic lesions (Ge et al., 2022). The cluster of differentiation 36 receptor (CD36), a class B type 2 scavenger receptor family (SR-B2) membrane glycoprotein, is widely expressed in various mammalian cell types, including monocytes and macrophages. Playing major roles in long-chain fatty-acid transport, CD36 also regulates the uptake of oxidatively modified low-density lipoproteins (oxLDLs) (Febbraio et al., 2001; Febbraio and Silverstein, 2007). On the surfaces of monocytes and macrophages, CD36 mediates the internalization and metabolism of oxLDLs, leading to foam cell formation, vascular inflammation, and lesion progression (Febbraio and Silverstein, 2007). On the contrary, CD36 functions together with other cell surface proteins in efferocytosis to mitigate inflammation and to promote the resolution of atherosclerosis (Kourtzelis et al., 2020; Ma et al., 2023).

Previously, CD36 ligands of the growth hormone-releasing peptide family (e.g., GHRP-6) have been shown to reduce atherosclerosis progression, dampen mononuclear cell recruitment to lesion areas, increase cellular cholesterol efflux, and reverse cholesterol transport (Marleau et al., 2005; Bujold et al., 2009; Harb et al., 2009; Bujold et al., 2013). Azapeptide analogs of GHRP-6, in which an amino amide is replaced by a semicarbazide, have demonstrated CD36 selectivity (Proulx et al., 2012; Proulx et al., 2020). Notably, [aza-Tyr⁴]- and [aza-(N,N-diallylaminobut-2-ynyl)Gly⁴]-GHRP-6 (MPE-001 and MPE-003) were proven to be effective in reducing lesion progression, diminishing pro-inflammatory macrophage polarization, and lowering plasma inflammatory cytokines in a mouse model of atherosclerosis (Frégeau et al., 2020). Cyclic azapeptides (e.g., MPE-298), which were prepared by A3-macrocyclization, were shown to display in vitro unprecedented CD36 binding affinity (IC₅₀ of 0.1 μM) (Ohm et al., 2021), whereas linear azapeptides presented an IC₅₀ value of ~1 μM (Possi et al., 2017) and superior potency in reducing NO production and levels of major pro-inflammatory mediators (notably, CCL2 and IL-1) (Zhang et al., 2017). Potent metabolically stable modulators of CD36, i.e., cyclic azapeptides, favored an anti-inflammatory mononuclear phagocyte phenotype and enhanced the cholesterol efflux (Danelius et al., 2019; Ohm et al., 2021). The therapeutic potential for improving the lesion stability by targeting CD36 with the cyclic azapeptide MPE-298 has now been investigated in a preclinical mouse model of atherosclerosis featuring apolipoprotein E-deficient (apoE^{-/-}) mice fed a high-fat high-cholesterol (HFHC) diet.

Methods

Azapeptides

Azapeptide analogs of GHRP-6, MPE-003 (Frégeau et al., 2020), and MPE-298 (Supplementary Figure S1) were synthesized and characterized, as described previously (Zhang et al., 2014; Ahsanullah et al., 2019), and reconstituted in sterile 0.9% NaCl before injection. MPE-003 was used as a positive control due to its well-characterized anti-atherosclerotic effect in apoE^{-/-} mice (Frégeau et al., 2020).

Mice

The apoE^{-/-} mice were originally purchased from the Jackson Laboratory (Bay Harbor, ME, United States) and bred in-house by mating apoE^{-/-} female and male mice. The mice were housed in ventilated cages in a pathogen-free area before transferring them to a conventional environment for the duration of the protocol. Food and water were provided ad libitum. From 4 weeks of age, the male mice were fed a HFHC diet containing 40% of fat and 1.25% cholesterol (D12108, Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, United States).

Experimental protocol

All experimental protocols were approved by the Institutional Animal Ethics Committee and performed in accordance with the guidelines for the care and use of laboratory animals provided by the Canadian Council on Animal Care and the US National Institute of Health. At 4 weeks of age, the male mice were randomly assigned to four experimental groups: group 1: no treatment (n = 8); group 2: 0.9% NaCl (n = 11); groups 3 and 4: 300 nmol/kg azapeptide, MPE-003 (n = 13), and MPE-298 (n = 11), respectively. At 12 weeks of age, group 1 was euthanized with an isoflurane

overdose, followed by exsanguination, providing biochemical and histological samples that were used as baseline values and to establish the level of basal lesion development before initiating treatment. Groups 2–4 received daily subcutaneous (s.c.) injections (1 μ L/g) from weeks 12 to 20, respectively, into the loose skin of the neck above the shoulder. At week 12 for group 1 and at week 20 for the other groups, blood was collected directly from the heart of the anesthetized mice. Glycemia was assessed with Accu-Chek strips from the blood drawn from the subclavian vein at 12 and 20 weeks for all groups. For analyses, plasma and tissues were snap frozen in dry ice and stored at -80°C . The aorta was dissected, the thoracic portion was fixed in 10% neutral buffered formalin, and the abdominal aorta with iliac arteries was snap frozen. Formalin-fixed tissues, except for the aorta, were processed for standard immunohistochemical procedures by the histology core of the Institut de recherche en immunologie et en cancérologie (Institute for Research in Immunology and Cancer, IRIC) of the Université de Montréal.

Morphometric analysis of aortic lesions

Aortic atherosclerotic lesion areas were assessed by en face analysis after lipid staining with Oil Red O, as described previously (Marleau et al., 2005). Lesion-containing aortic crosses were assessed as the percentage of stained lesions relative to the total aortic cross-section area. The groups were comparable in terms of the aortic cross-surface area (Supplementary Figure S2). Cross sections of the aortic sinus were prepared by the IRIC histology core facility from hearts fixed in 10% neutral buffered formalin. The hearts were embedded in paraffin and sectioned along a plane parallel to the left atrium in sequential 4- μ m sections starting from the three valve cusps of the aortic sinus. Sections were cut using a microtome and mounted on a microscope slide. The sections were stained with hematoxylin–eosin (H&E) (Gill Hematoxylin and intensified Eosin Y, Thermo

Fisher Scientific, Mississauga, ON, Canada) and scanned using the NanoZoomer 2.0-HT scanner (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) to provide digitalized images. The sinus plaque area was measured at 40- μ m intervals and up to four sections per mouse, five mice per group. Atherosclerotic lesion areas were assessed as the percentage of the total aortic sinus area. Necrotic areas of aortic roots were determined as acellular regions of H&E-stained slices using Adobe Photoshop CS3 software (Adobe Systems Incorporated, San José, CA, United States) and expressed as the percentage of sinus areas, as described previously (Frégeau et al., 2020). Each section was analyzed by two blinded individuals.

Plasma cholesterol and free fatty acids

The total plasma cholesterol was assayed using the Infinity™ total cholesterol reagent and calibrator (Thermo Fisher Scientific, Mississauga, ON, Canada). Free fatty acids (FFAs) were assessed, as previously described (Bessi et al., 2012).

Cytokines

Plasma cytokines were assayed using mouse ELISA Ready-SET-Go!™ Kits (eBioscience, San Diego, CA, United States), according to the manufacturer's instructions.

Immunohistochemistry

Cross sections (4 μ m) of the brachiocephalic artery (BCA) from five mice per group were cut at 40- μ m intervals, processed, and stained for inducible nitric oxide synthase (iNOS or nitric oxide synthase 2, NOS2), CD206 (also known as the mannose receptor C type 1, MRC1), and caspase-3 by the IRIC histology core facility, as detailed previously (Frégeau et al., 2020). Primary and

secondary antibodies are described in Supplementary Table S1. The isotype control antibody, in addition to negative control staining for nonspecific binding, has been assessed previously (Frégeau et al., 2020). Hematoxylin was used to counterstain the sections, and the images were acquired using a $\times 20$ objective, the NanoZoomer 2.0-HT digital scanner, and NDP.view2 software (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan). The results were expressed as total positive cells in atherosclerotic lesions. Cell counts were assessed both manually using Adobe Photoshop CS3 software (San José, CA, United States) and using an automatic counter with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, United States). Collagen in the BCA cross sections was stained with Masson's trichrome and was measured as the percentage of collagen relative to the total lesion area using Adobe Photoshop CS3 software. Two to four sections per mouse per the five mice group were analyzed by two blinded individuals.

Immunofluorescence

Immunofluorescence (IF) staining was performed on BCA cross sections by the IRIC histology core facility, as previously published (Frégeau et al., 2020). Briefly, antigen retrieval of deparaffined slides was carried out by proteolytic-induced epitope retrieval (PIER), prior to the application of diluted primary antibodies against MerTK (1:50, mouse monoclonal IgG2b, Santa Cruz, Dallas, TX, United States) and CD36 (1:100, rabbit polyclonal IgG, Bioss, Woburn, MA, United States) for 1 h at room temperature. The corresponding secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor® were applied for 1 h at room temperature for each section to detect MerTK (1:200, AF555 goat anti-mouse IgG, Invitrogen, Waltham, MA, United States) and CD36 (1:200, AF488 goat anti-rabbit, Invitrogen, Waltham, MA, United States). Counterstaining of the sections was realized using the ProLong™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen, Waltham, MA, United

States) along with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 30 nM). Negative controls (omission of primary antibodies) were performed (Supplementary Figure S3). The slides were coverslipped manually and scanned at $\times 40$ using the NanoZoomer 2.0-HT scanner (Hamamatsu Photonics, Shizuoka, Japan) at a fluorescence intensity setting of 5 for all channels (FITC/TxRed/DAPI) to provide high-resolution images of the sections. The images were analyzed using Adobe Photoshop CS3 software (Adobe Systems Inc., San José, CA, United States). Manders' coefficients were determined using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, United States).

RT-qPCR analysis

Extraction of the total mRNA from abdominal aortas and iliac arteries was performed using the Ribozol™ RNA Extraction Reagent (VWR International, Radnor, PA, United States) with the PureLink™ RNA Micro Kit (Invitrogen, Waltham, MA, United States), as described previously (Frégeau et al., 2020). For the housekeeping gene, β -actin was used to normalize mRNA levels. The determination of the relative mRNA expression level of genes was carried out using the comparative CT ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) method. The protocol and primers are detailed in Supplementary Table S2.

Statistical analysis

All data were analyzed using GraphPad Prism (v.9.5.1, San Diego, CA, United States) and expressed as mean \pm SEM. Normally distributed data from independent groups were compared using one-way ANOVA, followed by Tukey's *post hoc* test for multiple comparisons, and non-normally distributed data were compared using the Kruskal–Wallis test with Dunn's *post hoc* test

for multiple comparisons, unless stated otherwise. Statistical significance was considered at a p -value <0.05 .

Results

Azaeptides reduce atherosclerotic lesion progression and cell death

Prior to euthanasia at week 20, apoE^{-/-} mice were fed a HFHC diet starting from 4 weeks of age (Figure 1A). At 12 weeks of age, a group was euthanized to determine lesion areas before initiating treatment. Vehicle (0.9% NaCl), cyclic azaeptide MPE-298 (300 nmol/kg), and linear azaeptide MPE-003 positive control (300 nmol/kg), all were administered daily by s.c. injections for 8 weeks (Frégeau et al., 2020). Reduced lesion areas were revealed in animals treated with azaeptides compared to those exposed to the vehicle as shown in photomicrographs of Oil Red O-stained aortic arches from apoE^{-/-} mice (representative images in the top row, Figure 1B). The lesion areas grew swiftly from 7% to 33% as vehicle-treated mice aged from 12 to 20 weeks old (dotted line on Figure 1C). Linear and cyclic azaeptides MPE-003 and MPE-298 reduced aortic arch lesion areas by 33% ($p < 0.0001$; from $32.9\% \pm 1.5\%$ to $21.9\% \pm 1.4\%$) and 32% ($p < 0.0001$; from $32.9\% \pm 1.5\%$ to $22.2\% \pm 1.5\%$), respectively. Vehicle- and azaeptide-treated mice exhibited no significant differences in elevated cholesterol levels (Figure 1D). Photomicrographs of aortic sinuses (Figure 1E and Supplementary Figure S4) demonstrated that MPE-298 caused a modest 17% ($p < 0.05$) reduction of lesion areas (Figure 1F) and significantly reduced necrosis by 44% ($p < 0.01$) compared to that of vehicle-treated mice (Figure 1G). A less pronounced trend was observed in the mice treated with MPE-003 (Figures 1E–G). Azaeptide treatment had no observable effect on the body weight nor food intake (Supplementary Figures S5A, B). In addition, no change in glycemia nor free fatty acid levels was observed in azaeptide-treated mice fed a

HFHC diet at 20 weeks of age, compared to that of vehicle-treated mice. (Supplementary Figures S6A, B).

Azapeptides reduce cell apoptosis and promote plaque stability in brachiocephalic arteries

Immunofluorescence staining of the merged CD36, MerTK, and DAPI photomicrographs (Figure 2A) was used to determine the lesion size and necrotic areas of BCAs. In the lesion, CD36 immunofluorescence staining was widely distributed and MerTK staining was concentrated mainly at the periphery of the necrotic core. Lesion and necrotic areas were elevated over 20-fold in 20-week-old compared to that in 12-week-old apoE^{-/-} mice (Figures 2B, C). In 20-week-old apoE^{-/-} mice fed a HFHC diet, staining indicated a ~four-fold decrease in CD36 compared to that in 12-week-old mice. On the contrary, animals treated with azapeptides tended to exhibit increased CD36 staining in lesion areas compared to that in the vehicle-treated mice (Figure 2D). In contrast, MerTK staining tended to be higher in the MPE-003-treated mice than that in vehicle-treated mice (Figure 2E). A high level of colocalization of MerTK to CD36 immunofluorescence staining was indicated by the Manders' coefficient M1 (Figure 2F), but CD36 was more largely distributed with a lower degree of colocalization with MerTK according to the Manders' coefficient M2 (Figure 2G). MerTK-immunostained areas correlated with necrotic areas (Supplementary Figure S7).

In addition to reduced necrosis, apoptosis in BCA lesions (Figure 3A) was evaluated by assessing the cleaved caspase-3 immunoexpression (Figure 3B); active caspase-7 or c-PARP antibodies might have been used to support the results (Bressenot et al., 2009). In mice treated with MPE-298, immunostained caspase-3 was reduced by 45% ($p < 0.01$) compared to that in vehicle-treated animals (Figure 3B). It is generally well-recognized that apoptosis correlates with the lesion stage

and plaque vulnerability (Van Vre et al., 2012) and that an imbalance in efferocytosis may lead to secondary necrosis. Our results show that both apoptosis and necrosis appeared to be reduced in the MPE-treated mice. BCA cross sections were further analyzed for collagen deposition by evaluating Masson's trichrome-stained areas. As indicated in representative photomicrographs of BCA lesions from vehicle- and MPE-298-treated apoE^{-/-} mice (Figure 3A), collagen-stained areas did not reveal significant differences between the two groups (Figure 3C). Markers of macrophage inflammatory and non-inflammatory phenotypes were assessed on immunostained photomicrographs of CD206⁺ and iNOS⁺ cells in BCA lesions (Figure 3A), and the CD206/iNOS-positive cell ratio was increased by 22% but did not reach statistical significance (Figure 3D).

MPE-298 reduces biomarkers of plaque instability and systemic inflammation

Abdominal aortas and iliac arteries were collected and extracted for selected gene quantification. These areas were second in terms of lesion burden after the aortic arch (Marleau et al., 2005; Harb et al., 2009; Frégeau et al., 2020). Additional markers of plaque instability, including tissue- and urokinase-type plasminogen activators genes (Plat and Plau) and metalloproteinase-14 (Mmp14), were assessed by qPCR of abdominal aortas. In mice treated with cyclic azapeptide MPE-298, mRNA levels of Plat, Plau, and Mmp14 were reduced by 63% ($p < 0.05$), 44% ($p < 0.001$), and 56% ($p < 0.05$), respectively, compared to those in vehicle-treated animals (Figure 4A). Moreover, pro-inflammatory cytokine plasma levels of IL-1 β (Figure 4B) and TNF- α (Figure 4C) were shown to be reduced by 55% ($p < 0.05$) and 47% ($p < 0.05$), respectively, using ELISA assays in the MPE-298-treated mice compared to those in the animals exposed to the vehicle.

Discussion

Cyclic azapeptide MPE-298, a potent and selective CD36 ligand (Zhang et al., 2017; Ohm et al., 2021), exhibited anti-atherosclerotic properties similar to those of linear azapeptide MPE-003, for which vasculo-protective effects in hypercholesterolemic apoE^{-/-} mice were previously reported (Frégeau et al., 2020). Although both azapeptides elicited a reduction of about 33% of lesion areas in the aortic arch in 20-week-old apoE^{-/-} mice (Figures 1B,C), azapeptide MPE-298 induced a striking reduction of necrotic areas in the aortic sinus (Figures 1E,G). The BCA is a site of predilection for the development of unstable lesions in apoE^{-/-} mice (Williams et al., 2002). Sequential slices of the BCA were analyzed by immunofluorescence staining for the presence of the receptors MerTK and CD36, which are implicated in efferocytosis and markers of necrosis and apoptosis, collagen, and macrophage phenotypes. Although collagen degradation may render atherosclerotic plaques vulnerable to rupture (Rekhter, 1999), azapeptide MPE-298 caused no change in collagen accumulation or degradation in BCA lesions, as assessed by Masson's trichrome stain histology (Figure 3C).

Macrophages, respectively, play critical roles in atherosclerotic lesion progression and resolution by mediating the uptake and metabolism of oxidized lipoproteins, by unloading a cholesterol surplus, and by clearing apoptotic cells through efferocytosis (Doran et al., 2020). Among receptors implicated in efferocytosis, MerTK has been characterized as the main macrophage receptor for apoptotic cell phagocytosis (Garbin et al., 2013). The scavenger receptor CD36 also contributes to the apoptotic cell uptake (Febbraio and Silverstein, 2007). The loss of MerTK and CD36 as phagocyte receptors has been shown to result in the inability to remove apoptotic cells (Wang et al., 2020). An impaired capacity to perform apoptotic cell clearance in atherosclerosis

leads to secondary apoptotic cell necrosis, thus promoting inflammation and plaque instability (Yurdagul et al., 2017). Unstable plaques have been characterized to have a large necrotic core rich in cellular debris and extracellular lipids, bordered by a ring of phagocytic cells (van der Wal and Becker, 1999). In agreement, immunofluorescence staining indicated MerTK localization, particularly at the periphery of the necrotic core, associated with colocalized CD36. A broad distribution of CD36 immunofluorescence was observed over the lesion area (Figure 2A). Lesion and necrotic areas, both increased with age from 12 to 20 weeks in vehicle-treated apoE^{-/-} mice but tended to decrease upon treatment with azapeptides (Figures 2B, C). In vehicle-treated apoE^{-/-} mice, CD36 immunofluorescence in the BCA lesion decreased with age from 12 to 20 weeks of age, possibly as consequences of elevated cell apoptosis (Figure 3B) and necrosis. On the contrary, CD36 immunofluorescence tended to increase upon treatment with azapeptides (Figure 2D). Compared to vehicle-treated mice, animals treated with azapeptides exhibited a similar tendency for increased MerTK immunofluorescence staining, which was higher for MPE-003 (Figure 2E). A limitation to these studies is due to the inability to distinguish between intact cell surface transmembrane receptors and shed-receptor forms (sMER) by the anti-MerTK antibody used in the immunofluorescence assay. The sMER form has been reported to lower efferocytosis efficiency in opposition to the effects of MerTK (Thorp et al., 2011). The release of soluble CD36 into lesion areas could also not be assessed. The phenotypic heterogeneity of macrophages largely depends on the environment and inflammatory mediators. Macrophages, which exhibit an increase in the expression of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ and liver X receptor (LXR) α , display enhanced efferocytosis, have the ability to resolve inflammation (Korns et al., 2011), and take on the resolution-prone M2 macrophage phenotype (Zhong et al., 2018; Wang et al., 2020). In agreement, a trend for the increased M2-to-M1 ratio was observed in

MPE-298-treated mice (Figure 3D). The linear azapeptide MPE-001 has been previously shown to stimulate the PPAR γ -LXR α pathway (Mellal et al., 2019) and to reduce pro-inflammatory macrophages (Frégeau et al., 2020). The GHRP-6 peptide analog EP-80317, which serves as a ligand of CD36, has also been shown to increase the protein levels of ATP-binding cassette (ABC) transporters and the macrophage cholesterol efflux (Bujold et al., 2009). Reduced systemic inflammation was exhibited in mice treated with MPE-298, which diminished plasma TNF- α and IL-1 β levels. As shown previously, the second site of predilection of atherosclerotic lesion areas in our model is the abdominal aorta and iliac arteries (Marleau et al., 2005; Harb et al., 2009; Frégeau et al., 2020). In abdominal aorta of mice treated with MPE-298, mRNA levels of the membrane type metalloproteinase Mmp14, which plays a role in plaque rupture (Ray et al., 2004), were reduced (Figure 4B), as previously observed on treatment with linear azapeptides (Frégeau et al., 2020). Considering that IL-1 β , TNF- α , and oxidized LDL all upregulate Mmp14 in macrophages (Ray et al., 2004), the effect of MPE-298 in lowering cytokine levels was in accordance with the reduction of metalloproteinase mRNA levels. Along with the reduction of mRNA levels of Mmp14, those of serine proteinases Plat and Plau, as markers of instability, were significantly decreased in the abdominal aorta of mice treated with MPE-298 (Figure 4A). The determination of protein levels should confirm these observations in future works. The latter members of the fibrinolytic cascade have been identified in smooth muscle cells and macrophages along the margin of the necrotic core in human atherosclerotic lesions (Dollery and Libby, 2006). In addition to their fibrinolytic properties, tissue- and urokinase-type plasminogen activators also interfere with efferocytosis, by competing for receptors of eat-me signals, such as Gas6 in apoptotic cells (Yang et al., 2010). The macrophage-targeted Plau overexpression has been shown to be deleterious in an apoE^{-/-} mouse model of atherosclerosis (Hu et al., 2015). An elevated Plat

expression has been reported in advanced atherosclerotic apoE^{-/-} plaques (Zhi et al., 2013). On the contrary, mRNA levels of fibronectin (Fn1), a substrate of Plau and Plat, were not modulated in mice treated with the cyclic azapeptide MPE-298 (Figure 4A). One limitation to the present study is the use of only male mice, because increased risk of atherosclerosis is gender-dependent. The cardiovascular effect of azapeptides on both sexes merits further investigation.

Despite a short terminal half-life of 20 min, MPE-298 exerted atheroprotective effects after long-term daily s.c. injections. The short plasma half-life of the azapeptide did not correlate with efficacy. Considering the presumed protease-stability of MPE-298, further investigation of azapeptide internalization, intracellular disposition in the macrophages, and signaling pathways, all are currently being investigated in our laboratory.

In conclusion, daily treatments with the CD36 ligand cyclic azapeptide MPE-298 reduced lesion progression in apoE^{-/-} mice fed a HFHC diet from 4 weeks of age, in the same manner of the linear azapeptide MPE-003. Moreover, the cyclic azapeptide MPE-298 promoted plaque stability in the BCA, aortic sinus, and most likely the abdominal aorta. Additional investigations will be required to determine whether improved plaque stability associated with MPE-298 treatment can be observed in other regions of the arterial tree. Treatment with cyclic azapeptide MPE-298 tended to increase CD36 immunofluorescence and induced a 45% ($p < 0.01$) reduction in immunostained caspase-3 as a marker of apoptotic cells in BCA lesions. Consistent with diminished apoptotic cell amounts, plasma TNF- α and IL-1 β cytokine levels were decreased in the azapeptide-treated animals. Furthermore, immunofluorescence staining indicated that treatment with azapeptide increased MerTK at the periphery of the necrotic core that colocalized with CD36 in the BCA.

Considering the roles of MerTK and CD36 as phagocytic receptors, azapeptides (e.g., MPE-298) may promote macrophage efferocytosis, in addition to attenuating inflammation and enhancing plaque stability. Our results support the development of cyclic azapeptides as CD36 ligands, with potential plaque-stabilizing properties against atherosclerosis progression.

Data Availability Statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material; further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by the Institutional Animal Ethics Committee.

Author Contributions

JG: conceptualization, methodology, validation, investigation, visualization, project administration, formal analysis, writing—original draft, and writing—review and editing. GF: conceptualization, methodology, validation, investigation, visualization, project administration, and formal analysis. HE: investigation, validation, formal analysis, and writing—review and editing. LM: methodology, investigation, visualization, formal analysis, and writing—review and editing. DH: investigation, validation, and review. CL: formal analysis and review. AA: investigation. WDL: resources, funding acquisition, review, and editorial revision of the text. HO: conceptualization, funding acquisition, supervision, resources, and writing—review and editing. SM: conceptualization, methodology, validation, funding acquisition, project administration, supervision, resources, writing—original draft, and writing—review and editing. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

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

Acknowledgments

HE is a recipient of a grant from the Direction des affaires internationales, Université de Montréal.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors, and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2023.1204905/full#supplementary-material>

References

- Ahsanullah, , Chingle, R., Ohm, R. G., Chauhan, P. S., and Lubell, W. D. (2019). Aza-propargylglycine installation by aza-amino acylation: Synthesis and ala-scan of an azacyclopeptide CD36 modulator. *Peptide Sci.* 111, e24102. doi:10.1002/pep2.24102
- Bessi, V. L., Labbé, S. M., Huynh, D. N., Ménard, L., Jossart, C., Febbraio, M., et al. (2012). EP 80317, a selective CD36 ligand, shows cardioprotective effects against post-ischaemic myocardial damage in mice. *Cardiovasc Res.* 96, 99–108. doi:10.1093/cvr/cvs225
- Bressenot, A., Marchal, S., Bezdetsnaya, L., Garrier, J., Guillemin, F., and Plenat, F. (2009). Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma. *J. Histochem. Cytochem.* 57, 289–300. doi:10.1369/jhc.2008.952044
- Bujold, K., Mellal, K., Zoccal, K. F., Rhainds, D., Brissette, L., Febbraio, M., et al. (2013). EP 80317, a CD36 selective ligand, promotes reverse cholesterol transport in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 229, 408–414. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.05.031
- Bujold, K., Rhainds, D., Jossart, C., Febbraio, M., Marleau, S., and Ong, H. (2009). CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPARgamma activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages. *Cardiovasc. Res.* 83, 457–464. doi:10.1093/cvr/cvp118

- Danelius, E., Ohm, R. G., Ahsanullah, Mulumba M., Ong, H., Chemtob, S., et al. (2019). Dynamic chirality in the mechanism of action of allosteric CD36 modulators of macrophage-driven inflammation. *J. Med. Chem.* 62, 11071–11079. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00918
- Dollery, C. M., and Libby, P. (2006). Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc. Res.* 69, 625–635. doi:10.1016/j.cardiores.2005.11.003
- Doran, A. C., Yurdagul, A., and Tabas, I. (2020). Efferocytosis in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 20, 254–267. doi:10.1038/s41577-019-0240-6
- Febbraio, M., Hajjar, D. P., and Silverstein, R. L. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* 108, 785–791. doi:10.1172/JCI14006
- Febbraio, M., and Silverstein, R. L. (2007) CD36: Implications in cardiovascular disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 2012–2030. doi:10.1016/j.biocel.2007.03.012
- Frégeau, G., Sarduy, R., Elimam, H., Esposito, C. L., Mellal, K., Menard, L., et al. (2020). Atheroprotective and atheroregressive potential of azapeptide derivatives of GHRP-6 as selective CD36 ligands in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 307, 52–62. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2020.06.010
- Garbin, U., Baggio, E., Stranieri, C., Pasini, A., Manfro, S., Mozzini, C., et al. (2013). Expansion of necrotic core and shedding of mertk receptor in human carotid plaques: A role for oxidized polyunsaturated fatty acids? *Cardiovasc. Res.* 97, 125–133. doi:10.1093/cvr/cvs301
- Ge, Y., Huang, M., and Yao, Y. M. (2022). Efferocytosis and its role in inflammatory disorders. *Front. Cell Dev. Biol.* 10, 839248. doi:10.3389/fcell.2022.839248

Harb, D., Bujold, K., Febbraio, M., Sirois, M. G., Ong, H., and Marleau, S. (2009). The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation. *Cardiovasc. Res.* 83, 42–51. doi:10.1093/cvr/cvp081

Hu, J. H., Touch, P., Zhang, J., Wei, H., Liu, S., Lund, I. K., et al. (2015). Reduction of mouse atherosclerosis by urokinase inhibition or with a limited-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor. *Cardiovasc. Res.* 105, 372–382. doi:10.1093/cvr/cvv007

Khan, M. A., Hashim, M. J., Mustafa, H., Baniyas, M. Y., Al Suwaidi, S. K. B. M., AlKatheeri, R., et al. (2020). Global epidemiology of ischemic heart disease: Results from the global burden of disease study. *Cureus* 12, e9349. doi:10.7759/cureus.9349

Korns, D., Frasch, C., Fernandez-Boyanapalli, R., Henson, P. M., Bratton, D. L., et al. (2011). Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front. Immunol.* 2, 57. doi:10.3389/fimmu.2011.00057

Kourtzelis, I., Hajishengallis, G., and Chavakis, T. (2020). Phagocytosis of apoptotic cells in resolution of inflammation. *Front. Immunol.* 11, 553. doi:10.3389/fimmu.2020.00553

Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., et al. (2019). Atheroscler. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 5, 56. doi:10.1038/s41572-019-0106-z

Libby, P., Ridker, P. M., and Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135–1143. doi:10.1161/hc0902.104353

Ma, Y., Kemp, S. S., Yang, X., Wu, M. H., and Yuan, S. Y. (2023). Cellular mechanisms underlying the impairment of macrophage efferocytosis. *Immunol. Lett.* 254, 41–53. doi:10.1016/j.imlet.2023.02.001

Marleau, S., Harb, D., Bujold, K., Avallone, R., Iken, K., Wang, Y., et al. (2005). EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB J.* 19, 1869–1871. doi:10.1096/fj.04-3253fje

Mellal, K., Omri, S., Mulumba, M., Tahiri, H., Fortin, C., Dorion, M. F., et al. (2019). Immunometabolic modulation of retinal inflammation by CD36 ligand. *Sci. Rep.* 9, 12903. doi:10.1038/s41598-019-49472-8

Ohm, R. G., Mulumba, M., Chingle, R. M., Ahsanullah, Zhang J., Chemtob, S., et al. (2021). Diversity-Oriented A(3)-macrocyclization for studying influences of ring-size and shape of cyclic peptides: CD36 receptor modulators. *J. Med. Chem.* 64, 9365–9380. doi:10.1021/acs.jmedchem.1c00642

Possi, K. C., Mulumba, M., Omri, S., Garcia-Ramos, Y., Tahiri, H., Chemtob, S., et al. (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, 9263–9274. doi:10.1021/acs.jmedchem.7b01209

Proulx, C., Picard, E., Boeglin, D., Pohankova, P., Chemtob, S., Ong, H., et al. (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, 6502–6511. doi:10.1021/jm300557t

Proulx, C., Zhang, J., Sabatino, D., Chemtob, S., Ong, H., and Lubell, W. D. (2020). Synthesis and biomedical potential of azapeptide modulators of the cluster of differentiation 36 receptor (CD36). *Biomedicines* 8, 241. doi:10.3390/biomedicines8080241

Ray, B. K., Shakya, A., Turk, J. R., Apte, S. S., and Ray, A. (2004). Induction of the MMP-14 gene in macrophages of the atherosclerotic plaque: Role of SAF-1 in the induction process. *Circ. Res.* 95, 1082–1090. doi:10.1161/01.RES.0000150046.48115.80

Rekhter, M. D. (1999). Collagen synthesis in atherosclerosis: Too much and not enough. *Cardiovasc. Res.* 41, 376–384. doi:10.1016/s0008-6363(98)00321-6

Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., et al. (2020). Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990-2019: Update from the GBD 2019 study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 76, 2982–3021. doi:10.1016/j.jacc.2020.11.010

Thorp, E., Vaisar, T., Subramanian, M., Mautner, L., Blobel, C., and Tabas, I. (2011). Shedding of the Mer tyrosine kinase receptor is mediated by ADAM17 protein through a pathway involving reactive oxygen species, protein kinase C δ , and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). *J. Biol. Chem.* 286, 33335–33344. doi:10.1074/jbc.M111.263020

van der Wal, A. C., and Becker, A. E. (1999). Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc. Res.* 41, 334–344. doi:10.1016/s0008-6363(98)00276-4

Van Vre, E. A., Ait-Oufella, H., Tedgui, A., and Mallat, Z. (2012). Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 887–893. doi:10.1161/ATVBAHA.111.224873

Wang, L., Li, H., Tang, Y., and Yao, P. (2020). Potential mechanisms and effects of efferocytosis in atherosclerosis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 11, 585285. doi:10.3389/fendo.2020.585285

Williams, H., Johnson, J. L., Carson, K. G., and Jackson, C. L. (2002). Characteristics of intact and ruptured atherosclerotic plaques in brachiocephalic arteries of apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 788–792. doi:10.1161/01.atv.0000014587.66321.b4

Wilson, H. M. (2022). The intracellular signaling pathways governing macrophage activation and function in human atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* 50, 1673–1682. doi:10.1042/BST20220441

Yang, Y., Friggeri, A., Banerjee, S., Bdeir, K., Cines, D. B., Liu, G., et al. (2010). Urokinase-type plasminogen activator inhibits efferocytosis of neutrophils. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 1516–1523. doi:10.1164/rccm.201003-0452OC

Yurdagul, A., Doran, A. C., Cai, B., Fredman, G., and Tabas, I. A. (2017). Mechanisms and consequences of defective efferocytosis in atherosclerosis. *Front. Cardiovasc. Med.* 4, 86. doi:10.3389/fcvm.2017.00086

Zhang, J., Mulumba, M., Ong, H., and Lubell, W. D. (2017). Diversity-Oriented synthesis of cyclic azapeptides by A3 -macrocyclization provides high-affinity CD36-modulating peptidomimetics. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 56, 6284–6288. doi:10.1002/anie.201611685

Zhang, J., Proulx, C., Tomberg, A., and Lubell, W. D. (2014). Multicomponent diversity-oriented synthesis of aza-lysine-peptide mimics. *Org. Lett.* 16, 298–301. doi:10.1021/o1403297v

Zhi, X., Xu, C., Zhang, H., Tian, D., Li, X., Ning, Y., et al. (2013). Tryptase promotes atherosclerotic plaque haemorrhage in ApoE^{-/-} mice. *PLoS. One.* 8, e60960. doi:10.1371/journal.pone.0060960

Zhong, X., Lee, H-N., Kim, S. H., Park, S-A., Kim, W., Cha, Y-N., et al. (2018). Myc-nick promotes efferocytosis through M2 macrophage polarization during resolution of inflammation. *FASEB J.* 32, 5312–5325. doi:10.1096/fj.201800223R

Figures

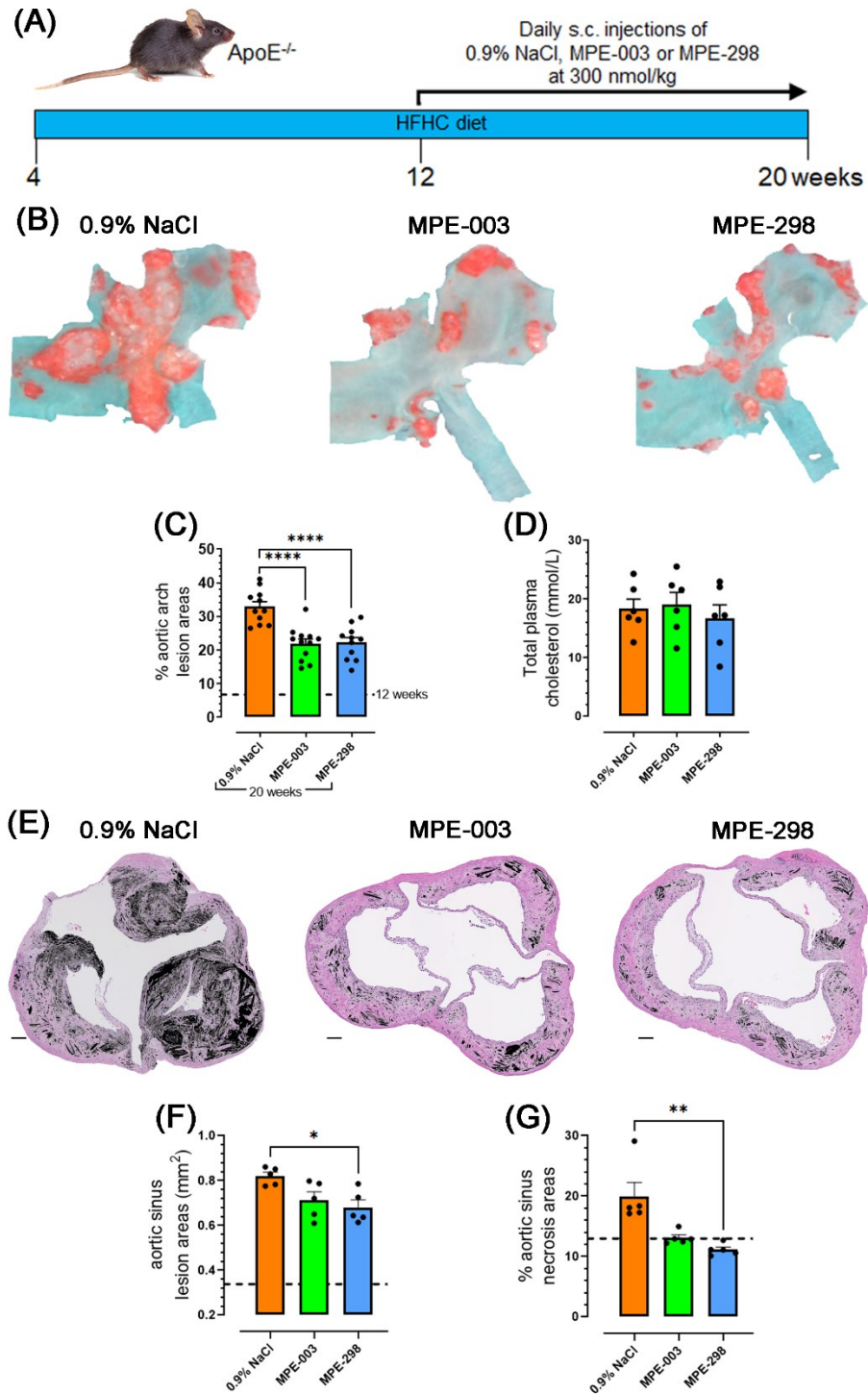


Figure 1. Azapeptides reduce atherosclerotic lesion progression and necrotic areas. **(A)** Study design. **(B)** Representative photomicrographs of aortic arches stained en face with Oil red O. **(C)** Percentage aortic arch lesion areas expressed as bar graphs and dot plots, where each dot represents

the lesion area for each mouse ($n = 11\text{--}12$ mice per group). **(D)** Bar graphs and dot plots represent the mean total plasma cholesterol levels (mmol/L), in which each dot represents the value of a single mouse ($n = 6$ mice per group). **(E)** Representative photomicrographs of aortic sinuses after staining with hematoxylin–eosin (scale bar: 100 μm). Necrotic areas are indicated in black. **(F)** Bar graphs and dot plots represent the mean sinus lesion areas (mm^2), in which each dot is the mean lesion area of 3–4 cross sections per mouse ($n = 5$ mice per group). **(G)** Bar graphs and dot plots represent the mean aortic sinus necrotic areas (%), in which each dot is the mean necrotic area of 3–4 cross sections per mouse ($n = 5$ mice per group). Data are mean \pm SEM. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, and $****p < 0.0001$, as assessed by one-way ANOVA and Tukey's *post hoc* test.

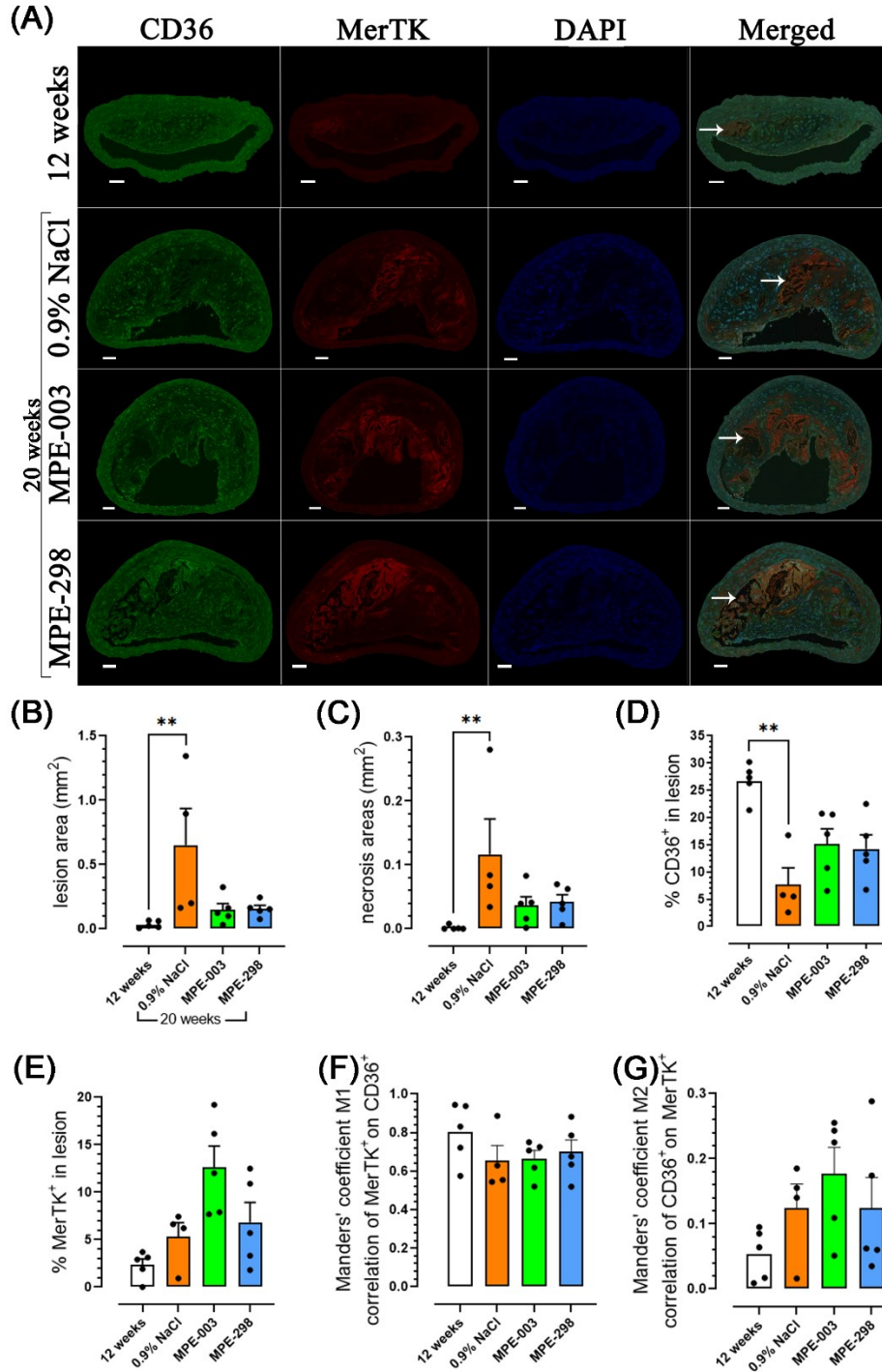


Figure 2. MerTK and CD36 are colocalized in the BCA. **(A)** Immunofluorescence staining of CD36 (green), MerTK (red), DAPI (blue), and their colocalization in the BCA (scale bar: 50 μ m). Arrows indicate the necrotic core. **(B)** Bar graphs and dot plots represent the mean lesion areas (mm^2) and **(C)** necrotic areas (mm^2) in the BCA. Bar graphs and dot plots represent the mean

immunofluorescence staining of **(D)** CD36 (%) and **(E)** MerTK (%) in the lesion area. **(F)** Bar graphs and dot plots of the Manders' coefficient M1 (red on green). **(G)** Bar graphs and dot plots of the Manders' coefficient M2 (green on red). Data are mean \pm SEM. Each dot is the mean of 3–4 cross sections per mouse (n = 4–5 mice per group). * p < 0.05 and ** p < 0.01, as assessed by the Kruskal–Wallis test and Dunn's *post hoc* test.

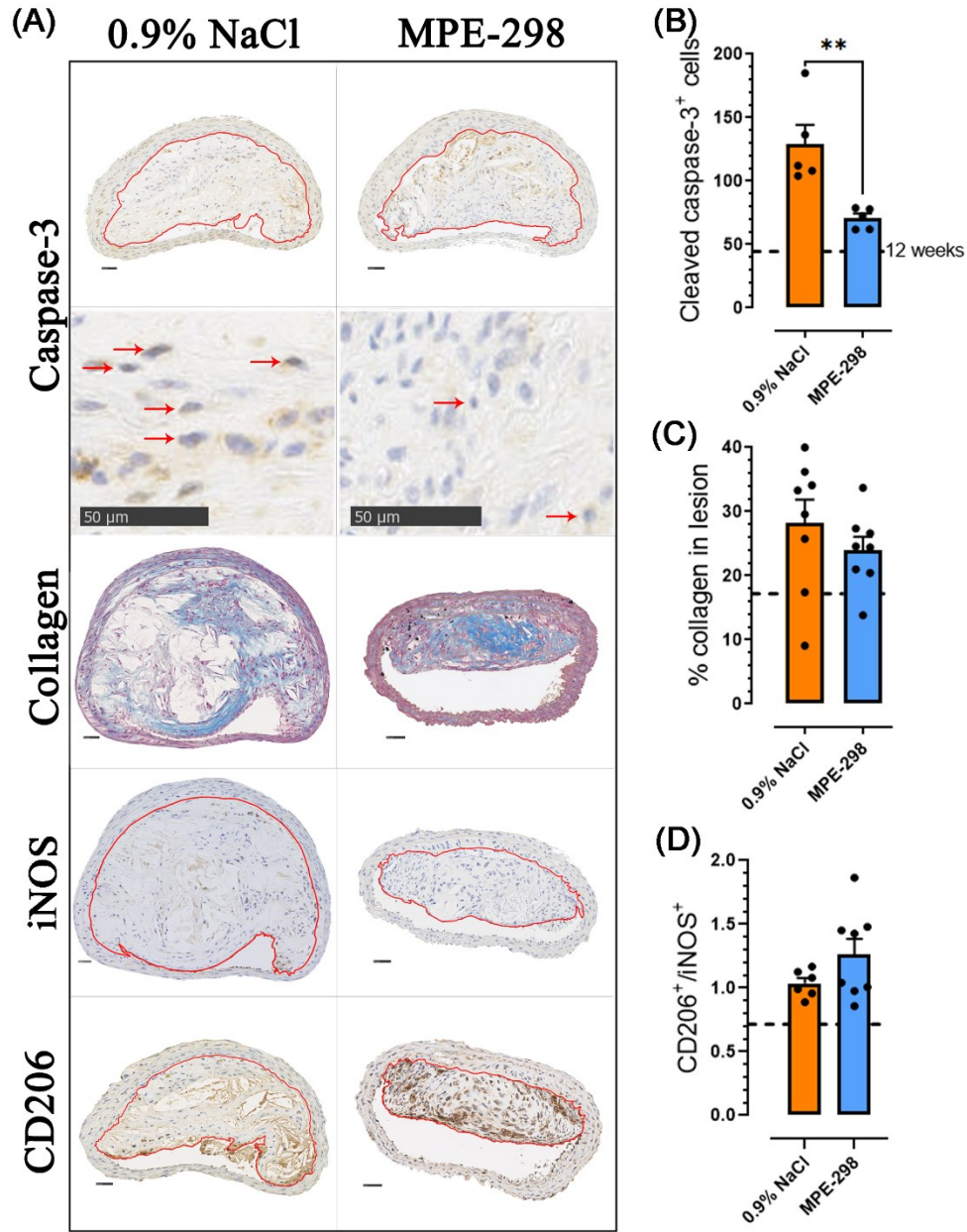


Figure 3. Azapeptides promote plaque stability in the BCA. **(A)** Representative cross sections of the stained BCA for caspase-3, collagen, iNOS, and CD206 (scale bar: 50 μ m), with an enlarged area for caspase-3 immunostaining. Arrows indicate caspase-3-positive cells. **(B)** Bar graphs and dot plots of the mean caspase-3⁺ cell count in the BCA lesion area (n = 5 mice per group). **(C)** Bar graphs and dot plots represent the mean collagen expressed as the percentage of the lesion area (n = 8 mice per group). **(D)** Bar graphs and dot plots of the CD206-to-iNOS-positive cell ratio in the

BCA lesion area (n = 6–8 mice per group). Data are mean ± SEM. Each dot is the mean of 3–4 cross sections per mouse. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, as assessed by the Mann–Whitney U test for (B) and unpaired t-tests for (C) and (D).

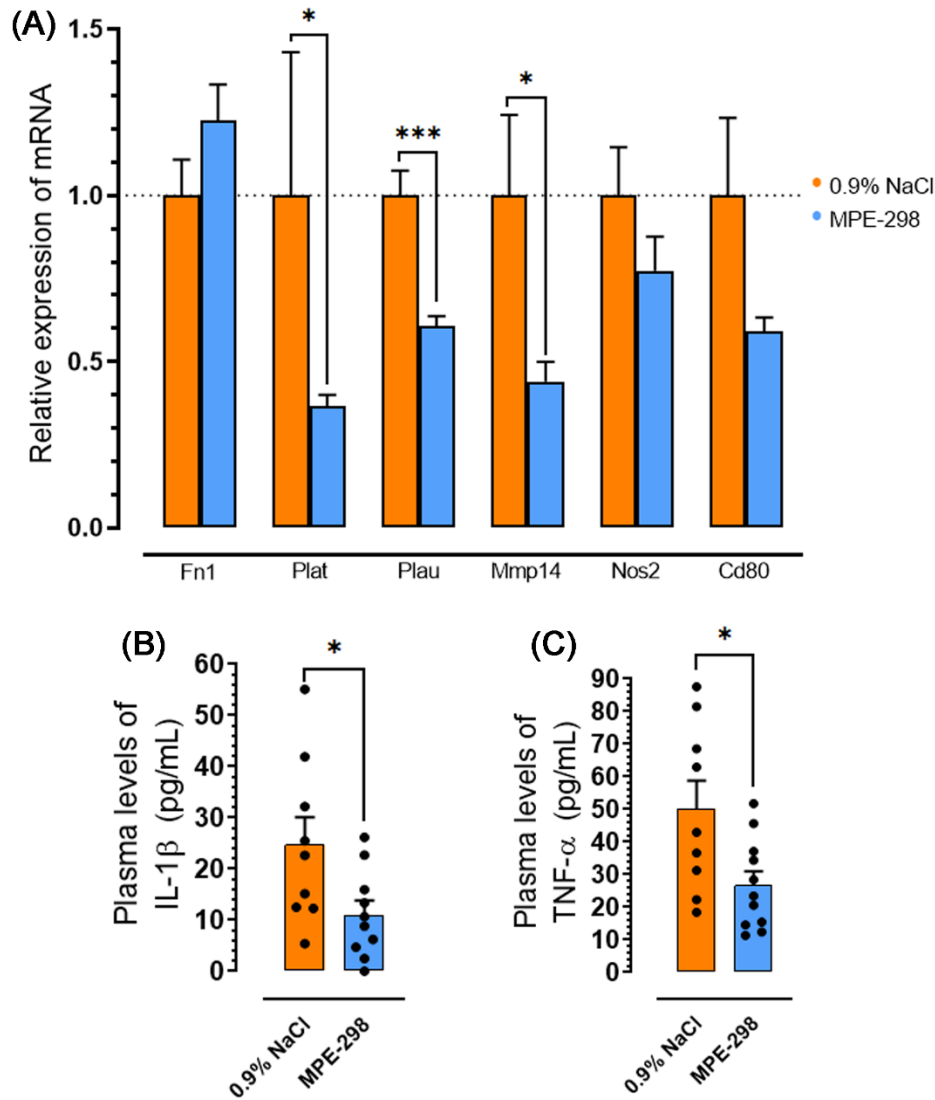


Figure 4. MPE-298 enhances plaque stability and reduces systemic inflammation. (A) Bar graphs and dot plots of the abdominal and iliac arterial tissue relative to the mRNA levels of fibronectin (Fn1), tissue-plasminogen activator (Plat), urokinase-type plasminogen activator (Plau), matrix metalloproteinase-14 (Mmp14), nitric oxide synthase 2 (Nos2), and Cd80 (n = 8 mice per group).

Bar graphs and dot plots of plasma **(B)** IL-1 β and **(C)** TNF- α levels (n = 9–11 mice per group). Data are mean \pm SEM. * p < 0.05, ** p < 0.01, and *** p < 0.001, as assessed by the Mann–Whitney U test for **(A)** and unpaired t-tests for **(B)** and **(C)**.

Supplementary Material

A cyclic azapeptide ligand of the scavenger receptor CD36/SR-B2 reduces atherosclerotic lesion progression and enhances plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice

Jade Gauvin, Geneviève Frégeau, Hanan Elimam, Liliane Ménard, David Huynh, Catherine Lê, Ahsanullah, William D. Lubell, Huy Ong, Sylvie Marleau*

* **Correspondence:** Corresponding Author: sylvie.marleau@umontreal.ca

1 Supplementary Figures and Tables

1.1 Supplementary Tables

Supplementary table 1. Immunohistochemistry antibodies

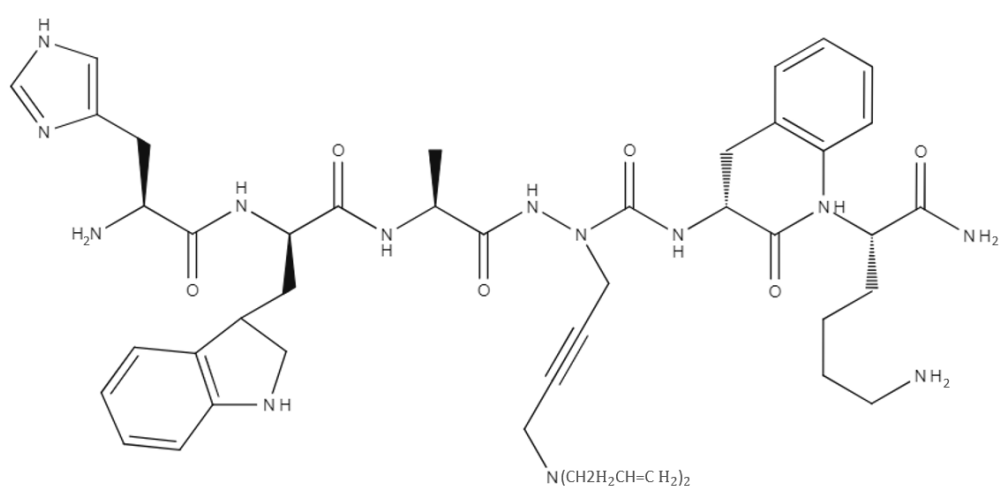
Marker	Primary antibody	Dilution	Source	Secondary antibody	Dilution	Source
CD206	Goat polyclonal IgG	1:50	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA			
iNOS	Rabbit polyclonal IgG	1:2000	Novus Biological, Centennial, CO, USA	Corresponding biotin-conjugated antibody	1:100	Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA
Caspase-3	Rabbit polyclonal IgG	1:100	Biocare Medical, Pacheco, CA, USA			

Supplementary table 2. qPCR murine primer sequences

Gene	Primer	Product length (bp)	NCBI Gene ID
β -actin	Forward CAGCAAGCAGGAGTACGATGA	93	11461
	Reverse GAAAGGGTGTAAAACGCAGCTC		
Cd80	Forward TTCAGACCGGGGCACATACAGC	116	12519
	Reverse TGTTGGGGGTAGAGAAGTCAGCTTTG		
Fibronectin (Fn1)	Forward TGCAGACCTACCCAGGCACAACCT	82	14268
	Reverse TGGATGGGGTGGGAATTGGGCT		
Nos2	Forward ACCTTGGTGAAGGGACTGAGCTGT	112	18126
	Reverse TCCAACGTTCTCCGTTCTCTTGCAGT		
Mmp14	Forward GCCCTCTGTCCCAGATAAGCCCAA	121	17387
	Reverse CCAGAACCATCGCTCCTTGAAGACAA		
tPA	Forward AAAGAAGCAAGCACTCTCGGGACACA	105	18791
	Reverse GGTCAGGCAATGGGAAAGCCAGTC		
uPA	Forward GCTCTGTCTGTCATCCATCCAGTCCT	80	18792
	Reverse GGGCTCTAGACAGCAGTTCGGTGA		

1.2 Supplementary Figures

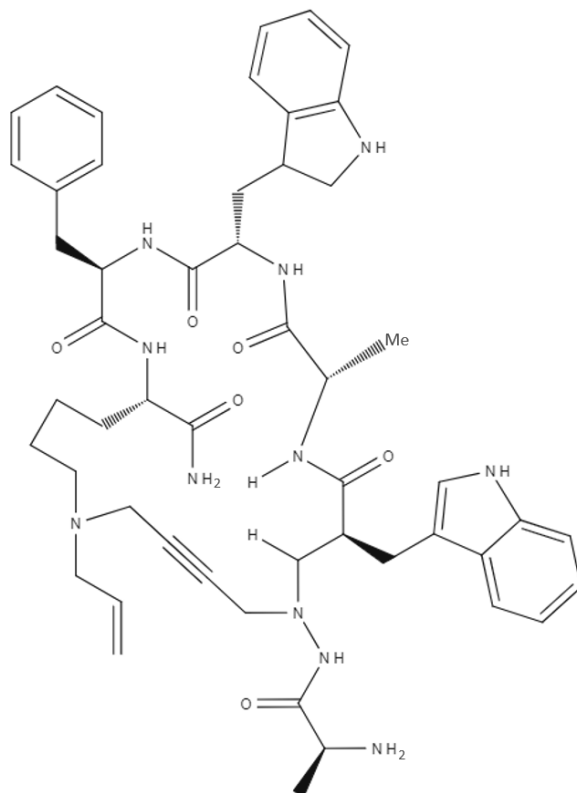
(A)



MPE-003

His-D-Trp-Ala-[aza-(N,N-diallylaminobut-2-ynyl)Gly⁴]-D-Phe-Lys-NH₂

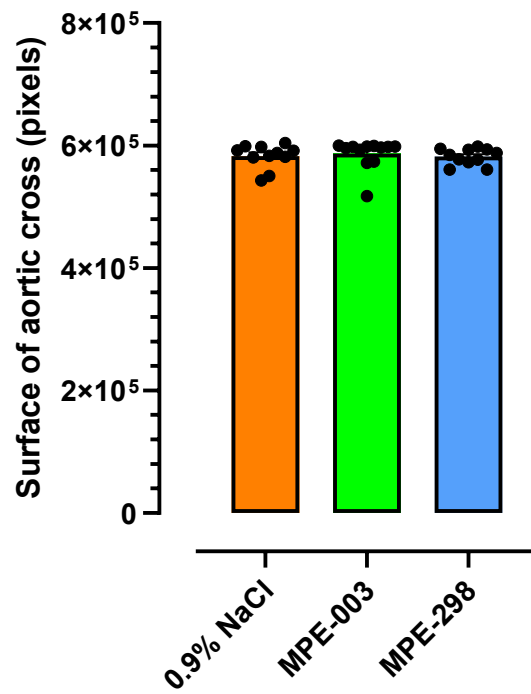
(B)



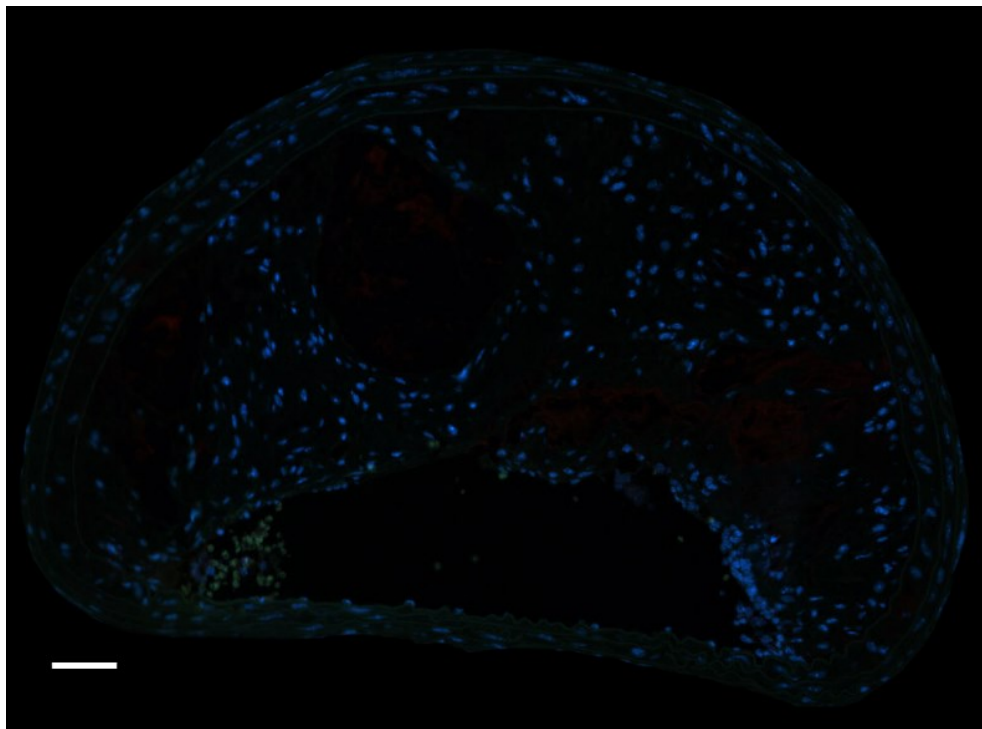
MPE-298

Ala-AzapropargylGly-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys(allyl)-NH₂

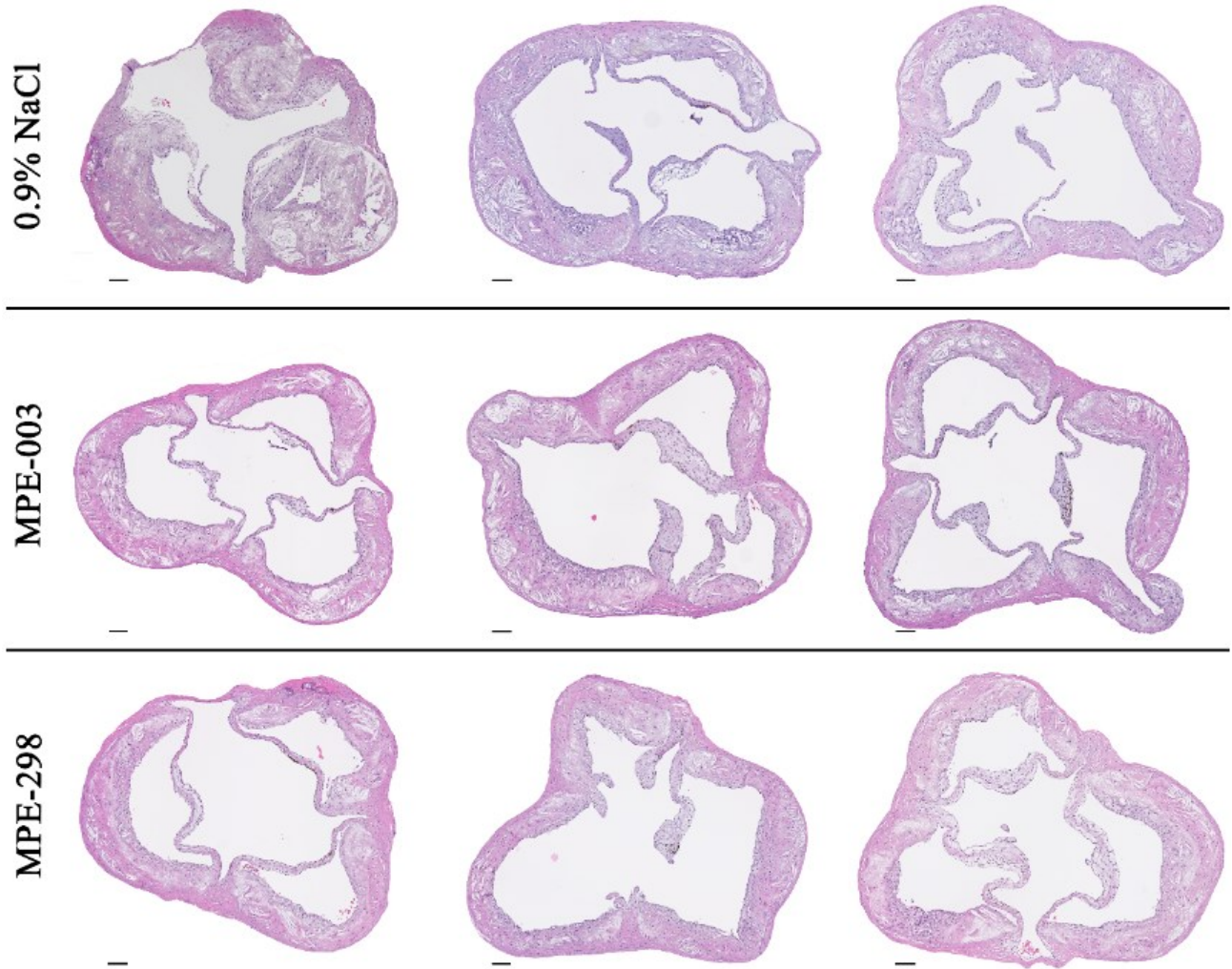
Supplementary Figure 1. Molecular structure of azapeptides (A) MPE-003 and (B) MPE-298



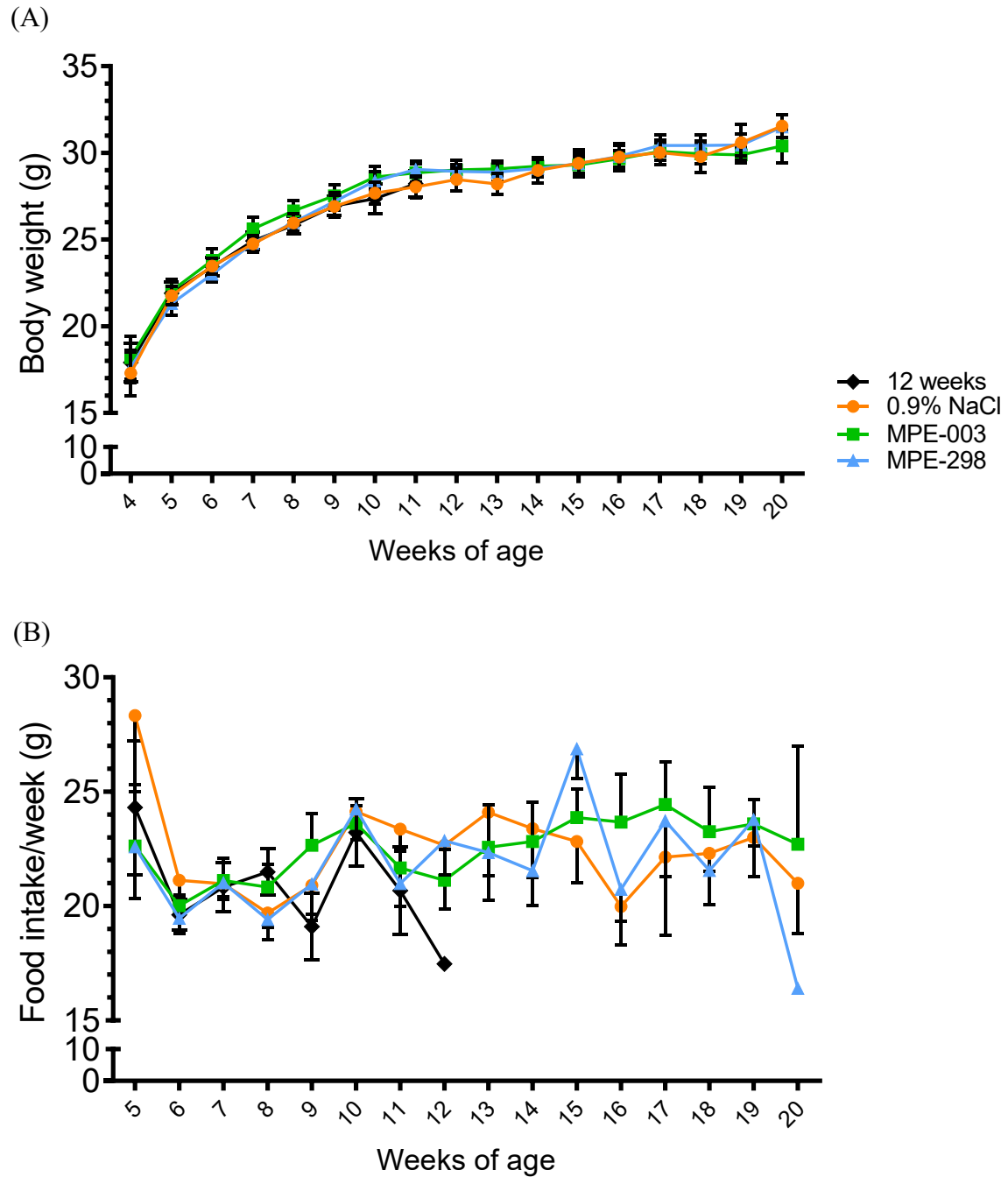
Supplementary Figure 2. All groups have comparable aortic cross pixel surface.



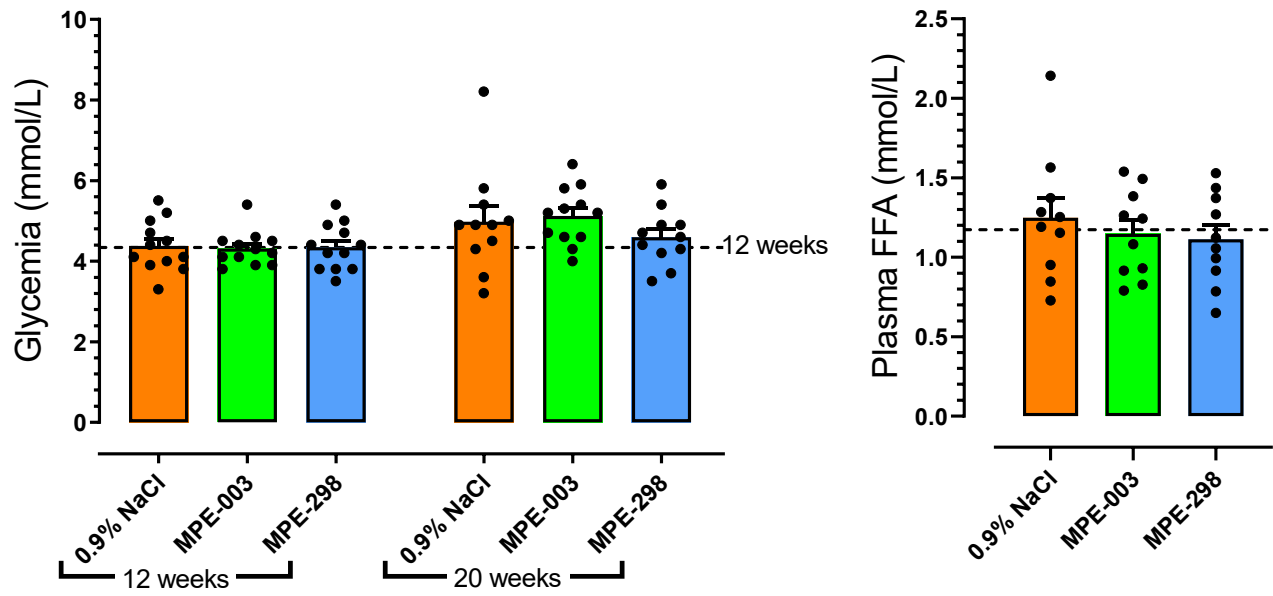
Supplementary Figure 3. Negative control for immunofluorescence assays in BCA (scale bar: 50 μ m). The image is from mice GAa775.



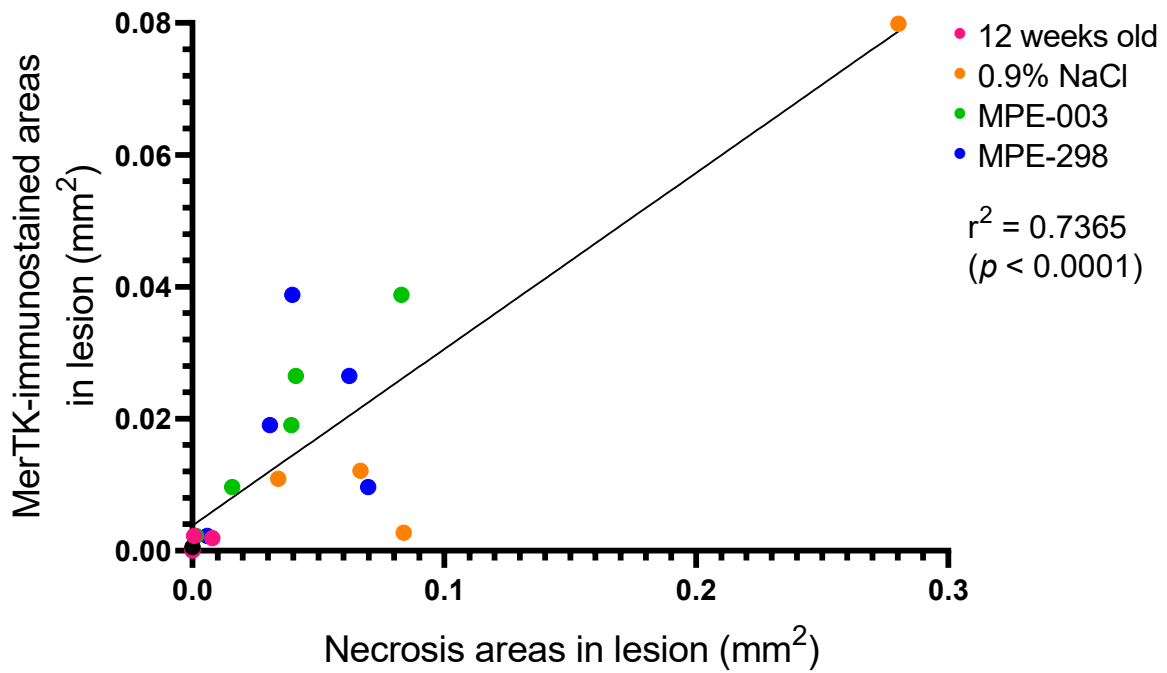
Supplementary Figure 4. Representative photomicrographs of aortic sinuses after staining with hematoxylin-eosin (scale bar: 100 μ m). The photomicrographs of the first column are shown in Figure 1.



Supplementary Figure 5. Azapeptides did not affect body weight and food intake. ApoE^{-/-} mice **(A)** mean body weight and **(B)** mean food intake per week. Azapeptides treatment was initiated at 12 weeks of age, until euthanasia at 20 weeks of age.



Supplementary Figure 6. Azapeptides did not affect (A) glycemia or (B) plasma free fatty acids (FFA) in apoE-null mice fed a HFHC diet for 16 weeks (4 to 20 weeks of age).



Supplementary Figure 7. Correlation between MerTK-stained areas and necrosis areas in BCA lesions. Each pink dot represents 12 weeks old mice, orange dot represents vehicle-treated mice, blue dot represents MPE-298-treated mice and green dot represents MPE-003-treated mice.

Chapitre 3 : Discussion

Les maladies cardiovasculaires représentent depuis longtemps un problème de santé majeur au niveau mondial, étant depuis plus de 20 ans le fardeau le plus important globalement en termes d'AVCI, réduisant la qualité de vie des personnes affligées, en plus d'être une des causes de mortalité les plus importantes au monde, soit 32% des décès totaux mondialement (1). Comme l'athérosclérose est considérée comme étant la 1^{re} cause de développement de maladies cardiaques ischémiques, la pathologie est l'une des cibles les plus importantes pour la diminution de la mortalité associée aux maladies cardiovasculaires. La prévalence de l'athérosclérose dans la population est expliquée par ses facteurs de risques, comme l'hypercholestérolémie, l'hypertension, l'hyperglycémie à jeun, en plus des comorbidités aggravantes, comme par exemple le diabète, ainsi que les prédispositions génétiques. Le sexe et l'âge sont également des facteurs à considérer, comme les hommes âgés de plus de 50 ans sont le groupe le plus à risque de développer des problèmes cardiovasculaires comme l'athérosclérose. Le mode de vie est également à considérer dans le risque de développement de l'athérosclérose, incluant la consommation d'alcool et de tabac, la sédentarité et une alimentation malsaine sont également des facteurs aggravants dans le développement de l'athérosclérose. L'athérosclérose est donc une pathologie qui affecte une proportion de plus en plus significative de la population vieillissante, en plus d'avoir des facteurs de risque diversifiés. À cet effet, le développement de traitements variés pour l'athérosclérose est important pour réduire les risques de maladies cardiaques ischémiques. Certains traitements sont déjà commercialisés, comme les statines, qui agissent sur la synthèse du cholestérol et sont donc un traitement important pour la prévention des maladies cardiovasculaires, en plus d'être un traitement utilisable en combinaison pour maximiser l'effet thérapeutique (162). Cependant, les statines sont fréquemment mal tolérées par les patients. Les anticorps contre la

PCSK9, qui diminuent la dégradation des LDLR par leur liaison sur la PCSK9, sont également utilisés, plus spécifiquement dans les cas d'hypercholestérolémie sévère où les statines n'auraient pas l'efficacité souhaitée (163), mais sont considérablement plus coûteux que les statines. L'utilisation de certaines molécules anti-inflammatoires visant quelques médiateurs proinflammatoires est également considérée pour le traitement de l'athérosclérose, avec la colchicine, un anti-inflammatoire non spécifique récemment accepté pour le traitement des maladies cardiovasculaires (160). Cependant la redondance des médiateurs proinflammatoires, comme les cytokines, est fréquemment observée, ce qui complique le développement de traitements basés sur ces molécules. Le développement de nouvelles stratégies de traitement est donc souhaitable pour permettre de traiter les différents types de patients atteints d'athérosclérose. Selon notre hypothèse de recherche, une partie du besoin de nouvelles cibles thérapeutiques pourrait être comblée par l'utilisation de molécules sélectives au récepteur CD36, un récepteur des LDLox exprimé par les macrophages. En effet, le récepteur CD36 est l'un des récepteurs responsables de l'internalisation et du métabolisme des LDLox, et de ce fait, dans un contexte d'athérosclérose, induit l'accumulation de ces LDLox au niveau du cytoplasme des macrophages. Cette accumulation induit la transformation des macrophages en cellules spumeuses, un constituant important des lésions athérosclérotiques, contribuant à l'augmentation de la taille des lésions athérosclérotiques. Il a été montré avec l'EP80317, un prédécesseur des azapeptides, que l'internalisation des LDLox est réduite en présence du composé (108), mais que son effet sur l'efflux de cholestérol et le transport transintestinal (164, 165), ainsi que son effet anti-inflammatoire (118, 166) et modulateur du phénotype des macrophages seraient importants (118, 161). Lors du développement de l'athérosclérose, le CD36, en réponse à la stimulation par les LDLox, induit également une augmentation de l'inflammation au site lésionnel via la stimulation

de la voie de signalisation du facteur de transcription proinflammatoire NFκB ainsi que par l'activation de l'inflammasome NLRP3, entre autres. Le CD36 agit également comme co-récepteur du TLR2/6, induisant la stimulation de la voie de signalisation du NFκB (167). De plus, le CD36 est impliqué dans l'efférocytose des cellules apoptotiques, il s'agit donc d'une cible impliquée à différents niveaux du développement et de la progression des lésions. Un traitement relié à cette cible pourrait donc être administré à différents stades de progression de la pathologie en conservant un effet substantiel. Les azapeptides ont été créés à cet effet, étant des ligands sélectifs du récepteur CD36 ayant un effet modulateur sur leurs différentes fonctions. Dans la littérature, deux azapeptides ont été testés pour leur potentiel en tant que modulateurs du récepteur CD36. Tout d'abord, le MPE-001, le premier azapeptide de la série, a été testé dans deux contextes thérapeutiques différents. Premièrement, en athérosclérose, le MPE-001 a démontré un effet anti-athérosclérotique chez les souris déficientes en apoE, observé par une réduction de la taille des lésions aortiques ainsi qu'une mitigation de l'inflammation via une diminution des macrophages inflammatoires de type M1 (117). Deuxièmement, le MPE-001 a également été testé dans la dégénérescence maculaire, une pathologie dégénérative de la macula, la zone centrale de la rétine, où l'azapeptide, via son effet anti-inflammatoire et métabolique, permet de stopper la progression de la rétinopathie chez un modèle murin (97). Ensuite, le MPE-003, deuxième azapeptide de la série à être testé dans l'athérosclérose, a également été investigué pour son potentiel anti-athérosclérotique, toujours chez un modèle murin déficient en apoE, où l'azapeptide, comme son prédécesseur, a démontré une diminution de la progression des lésions athérosclérotiques ainsi qu'une diminution de l'inflammation via une réduction du ratio des macrophages inflammatoires de type M1 par comparaison aux macrophages anti-inflammatoires de type M2 (118).

Afin de tester l'effet du MPE-298 dans l'athérosclérose, des souris mâles déficientes en apoE (Jackson Laboratory, Bay Harbor, ME, USA) a été utilisé, et nourri avec une diète riche en lipides (40 kcal%) en en cholestérol (1,25 P/P%) à partir de 4 semaines de vie, afin d'exacerber l'hypercholestérolémie et le développement des lésions athérosclérotiques. La diète HFHC contient une quantité de lipides presque 2 fois plus élevée, de même qu'un apport en cholestérol plus important que la diète occidentale (Western Diet), qui contient 21% de lipides et 0.2% de cholestérol (P/P). L'utilisation de diète enrichie n'induit pas le développement d'athérosclérose, qui nécessite l'utilisation d'un modèle susceptible au développement de lésion, dans cette étude les souris déficientes en apoE, mais amplifie le développement de lésions plus étendues, plus rapidement. En effet, l'utilisation de souris apoE^{-/-} sans diète enrichie permet le développement de lésions substantielles en environ 20 semaines de vie (168), et l'ajout d'une diète occidentale permet d'obtenir un résultat similaire 6 semaines plus tôt (169). Avec une diète HFHC, notre étude a montré le développement de lésions en seulement 4 semaines de diète HFHC chez les souris apoE^{-/-} nourries avec la diète à partir de 4 semaines de vie, donc les souris développent des lésions substantielles à seulement 8 semaines de vie. À partir de 12 semaines de vie, les souris ont été traitées quotidiennement par injection sous-cutanée de la molécule cible, le MPE-298 (300 nmol/kg), le contrôle positif, MPE-003 (300 nmol/kg) ou encore le véhicule, NaCl 0.9%. Le traitement est poursuivi pendant 8 semaines, jusqu'à 20 semaines de vie, moment de l'euthanasie par isoflurane et exsanguination. Le nombre de semaines de diète HFHC avec le début du traitement a précédemment été ajusté afin d'avoir la formation de plaques athérosclérotiques avec une quantité suffisante de lésions pour permettre d'investiguer l'effet des traitements. Une durée 8 semaines de diète avant le début du traitement a été choisie à cet effet. La même investigation a été effectuée afin de déterminer la durée optimale de traitement, pour avoir une durée de traitement

suffisamment longue pour permettre d'observer l'effet des peptides. Quatre semaines de traitement ne sont pas une durée suffisante pour observer un effet des azapeptides, et le meilleur effet a été observé après une période de 8 semaines, c'est donc la durée qui a été choisie pour cette étude (108).

Lors de notre étude, le potentiel athérosclérotique du MPE-298 a été investigué afin d'être comparé avec ses prédécesseurs azapeptidiques ayant déjà démontré un effet anti-athérosclérotique. Nos résultats ont montré que chez les souris mâles apoE^{-/-}, le MPE-298 permet de diminuer les lésions athérosclérotiques autant au niveau de la crosse aortique qu'au niveau du sinus aortique, où le traitement induit une diminution des zones de lésion de 32% et de 17% respectivement par rapport au groupe véhicule, de manière similaire à la réduction observée chez les souris traitées par le MPE-003, notre contrôle positif. La taille des lésions au niveau des BCA a également montré une tendance à diminuer autant chez les souris traitées par le MPE-298 que celles traitées par le MPE-003, toutefois, la variation importante des résultats, associée au faible nombre d'échantillons analysés, empêche d'observer un effet significatif. De plus, l'effet anti-athérosclérotique observé est comparable aux résultats du MPE-003 dans la publication de Fréreau et al. (118). La taille des lésions athérosclérotiques est reliée à l'avènement de complications, soit par l'obstruction des vaisseaux, qui est directement relié à l'augmentation de la taille des lésions, ou encore par la rupture des plaques athérosclérotiques, reliée plus indirectement par le fait que l'augmentation de la taille des lésions induit une augmentation du cœur nécrotique, un facteur associé à l'augmentation du risque de rupture de la plaque (66). En effet, nous avons pu observer un effet stabilisant de l'azapeptide au niveau des sinus aortiques, où il induit une diminution des zones nécrotiques de 44%. Une réduction des zones nécrotiques a également été investiguée au niveau

de l'artère brachiocéphalique (BCA), toutefois non significative. La diminution de la taille du noyau nécrotique implique une diminution des débris cellulaires, qui sont généralement associés à la dégradation de la matrice extracellulaire et donc à la perte d'intégrité au niveau du cap fibreux des plaques athérosclérotiques, induisant une instabilité des lésions (72). Le noyau nécrotique contient également une proportion importante de cholestérol libre en cristaux ou encore estérifié, majoritairement dû à la nécrose des macrophages et cellules spumeuses, qui libère leur contenu lipidique suite à la mort cellulaire non programmée. La quantité de lipides augmente la taille du noyau nécrotique, et est donc associée à l'instabilité des plaques athérosclérotiques (170). D'un autre côté, toujours au niveau des BCA, la stabilité a également été investiguée par l'immunohistochimie du marqueur de l'apoptose, la caspase-3 clivée, où le MPE-298 induit la diminution du nombre de cellules apoptotiques de 45% par rapport au groupe véhicule. Les cellules apoptotiques sont indicatives de la stabilité des lésions athérosclérotiques, soit par le fait que l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques est directement associée à la progression des lésions (72). De plus, les cellules apoptotiques, si elles ne sont pas rapidement engouffrées par des cellules phagocytes, entrent en nécrose secondaire, et à cet effet contribuent à l'avancement du cœur nécrotique et donc à la diminution de la stabilité des lésions (72). Comme le MPE-298 permet la diminution du nombre de cellules apoptotiques, le traitement permet de diminuer la progression de la taille du noyau nécrotique, et par extension augmente la stabilité des lésions athérosclérotiques.

L'investigation de l'efférocytose par les marqueurs CD36 et MerTK en immunofluorescence a également été étudiée au niveau des BCA. L'efférocytose, la phagocytose des cellules apoptotiques ainsi que des débris générés par les cellules nécrotiques, est associée à la diminution de la taille du cœur nécrotique, et de ce fait contribue à la stabilité des lésions (57). Par rapport au

groupe véhicule, les 2 marqueurs ont tendance à être augmentés par le traitement avec les azapeptides. CD36 et MerTK sont deux molécules ponts (bridging molecules), impliquées dans la reconnaissance des cellules apoptotiques, qui sont retrouvées sur les macrophages, une importante cellule phagocyte en athérosclérose, indiquant possiblement une augmentation de l'efférocytose. En effet, l'augmentation des marqueurs associés aux phagocytes indiquerait une augmentation des cellules disponibles pour l'engouffrement des cellules apoptotiques, ce qui concorde avec la diminution des zones de nécrose observées. De plus, on peut observer que, dans tous les groupes, la taille des zones exprimant MerTK est corrélée avec la taille des zones nécrotiques, ce qui peut être expliqué par le fait que le MerTK est plus généralement localisé en périphérie des zones nécrotiques. En effet, en observant les photomicrographies, il est possible de constater que le CD36 est généralement distribué de façon ubiquitaire au niveau des lésions athérosclérotiques, tandis que MerTK est observé majoritairement en périphérie des zones nécrotiques. Comme MerTK est exprimé par les phagocytes responsables de l'efférocytose, comme par exemple les macrophages de type M2, leur emplacement est optimal pour l'engouffrement des cellules nécrotiques (57). En comparaison, le CD36, présent notamment chez les macrophages des BCA des souris apoE^{-/-}, joue plusieurs rôles en tant que récepteur éboueur en plus de sa fonction de molécule pont de l'efférocytose; il est ainsi plausible de retrouver ce récepteur de façon étendue dans les lésions athérosclérotiques. Les coefficients de Manders reflètent ces différentes localisations, par le coefficient de Manders M1, reflétant la colocalisation du MerTK (rouge) sur le CD36 (vert), qui est généralement élevé tandis que le coefficient de Manders M2, montrant la colocalisation du CD36 (vert) sur MerTK (rouge), est beaucoup plus faible, représentant l'expression plus localisée du MerTK. Ces observations concordent avec la différence entre les types cellulaires exprimant les marqueurs, étant donné que CD36, un récepteur généralement décrit comme ubiquitaire dans

l'organisme, est présent dans plusieurs types cellulaires, comme par exemple les plaquettes, les macrophages ainsi que les cellules musculaires, et est donc à cet effet distribué plus largement dans la lésion, et dans plusieurs types cellulaires différents (171). De son côté, MerTK est retrouvé dans les lésions athérosclérotiques uniquement au niveau des phagocytes de l'efférocytose, donc majoritairement au niveau des macrophages (172). Les deux marqueurs sont donc colocalisés lorsque retrouvé sur une cellule phagocyte, soit le macrophage. Cependant, une limite de cette analyse est que le marqueur du MerTK utilisé pour l'immunofluorescence n'est pas spécifique à la forme membranaire du MerTK, et à cet effet peut marquer également le MerTK soluble, qui est généralement associé à l'effet contraire sur l'efférocytose. Toutefois, certaines de nos investigations, comme par exemple la diminution des zones nécrotiques, indiqueraient une plus grande possibilité qu'ils s'agissent de MerTK membranaire proefférocytique, car MerTK soluble en grande quantité induirait une déficience et donc à cet effet une augmentation de la taille des zones nécrotiques. De plus, les BCA, colorées au trichrome Masson, ont permis d'observer que les azapeptides ne montrent pas d'effet significatif sur le pourcentage de collagène lésionnel, ce qui représente le meilleur pronostic pour les lésions athérosclérotiques. En effet, une diminution du collagène, la principale protéine structurale de la matrice extracellulaire (173), induit un phénotype de plaques instables, prônes à la rupture, par la perte de l'intégrité de la matrice extracellulaire, alors qu'une augmentation de la protéine entraîne une rigidité des athéromes, par l'augmentation de la densité fibrotique de la matrice extracellulaire, et donc induit un phénotype de plaques plus obstructif (174). La polarisation des macrophages entre le type proinflammatoire M1 et le type anti-inflammatoire M2 a également été investiguée en immunohistochimie, et lorsqu'exprimé en rapport des marqueurs CD206 (M2) sur iNOS (M1), le MPE-298 permet l'augmentation du ratio de 22%, un effet qui n'est toutefois pas significatif. On observe donc une

polarisation des macrophages se rapprochant plus du phénotype anti-inflammatoire. Le phénotype proinflammatoire est généralement associé à un mauvais pronostic de plaque, c'est-à-dire une diminution de la stabilité de l'athérome et un risque plus élevé de rupture, tandis que le phénotype anti-inflammatoire, associé à la résolution de l'inflammation en plus d'être une des cellules phagocytes principales responsables de l'efférocytose (57), et promeut à cet effet la stabilité des lésions athérosclérotiques. Certains gènes associés à la stabilité des lésions ainsi qu'à la polarisation des macrophages proinflammatoires de type M1 ont été mesurés par qPCR au niveau de l'aorte abdominale, soit la fibronectine, un marqueur de stabilité similaire au collagène, le MMP-14, le tPA et l'uPA, 3 marqueurs induisant l'instabilité des lésions athérosclérotiques, ainsi que l'oxyde nitrique synthase (Nos2) et le CD80, 2 marqueurs des macrophages de type M1. La fibronectine n'est pas affectée par le traitement avec le MPE-298. La fibronectine est une protéine de la matrice extracellulaire, qui, dans un contexte de stabilité, agit similairement au collagène. En effet, comme le collagène, si la fibronectine est augmentée, les plaques athérosclérotiques montrent une rigidité accrue, associée à une obstruction plus importante du flot sanguin, alors que si la fibronectine est diminuée, les plaques deviennent plus instables et susceptibles à la rupture (175). Comparablement à son effet sur le collagène, le traitement avec le MPE-298 n'affecte pas l'expression de la fibronectine, et donc n'induit pas de rigidité ou d'instabilité des lésions. De leur côté, les marqueurs d'instabilité sont tous diminués significativement par l'azapeptide, plus spécifiquement l'expression génique des protéases MMP-14 est diminuée de 56%, le tPA de 63% et l'uPA de 44%. Le MMP-14 est une métalloprotéinase dégradant la matrice extracellulaire dont les substrats incluent le collagène, la fibronectine et la laminine; sa diminution permet donc de conserver l'intégrité de la matrice extracellulaire, ce qui augmente la stabilité des lésions (176). L'effet du MPE-298 sur MMP-14 a également été montré dans une étude précédente, où le

traitement avec l'azapeptide linéaire MPE-003 avait montré une diminution de l'expression du gène de la MMP-14 (118). tPA et uPA, et leur gène respectif *plat* et *plau*, sont des marqueurs d'instabilité, notamment via leur activité fibrinolytique ainsi que leur induction de plusieurs MMPs, des enzymes dégradant la matrice extracellulaire (10). En effet, tPA et uPA sont des activateurs du plasminogène, induisant la formation de la plasmine, une protéase dégradant la matrice extracellulaire, plus spécifiquement la fibrine, qui agit également comme activatrice des MMPs, qui sont également des agents dégradants de la matrice extracellulaire. De plus, tPA et uPA sont également impliqués dans la déficience de l'efférocytose, soit que l'augmentation de la présence de tPA et uPA altère le bon fonctionnement de l'efférocytose (177). À cet effet, comme les 3 marqueurs sont diminués significativement par les injections quotidiennes de MPE-298, on peut observer des lésions athérosclérotiques beaucoup plus stables, avec une matrice extracellulaire conservant son intégrité et donc moins à risque de rupture (178). De plus, comme tPA et uPA sont diminués par le traitement par l'azapeptide, l'efférocytose est augmentée, ou plutôt n'est pas autant diminuée qu'en absence de traitement. Pour ce qui est de Nos2 et CD80 ont montré une tendance à diminuer, ce qui indique que les macrophages ne sont pas autant polarisés vers le phénotype proinflammatoire chez les souris traitées au MPE-298. Cette observation concorde avec l'augmentation du ratio M2/M1 par l'administration de l'azapeptide MPE-298. Les cytokines proinflammatoires plasmatiques ont également été mesurées afin de confirmer le potentiel anti-inflammatoire du MPE-298, et les médiateurs proinflammatoires IL-1 β et TNF- α sont significativement diminués par le traitement avec le MPE-298, respectivement de 55% et 47%. L'azapeptide montre donc un effet anti-inflammatoire systémique, ce qui est corroboré par la diminution de la nécrose des lésions, la tendance à l'augmentation des macrophages de

phénotype M2 et la diminution de l'expression tissulaire des protéases, qui sous-tendent une réduction de l'inflammation.

Finalement, nous avons démontré que l'effet de l'azapeptide MPE-298 ne change pas les taux de cholestérol plasmatique à la dose utilisée, ni le poids des souris et leur consommation de nourriture, car ces trois facteurs ne sont pas affectés par les injections quotidiennes d'azapeptides sur une période de 8 semaines. L'azapeptide n'est donc pas un hypolipidémiant ou un suppresseur d'appétit, et n'affecte donc pas la quantité de cholestérol dans la circulation sanguine, mais probablement leur destin au niveau des plaques athérosclérotiques, où la taille des plaques plus faible indique une plus faible quantité de cellules spumeuses.

La limite principale de cette étude est l'utilisation de souris mâle seulement, étant donné qu'il est connu que le risque d'athérosclérose est dépendant du sexe, il serait important d'investiguer également les femelles dans des études futures. De plus, comme mentionné précédemment, le marqueur de MerTK utilisé dans cette étude n'est pas spécifique à la forme membranaire du MerTK, et peut donc lier également la forme soluble du MerTK. La forme membranaire du MerTK est celle qui est utile comme molécule pont dans l'efférocytose, et le clivage du MerTK par ADAM17, qui induit la forme soluble, induit la perte de son effet efférocytique (179). Il serait donc important de compléter ces études avec un marqueur du MerTK spécifique à la forme membranaire. Étant donné qu'on observe une diminution des cellules apoptotiques et des zones nécrotiques, en plus de montrer une diminution de plat (gène associé à tPA) et plau (gène associé à uPA), qui sont anti-efférocytique, il serait logique d'observer plus de MerTK membranaires que soluble, mais ce serait une hypothèse à vérifier.

3.1. Conclusion

Tout d'abord, l'effet anti-athérosclérotique du MPE-298 a pu être observé dans trois sites différents, soit au niveau de la crosse aortique, du sinus aortique et de la BCA, où la taille des lésions observées est diminuée par le traitement, de manière comparable à ce qui peut être observé avec l'azapeptide MPE-003. En association avec la diminution de la taille des lésions, la taille du noyau nécrotique est également diminuée par le traitement avec l'azapeptide MPE-298 au niveau du sinus aortique et de la BCA, contribuant tel que mentionné à la stabilisation des athéromes.

À cet effet, pour investiguer plus amplement l'effet de notre azapeptide sur la stabilité des lésions athérosclérotiques, plusieurs éléments reliés à la stabilité des plaques ont été investigués afin de déterminer le profil stabilisant du MPE-298. Premièrement, en immunofluorescence, les marqueurs de l'efférocytose CD36 et MerTK ont été investigués dans les BCA. Les deux marqueurs ont tendance à être augmentés par l'utilisation des azapeptides, et la taille des zones exprimant MerTK est corrélée avec la taille des zones nécrotiques, le marqueur étant plus généralement localisé en périphérie des zones nécrotiques. Selon les coefficients de Manders M1 (MerTK sur CD36) et M2 (CD36 sur MerTK), le MerTK, qui est plus concentré en périphérie des zones nécrotiques, est largement colocalisé avec le CD36, alors que le CD36, dont la distribution est plus étendue dans les lésions athérosclérotiques, est moins colocalisé avec le MerTK. Deuxièmement, les comptes cellulaires des cellules apoptotiques déterminés par le marquage immunohistochimique de la caspase-3 clivée sont diminués par le traitement par le MPE-298 au niveau des BCA. Le ratio des comptes de macrophages anti-inflammatoires M2 sur les macrophages proinflammatoires M1 chez les souris traitées avec le MPE-298 indique une polarisation vers le phénotype M2. Troisièmement, la coloration des fibres de collagènes par le

trichrome Masson n'a montré aucun changement chez les souris traitées au niveau des BCA. Quatrièmement, certains gènes associés à la stabilité des plaques ont été investigués par qPCR au niveau de l'aorte abdominale. Le marqueur de stabilité fibronectine n'a pas été affecté par le traitement, alors que les marqueurs d'instabilité plat, plat et MMP-14 sont tous diminués par l'injection du MPE-298, tandis que Nos2 et CD80, deux marqueurs des macrophages de type M1, n'ont pas été modifiés significativement.

Finalement, comme nous avons pu observer que l'effet observé sur les lésions athérosclérotiques est indépendant du taux de cholestérol plasmatique, du poids des souris ainsi que de leur consommation de nourriture. L'azapeptide MPE-298 n'est donc pas un hypolipidémiant et à cet effet offre une voie de traitement différente des traitements présentement disponibles. De plus, le traitement n'affecte pas la consommation de nourriture, et à cet effet est indépendant de la diète, n'agissant pas comme un suppresseur d'appétit.

L'azapeptide MPE-298 est anti-athérosclérotique, ralentissant la progression des lésions athérosclérotiques, a un effet stabilisant sur les lésions, par sa diminution des zones nécrotiques, de l'apoptose ainsi que des marqueurs d'instabilité plat, plau et MMP-14, en plus de montrer une tendance à augmenter les marqueurs d'efférocytose CD36 et MerTK. Le MPE-298 montre également un effet anti-inflammatoire, par la polarisation des macrophages vers un phénotype moins inflammatoire, donc une diminution des concentrations plasmatiques des macrophages M1 et une augmentation des macrophages M2, ainsi qu'une diminution des cytokines proinflammatoires IL-1 β et TNF- α .

3.2. Futures perspectives

Pour ce qui est des perspectives futures, l'investigation du rôle des azapeptides dans l'efférocytose devrait être investiguée plus profondément, tout d'abord en complétant les résultats obtenus avec un marqueur membranaire du MerTK, puis en observant l'engouffrement direct des cellules apoptotiques, par exemple en immunofluorescence, avec un marqueur des cellules apoptotiques, comme par exemple un marqueur de la caspase-3, utilisée dans notre étude en immunohistochimie, ou encore le marqueur TUNEL, également associé à l'apoptose, en association avec un marqueur des phagocytes impliqués dans l'efférocytose, qui sont majoritairement des macrophages de type M2, marqués par exemple par le CD206. L'investigation de la colocalisation de ces deux marqueurs en immunofluorescence permettrait d'observer les cellules apoptotiques engouffrées par les cellules phagocytes. Une autre méthode possible pour l'investigation de l'efférocytose, cette fois *in vitro*, est l'utilisation de billes de silice recouverte avec la phosphatidylsérine, un signal *eat-me* utilisé pour imiter le phénotype de cellule apoptotique disponible pour l'efférocytose. Les billes, marquées par un fluorochrome, peuvent ensuite être mises en présence de macrophages pour observer leur capacité de phagocytose (180).

En plus d'une investigation plus approfondie de l'efférocytose, il serait important d'investiguer la route du MPE-298 après sa liaison au récepteur CD36. Il a déjà été observé par essais *in vitro* que la liaison de l'azapeptide au récepteur CD36 induit l'endocytose du complexe ligand-récepteur, mais les mécanismes intracellulaires associés sont encore à déterminer. Le recyclage ou la dégradation du récepteur, et les voies de signalisation activées seraient des avenues importantes à investiguer.

Bibliographie

1. Ritchie H, Roser M. Burden of Disease OurWorldInData.org: 2016 [cité le novembre 24 2021]. Disponible: <https://ourworldindata.org/burden-of-disease>
2. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019: Update From the GBD 2019 Study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2020;76(25):2982-3021.
3. HRI. atherosclerosis : 2021 [cité le novembre 24 2021]. Disponible: <https://www.hri.org.au/health/learn/cardiovascular-disease/atherosclerosis>
4. Kronzon I, Tunick PA. Aortic Atherosclerotic Disease and Stroke. 2006;114(1):63-75.
5. Timmis A, Townsend N, Gale CP, Torbica A, Lettino M, Petersen SE, et al. European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. *Eur Heart J*. 2020;41(1):12-85. Epub 2019/12/11.
6. Chen G, Farris MS, Cowling T, Pinto L, Rogoza RM, MacKinnon E, et al. Prevalence of atherosclerotic cardiovascular disease and subsequent major adverse cardiovascular events in Alberta, Canada: A real-world evidence study. 2021;44(11):1613-20.
7. Chiu M, Austin PC, Manuel DG, Tu JV. Comparison of cardiovascular risk profiles among ethnic groups using population health surveys between 1996 and 2007. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2010;182(8):E301-E10. Epub 2010/04/19.
8. Dempsey RJ, Vemuganti R, Varghese T, Hermann BP. A review of carotid atherosclerosis and vascular cognitive decline: a new understanding of the keys to symptomology. *Neurosurgery*. 2010;67(2):484-93; discussion 93-4. Epub 2010/07/21.
9. Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Laboratory Investigation*. 2005;85(1):9-23.
10. Zhu Y, Xian X, Wang Z, Bi Y, Chen Q, Han X, et al. Research Progress on the Relationship between Atherosclerosis and Inflammation. *Biomolecules*. 2018;8(3). Epub 2018/08/26.
11. Rikitake Y, Takai Y. Chapter three - Directional Cell Migration: Regulation by Small G Proteins, Nectin-like Molecule-5, and Afadin. Dans: Jeon KW, rédacteur. *Int Rev Cell Mol Biol: Academic Press*; 2011. p. 97-143.
12. Gencer S, Evans BR, van der Vorst EPC, Döring Y, Weber C. Inflammatory Chemokines in Atherosclerosis. *Cells*. 2021;10(2). Epub 2021/01/29.
13. Khalil MF, Wagner WD, Goldberg IJ. Molecular Interactions Leading to Lipoprotein Retention and the Initiation of Atherosclerosis. 2004;24(12):2211-8.
14. Pentikäinen M. Retention and Accumulation of Low Density Lipoprotein Particles in the Extracellular Matrix of the Arterial Intima in Atherogenesis. 1999.
15. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med*. 2014;5(8):927-46. Epub 2014/12/10.
16. Burke-Gaffney A, Brooks AV, Bogle RG. Regulation of chemokine expression in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*. 2002;38(5):283-92. Epub 2002/12/19.
17. de Winther MP, van Dijk KW, Havekes LM, Hofker MH. Macrophage scavenger receptor class A: A multifunctional receptor in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(2):290-7. Epub 2000/02/17.
18. Moore KJ, Freeman MW. Scavenger Receptors in Atherosclerosis. 2006;26(8):1702-11.
19. Vangaveti V, Shashidhar V, Collier F, Hodge J, Rush C, Malabu U, et al. 9- and 13-HODE regulate fatty acid binding protein-4 in human macrophages, but does not involve HODE/GPR132 axis in PPAR-γ regulation of FABP4. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2018;9(5):137-50. Epub 2018/05/26.
20. Bujold K. Régulation du métabolisme et du transport des lipides

dans les macrophages: potentiel anti-athérosclérotique

des ligands du CD36 : Université de Montréal; 2012.

21. Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E and Reverse Cholesterol Transport. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11). Epub 2018/11/09.
22. Zhou L, Li C, Gao L, Wang A. High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review). *Mol Med Rep*. 2015;12(3):4015-21. Epub 2015/06/18.
23. Donato LJ, Meeusen JW. Chapter 28 - Lipids and lipoproteins. Dans: Clarke W, Marzinke MA, rédacteurs. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition)*: Academic Press; 2020. p. 487-506.
24. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, Reusch N, Saglam A, Hinkley ER, et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. 2019;10.
25. Ylä-Herttuala S, Bentzon JF, Daemen M, Falk E, Garcia-Garcia HM, Herrmann J, et al. Stabilization of atherosclerotic plaques: an update. *European Heart Journal*. 2013;34(42):3251-8.
26. Halvorsen B, Otterdal K, Dahl TB, Skjelland M, Gullestad L, Øie E, et al. Atherosclerotic plaque stability--what determines the fate of a plaque? *Prog Cardiovasc Dis*. 2008;51(3):183-94. Epub 2008/11/26.
27. Radwan A, Alanazi F. Targeting cancer using cholesterol conjugates. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2014;22:3-16.
28. Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet*. 2009;10(2):109-21. Epub 2009/01/14.
29. Röhrl C, Stangl H. Cholesterol metabolism-physiological regulation and pathophysiological deregulation by the endoplasmic reticulum. *Wien Med Wochenschr*. 2018;168(11-12):280-5. Epub 2018/03/01. Cholesterinstoffwechsel – physiologische Regulation und pathophysiologische Deregulation durch das endoplasmatische Retikulum.
30. Bloch K. Sterol molecule: structure, biosynthesis, and function. *Steroids*. 1992;57(8):378-83. Epub 1992/08/01.
31. Heino S, Lusa S, Somerharju P, Ehnholm C, Olkkonen VM, Ikonen E. Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(15):8375-80. Epub 2000/07/13.
32. Raychaudhuri S, Im YJ, Hurley JH, Prinz WA. Nonvesicular sterol movement from plasma membrane to ER requires oxysterol-binding protein-related proteins and phosphoinositides. *J Cell Biol*. 2006;173(1):107-19. Epub 2006/04/06.
33. Afonso MS, Machado RM, Lavrador MS, Quintao ECR, Moore KJ, Lottenberg AM. Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis. *Nutrients*. 2018;10(6). Epub 2018/06/15.
34. Sitaula S, Burris TP. Cholesterol and Other Steroids. Dans: Bradshaw RA, Stahl PD, rédacteurs. *Encyclopedia of Cell Biology*. Waltham: Academic Press; 2016. p. 173-9.
35. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010;327(5966):656-61. Epub 2010/02/06.
36. Lee J, Breton G, Oliveira TY, Zhou YJ, Aljoufi A, Pühr S, et al. Restricted dendritic cell and monocyte progenitors in human cord blood and bone marrow. *J Exp Med*. 2015;212(3):385-99. Epub 2015/02/18.
37. Olingy CE, San Emeterio CL, Ogle ME, Krieger JR, Bruce AC, Pfau DD, et al. Non-classical monocytes are biased progenitors of wound healing macrophages during soft tissue injury. *Scientific Reports*. 2017;7(1):447.
38. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res*. 2014;2(1):1. Epub 2014/01/09.

39. Zamani F, Zare Shahneh F, Aghebati-Maleki L, Baradaran B. Induction of CD14 Expression and Differentiation to Monocytes or Mature Macrophages in Promyelocytic Cell Lines: New Approach. *Adv Pharm Bull.* 2013;3(2):329-32. Epub 2013/12/07.
40. Ozaki Y, Imanishi T, Hosokawa S, Nishiguchi T, Taruya A, Tanimoto T, et al. Association of Toll-Like Receptor 4 on Human Monocyte Subsets and Vulnerability Characteristics of Coronary Plaque as Assessed by 64-Slice Multidetector Computed Tomography. *Circulation Journal.* 2017;81(6):837-45.
41. Imanishi T, Ikejima H, Tsujioka H, Kuroi A, Ishibashi K, Komukai K, et al. Association of monocyte subset counts with coronary fibrous cap thickness in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis.* 2010;212(2):628-35.
42. Cappellari R, D'Anna M, Bonora BM, Rigato M, Cignarella A, Avogaro A, et al. Shift of monocyte subsets along their continuum predicts cardiovascular outcomes. *Atherosclerosis.* 2017;266:95-102.
43. Kashiwagi M, Imanishi T, Tsujioka H, Ikejima H, Kuroi A, Ozaki Y, et al. Association of monocyte subsets with vulnerability characteristics of coronary plaques as assessed by 64-slice multidetector computed tomography in patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis.* 2010;212(1):171-6.
44. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, et al. CD14++CD16+ Monocytes Independently Predict Cardiovascular Events: A Cohort Study of 951 Patients Referred for Elective Coronary Angiography. *Journal of the American College of Cardiology.* 2012;60(16):1512-20.
45. Hamers AAJ, Dinh HQ, Thomas GD, Marcovecchio P, Blatchley A, Nakao CS, et al. Human Monocyte Heterogeneity as Revealed by High-Dimensional Mass Cytometry. 2019;39(1):25-36.
46. Buscher K, Marcovecchio P, Hedrick CC, Ley K. Patrolling Mechanics of Non-Classical Monocytes in Vascular Inflammation. *Front Cardiovasc Med.* 2017;4:80. Epub 2018/01/10.
47. Colin S, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol Rev.* 2014;262(1):153-66. Epub 2014/10/17.
48. Wang N, Liang H, Zen K. Molecular Mechanisms That Influence the Macrophage M1–M2 Polarization Balance. 2014;5.
49. Yang S, Yuan HQ, Hao YM, Ren Z, Qu SL, Liu LS, et al. Macrophage polarization in atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2020;501:142-6. Epub 2019/11/16.
50. Shioi A, Ikari Y. Plaque Calcification During Atherosclerosis Progression and Regression. *J Atheroscler Thromb.* 2018;25(4):294-303. Epub 2017/12/15.
51. Oh MJ, Zhang C, LeMaster E, Adamos C, Berdyshev E, Bogachkov Y, et al. Oxidized LDL signals through Rho-GTPase to induce endothelial cell stiffening and promote capillary formation. *J Lipid Res.* 2016;57(5):791-808. Epub 2016/03/19.
52. Martin CJ, Peters KN, Behar SM. Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control. *Curr Opin Microbiol.* 2014;17:17-23. Epub 2014/03/04.
53. Hoffmann PR, deCathelineau AM, Ogden CA, Leverrier Y, Bratton DL, Daleke DL, et al. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol.* 2001;155(4):649-59. Epub 2001/11/14.
54. Korn D, Frasch SC, Fernandez-Boyanapalli R, Henson PM, Bratton DL. Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Front Immunol.* 2011;2:57. Epub 2011/01/01.
55. Cullen SP, Henry CM, Kearney CJ, Logue SE, Feoktistova M, Tynan GA, et al. Fas/CD95-induced chemokines can serve as "find-me" signals for apoptotic cells. *Mol Cell.* 2013;49(6):1034-48. Epub 2013/02/26.
56. Ravichandran KS. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *Journal of Experimental Medicine.* 2010;207(9):1807-17.
57. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(1):36-46. Epub 2009/12/05.

58. Vandivier RW, Henson PM, Douglas IS. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest*. 2006;129(6):1673-82. Epub 2006/06/17.
59. Flynn MC, Pernes G, Lee MKS, Nagareddy PR, Murphy AJ. Monocytes, Macrophages, and Metabolic Disease in Atherosclerosis. *Front Pharmacol*. 2019;10:666. Epub 2019/06/30.
60. Karwowski W, Naumnik B, Szczepański M, Myśliwiec M. The mechanism of vascular calcification - a systematic review. *Med Sci Monit*. 2012;18(1):Ra1-11. Epub 2011/12/31.
61. Canet-Soulas E, Bessueille L, Mechtouff L, Magne D. The Elusive Origin of Atherosclerotic Plaque Calcification. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:622736. Epub 2021/03/27.
62. Corsini A, Bernini F, Quarato P, Donetti E, Bellosta S, Fumagalli R, et al. Non-lipid-related effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Cardiology*. 1996;87(6):458-68. Epub 1996/11/01.
63. Tabas I. Cholesterol and phospholipid metabolism in macrophages. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1529(1-3):164-74. Epub 2000/12/09.
64. Tabas I, Marathe S, Keesler GA, Beatini N, Shiratori Y. Evidence that the initial up-regulation of phosphatidylcholine biosynthesis in free cholesterol-loaded macrophages is an adaptive response that prevents cholesterol-induced cellular necrosis. Proposed role of an eventual failure of this response in foam cell necrosis in advanced atherosclerosis. *J Biol Chem*. 1996;271(37):22773-81. Epub 1996/09/13.
65. Woo HG, Heo SH, Kim EJ, Chang D-i, Song TJ, Kim BJ. Atherosclerotic plaque locations may be related to different ischemic lesion patterns. *BMC Neurol*. 2020;20(1):288.
66. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(8 Suppl):C7-12. Epub 2006/04/25.
67. Sodhi N, Brown DL. 7 - Pathophysiology of Acute Coronary Syndromes: Plaque Rupture and Atherothrombosis. Dans: Brown DL, rédacteur. *Cardiac Intensive Care (Third Edition)*. Philadelphia: Elsevier; 2019. p. 68-80.e2.
68. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, et al. Atherosclerotic Plaque Progression and Vulnerability to Rupture. 2005;25(10):2054-61.
69. Ruberg FL, Loscalzo J. Prothrombotic determinants of coronary atherothrombosis. *Vasc Med*. 2002;7(4):289-99. Epub 2003/04/25.
70. Li M, Wang Z-W, Fang L-J, Cheng S-Q, Wang X, Liu N-F. Programmed cell death in atherosclerosis and vascular calcification. *Cell Death & Disease*. 2022;13(5):467.
71. Priante G, Giancesello L, Ceol M, Del Prete D, Anglani F. Cell Death in the Kidney. 2019;20(14):3598.
72. Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GR. Necrotic cell death in atherosclerosis. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(5):749-60. Epub 2011/05/26.
73. Westman J, Grinstein S, Marques PE. Phagocytosis of Necrotic Debris at Sites of Injury and Inflammation. *Front Immunol*. 2019;10:3030. Epub 2020/01/31.
74. Farooqui AA. Role of Dyslipidemia in Atherosclerosis. Dans: Lee S-H, Kang MK, rédacteurs. *Stroke Revisited: Dyslipidemia in Stroke*. Singapore: Springer Singapore; 2021. p. 3-14.
75. Jiang H, Zhou Y, Nabavi SM, Sahebkar A, Little PJ, Xu S, et al. Mechanisms of Oxidized LDL-Mediated Endothelial Dysfunction and Its Consequences for the Development of Atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med*. 2022;9:925923. Epub 2022/06/21.
76. Fruhwirth GO, Moutzi A, Loidl A, Ingolic E, Hermetter A. The oxidized phospholipids POVPC and PGPC inhibit growth and induce apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761(9):1060-9. Epub 2006/08/15.
77. Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol Biol*. 2010;610:403-17. Epub 2009/12/17.

78. Goo Y-H. Chapter 23 - Cholesterol Metabolism in Atherosclerosis Development. Dans: Patel VB, rédacteur. *The Molecular Nutrition of Fats*: Academic Press; 2019. p. 299-306.
79. Sato R. Functions of Cholesterol Metabolites. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2015;61 Suppl:S151-3. Epub 2015/11/26.
80. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and Atherosclerosis. 2002;105(9):1135-43.
81. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023-. Epub 2017/11/22.
82. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001;104(3):365-72. Epub 2001/07/18.
83. Held C, White HD, Stewart RAH, Budaj A, Cannon CP, Hochman JS, et al. Inflammatory Biomarkers Interleukin-6 and C-Reactive Protein and Outcomes in Stable Coronary Heart Disease: Experiences From the STABILITY (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy) Trial. *J Am Heart Assoc*. 2017;6(10). Epub 2017/10/27.
84. Reiss AB, Siegart NM, De Leon J. Interleukin-6 in atherosclerosis: atherogenic or atheroprotective? *Clinical Lipidology*. 2017;12(1):14-23.
85. Badimon L, Peña E, Arderiu G, Padró T, Slevin M, Vilahur G, et al. C-Reactive Protein in Atherothrombosis and Angiogenesis. *Front Immunol*. 2018;9:430. Epub 2018/03/20.
86. Rać ME, Safranow K, Poncyljusz W. Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Mol Med*. 2007;13(5-6):288-96. Epub 2007/08/04.
87. Huynh D. Les effets cardioprotecteurs de peptides dérivés des sécrétagogues de l'hormone de croissance dans le modèle d'ischémie-reperfusion du myocarde murin : université de Montréal; 2018.
88. Silverstein RL, Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal*. 2009;2(72):re3. Epub 2009/05/28.
89. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*. 2001;108(6):785-91. Epub 2001/09/19.
90. Silverstein RL, Li W, Park YM, Rahaman SO. Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2010;121:206-20. Epub 2010/08/11.
91. Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest*. 1992;90(4):1513-22. Epub 1992/10/01.
92. Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, et al. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest*. 2000;105(8):1095-108. Epub 2000/04/20.
93. Allahverdian S, Pannu PS, Francis GA. Contribution of monocyte-derived macrophages and smooth muscle cells to arterial foam cell formation. *Cardiovasc Res*. 2012;95(2):165-72.
94. Bessi VL, Labbé SM, Huynh DN, Ménard L, Jossart C, Febbraio M, et al. EP 80317, a selective CD36 ligand, shows cardioprotective effects against post-ischaemic myocardial damage in mice. *Cardiovascular Research*. 2012;96(1):99-108.
95. Rekhi UR, Omar M, Alexiou M, Delyea C, Immaraj L, Elahi S, et al. Endothelial Cell CD36 Reduces Atherosclerosis and Controls Systemic Metabolism. *Front Cardiovasc Med*. 2021;8:768481. Epub 2021/12/11.
96. Chen Y, Zhang J, Cui W, Silverstein RL. CD36, a signaling receptor and fatty acid transporter that regulates immune cell metabolism and fate. *J Exp Med*. 2022;219(6). Epub 2022/04/20.
97. Mellal K, Omri S, Mulumba M, Tahiri H, Fortin C, Dorion M-F, et al. Immunometabolic modulation of retinal inflammation by CD36 ligand. *Scientific Reports*. 2019;9(1):12903.

98. Jiménez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med.* 2000;6(1):41-8. Epub 1999/12/29.
99. Kuda O, Pietka TA, Demianova Z, Kudova E, Cvacka J, Kopecky J, et al. Sulfo-N-succinimidyl oleate (SSO) inhibits fatty acid uptake and signaling for intracellular calcium via binding CD36 lysine 164: SSO also inhibits oxidized low density lipoprotein uptake by macrophages. *J Biol Chem.* 2013;288(22):15547-55. Epub 2013/04/23.
100. Pownall HJ. Commentary on SSO and other putative inhibitors of FA transport across membranes by CD36 disrupt intracellular metabolism, but do not affect fatty acid translocation. *J Lipid Res.* 2020;61(5):595-7. Epub 2020/03/22.
101. Proulx C, Zhang J, Sabatino D, Chemtob S, Ong H, Lubell WD. Synthesis and Biomedical Potential of Azapeptide Modulators of the Cluster of Differentiation 36 Receptor (CD36). *Biomedicines.* 2020;8(8). Epub 2020/07/29.
102. Drahotka Z, Vrbacký M, Nůsková H, Kazdová L, Zídek V, Landa V, et al. Succinimidyl oleate, established inhibitor of CD36/FAT translocase inhibits complex III of mitochondrial respiratory chain. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391(3):1348-51.
103. Bowers CY, Momany FA, Reynolds GA, Hong A. On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology.* 1984;114(5):1537-45. Epub 1984/05/01.
104. Demers A, McNicoll N, Febbraio M, Servant M, Marleau S, Silverstein R, et al. Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem J.* 2004;382(Pt 2):417-24. Epub 2004/06/05.
105. Roumi M, Marleau S, du Souich P, Maggi T, Deghenghi R, Ong H. Kinetics and disposition of hexarelin, a peptidic growth hormone secretagogue, in rats. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(1):44-50. Epub 1999/12/28.
106. Sigalos JT, Pastuszak AW. The Safety and Efficacy of Growth Hormone Secretagogues. *Sex Med Rev.* 2018;6(1):45-53. Epub 2017/04/13.
107. Jiang B, Wang M, Li X, Ren P, Li G, Wang Y, et al. Hexarelin attenuates abdominal aortic aneurysm formation by inhibiting SMC phenotype switch and inflammasome activation. *Microvasc Res.* 2022;140:104280.
108. Marleau S, Harb D, Bujold K, Avallone R, Iken K, Wang Y, et al. EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. 2005;19(13):1869-71.
109. Davenport AP, Bonner TI, Foord SM, Harmar AJ, Neubig RR, Pin JP, et al. International Union of Pharmacology. LVI. Ghrelin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev.* 2005;57(4):541-6. Epub 2005/12/31.
110. Cassoni P, Papotti M, Ghè C, Catapano F, Sapino A, Graziani A, et al. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(4):1738-45. Epub 2001/04/12.
111. Zoccal KF, Gardinassi LG, Bordon KCF, Arantes EC, Marleau S, Ong H, et al. EP80317 Restrains Inflammation and Mortality Caused by Scorpion Envenomation in Mice. *Front Pharmacol.* 2019;10:171. Epub 2019/03/20.
112. Proulx C, Sabatino D, Hopewell R, Spiegel J, García Ramos Y, Lubell WD. Azapeptides and their therapeutic potential. *Future Med Chem.* 2011;3(9):1139-64. Epub 2011/08/03.
113. Traoré M, Doan ND, Lubell WD. Diversity-oriented synthesis of azapeptides with basic amino acid residues: aza-lysine, aza-ornithine, and aza-arginine. *Org Lett.* 2014;16(13):3588-91. Epub 2014/06/25.

114. Doan N-D, Zhang J, Traoré M, Kamdem W, Lubell WD. Solid-phase synthesis of C-terminal azapeptides. 2015;21(5):387-91.
115. Chignen Possi K, Mulumba M, Omri S, Garcia-Ramos Y, Tahiri H, Chemtob 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(22):9263-74. Epub 2017/10/14.
116. Ding Y, Kang J, Liu S, Xu Y, Shao B. The Protective Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Neurol*. 2020;11:588516. Epub 2020/12/08.
117. Frégeau G, Sarduy R, Ménard L, Machane S, Marhoug A, Ong H, et al. Azapeptide MPE-001, a CD36 ligand, reduces atherosclerosis lesions progression and inflammatory biomarkers expression in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2018;275:e53.
118. Frégeau G, Sarduy R, Elimam H, Esposito CL, Mellal K, Ménard L, et al. Atheroprotective and atheroregressive potential of azapeptide derivatives of GHRP-6 as selective CD36 ligands in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2020;307:52-62.
119. Proulx C, Picard É, Boeglin D, Pohankova P, Chemtob S, Ong H, 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(14):6502-11. Epub 2012/06/21.
120. Ohm RG, Mulumba M, Chingle RM, Ahsanullah, Zhang J, Chemtob S, et al. Diversity-Oriented A(3)-Macrocyclization for Studying Influences of Ring-Size and Shape of Cyclic Peptides: CD36 Receptor Modulators. *J Med Chem*. 2021;64(13):9365-80. Epub 2021/06/24.
121. Gisterå A, Ketelhuth DFJ, Malin SG, Hansson GK. Animal Models of Atherosclerosis—Supportive Notes and Tricks of the Trade. 2022;130(12):1869-87.
122. Lo Sasso G, Schlage WK, Boué S, Veljkovic E, Peitsch MC, Hoeng J. The Apoe(-/-) mouse model: a suitable model to study cardiovascular and respiratory diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *J Transl Med*. 2016;14(1):146. Epub 2016/05/22.
123. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous Hypercholesterolemia and Arterial Lesions in Mice Lacking Apolipoprotein E. 1992;258(5081):468-71.
124. Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donckt C, Martinet W, et al. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2017;816:3-13. Epub 2017/05/10.
125. Miao J, Haas JT, Manthena P, Wang Y, Zhao E, Vaitheesvaran B, et al. Hepatic insulin receptor deficiency impairs the SREBP-2 response to feeding and statins. *J Lipid Res*. 2014;55(4):659-67. Epub 2014/02/12.
126. Madison BB. Srebp2: A master regulator of sterol and fatty acid synthesis. *J Lipid Res*. 2016;57(3):333-5. Epub 2016/01/23.
127. Lebeau PF, Byun JH, Platko K, Saliba P, Sguazzin M, MacDonald ME, et al. Caffeine blocks SREBP2-induced hepatic PCSK9 expression to enhance LDLR-mediated cholesterol clearance. *Nature Communications*. 2022;13(1):770.
128. Zapolska-Downar D, Siennicka A, Kaczmarczyk M, Kołodziej B, Naruszewicz M. Simvastatin modulates TNFalpha-induced adhesion molecules expression in human endothelial cells. *Life Sci*. 2004;75(11):1287-302. Epub 2004/07/06.
129. Schönbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? *Circulation*. 2004;109(21 Suppl 1):Ii18-26. Epub 2004/06/03.
130. Sirtori CR. The pharmacology of statins. *Pharmacological Research*. 2014;88:3-11.
131. Draeger A, Monastyrskaya K, Mohaupt M, Hoppeler H, Savolainen H, Allemann C, et al. Statin therapy induces ultrastructural damage in skeletal muscle in patients without myalgia. 2006;210(1):94-102.

132. Poirier S, Mayer G, Poupon V, McPherson PS, Desjardins R, Ly K, et al. Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density lipoprotein receptor degradation: evidence for an intracellular route. *J Biol Chem*. 2009;284(42):28856-64. Epub 2009/07/29.
133. Lagace TA, Curtis DE, Garuti R, McNutt MC, Park SW, Prather HB, et al. Secreted PCSK9 decreases the number of LDL receptors in hepatocytes and in livers of parabiotic mice. *J Clin Invest*. 2006;116(11):2995-3005. Epub 2006/11/03.
134. Zhang DW, Lagace TA, Garuti R, Zhao Z, McDonald M, Horton JD, et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J Biol Chem*. 2007;282(25):18602-12. Epub 2007/04/25.
135. Benjannet S, Rhainds D, Essalmani R, Mayne J, Wickham L, Jin W, et al. NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem*. 2004;279(47):48865-75. Epub 2004/09/11.
136. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH, Jr., Hobbs HH. Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med*. 2006;354(12):1264-72. Epub 2006/03/24.
137. Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK, Hobbs HH. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet*. 2005;37(2):161-5. Epub 2005/01/18.
138. Yurtseven E, Ural D, Baysal K, Tokgözoğlu L. An Update on the Role of PCSK9 in Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2020;27(9):909-18. Epub 2020/07/28.
139. Ferri N, Tibolla G, Pirillo A, Cipollone F, Mezzetti A, Pacia S, et al. Proprotein convertase subtilisin kexin type 9 (PCSK9) secreted by cultured smooth muscle cells reduces macrophages LDLR levels. *Atherosclerosis*. 2012;220(2):381-6. Epub 2011/12/20.
140. Tang Y, Li S-L, Hu J-H, Sun K-J, Liu L-L, Xu D-Y. Research progress on alternative non-classical mechanisms of PCSK9 in atherosclerosis in patients with and without diabetes. *Cardiovascular Diabetology*. 2020;19(1):33.
141. Shapiro MD, Fazio S. PCSK9 and Atherosclerosis - Lipids and Beyond. *J Atheroscler Thromb*. 2017;24(5):462-72. Epub 2017/03/18.
142. Shan L, Pang L, Zhang R, Murgolo NJ, Lan H, Hedrick JA. PCSK9 binds to multiple receptors and can be functionally inhibited by an EGF-A peptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;375(1):69-73. Epub 2008/08/05.
143. Gürgöze MT, Muller-Hansma AHG, Schreuder MM, Galema-Boers AMH, Boersma E, Roeters van Lennep JE. Adverse Events Associated With PCSK9 Inhibitors: A Real-World Experience. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;105(2):496-504. Epub 2018/07/28.
144. Corson MA. Phospholipase A2 inhibitors in atherosclerosis: the race is on. *The Lancet*. 2009;373(9664):608-10.
145. Rosenson RS, Hurt-Camejo E. Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis. *European Heart Journal*. 2012;33(23):2899-909.
146. Zalewski A, Macphee C. Role of Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ in Atherosclerosis. 2005;25(5):923-31.
147. Wilensky RL, Shi Y, Mohler ER, 3rd, Hamamdzcic D, Burgert ME, Li J, et al. Inhibition of lipoprotein-associated phospholipase A2 reduces complex coronary atherosclerotic plaque development. *Nat Med*. 2008;14(10):1059-66. Epub 2008/09/23.
148. Meissner M, Wolters H, de Boer RA, Havinga R, Boverhof R, Bloks VW, et al. Bile acid sequestration normalizes plasma cholesterol and reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. No additional effect of physical activity. *Atherosclerosis*. 2013;228(1):117-23.
149. Ross S, D'Mello M, Anand SS, Eikelboom J, Stewart AFR, Samani NJ, et al. Effect of Bile Acid Sequestrants on the Risk of Cardiovascular Events. 2015;8(4):618-27.

150. Zhou R, Stouffer GA, Smith SC. Targeting the Cholesterol Paradigm in the Risk Reduction for Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Does the Mechanism of Action of Pharmacotherapy Matter for Clinical Outcomes? 2021;26(6):533-49.
151. Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . 1997;94(9):4312-7.
152. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart J-C. Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. 1998;98(19):2088-93.
153. Jakob T, Nordmann AJ, Schandelmaier S, Ferreira-González I, Briel M. Fibrates for primary prevention of cardiovascular disease events. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;11(11):Cd009753. Epub 2016/11/17.
154. Jacobson TA, Zimmerman FH. Fibrates in combination with statins in the management of dyslipidemia. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2006;8(1):35-41; quiz 2-3. Epub 2006/01/13.
155. Dujovne CA, Williams CD, Ito MK. What combination therapy with a statin, if any, would you recommend? *Curr Atheroscler Rep*. 2011;13(1):12-22. Epub 2010/11/26.
156. Ma J, Chen X. Anti-inflammatory Therapy for Coronary Atherosclerotic Heart Disease: Unanswered Questions Behind Existing Successes. *Front Cardiovasc Med*. 2020;7:631398. Epub 2021/02/19.
157. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. 2017;377(12):1119-31.
158. Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, Libby P. Residual inflammatory risk associated with interleukin-18 and interleukin-6 after successful interleukin-1 β inhibition with canakinumab: further rationale for the development of targeted anti-cytokine therapies for the treatment of atherothrombosis. *Eur Heart J*. 2020;41(23):2153-63. Epub 2019/09/11.
159. Zahid A, Li B, Kombe AJK, Jin T, Tao J. Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Front Immunol*. 2019;10:2538. Epub 2019/11/22.
160. Deftereos SG, Beerkens FJ, Shah B, Giannopoulos G, Vrachatis DA, Giotaki SG, et al. Colchicine in Cardiovascular Disease: In-Depth Review. 2022;145(1):61-78.
161. Gauvin J, Fregeau G, Elimam H, Ménard L, Huynh D, Le C, et al. A cyclic azapeptide ligand of the scavenger receptor CD36/SR-B2 reduces atherosclerotic lesion progression and enhances plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice. 2023;14.
162. Toth PP, Farnier M, Tomassini JE, Foody JM, Tereshakovec AM. Statin combination therapy and cardiovascular risk reduction. 2016;12(3):289-315.
163. Voutyritsa E, Damaskos C, Farmaki P, Kyriakos G, Diamantis E, Quiles-Sánchez LV, et al. PCSK9 Antibody-based Treatment Strategies for Patients With Statin Intolerance. *In Vivo*. 2021;35(1):61-8. Epub 2021/01/07.
164. Bujold K, Mellal K, Zoccal KF, Rhainds D, Brissette L, Febbraio M, et al. EP 80317, a CD36 selective ligand, promotes reverse cholesterol transport in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2013;229(2):408-14. Epub 2013/07/25.
165. Bujold K, Rhainds D, Jossart C, Febbraio M, Marleau S, Ong H. CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPAR γ activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages. *Cardiovasc Res*. 2009;83(3):457-64. Epub 2009/04/21.
166. Harb D, Bujold K, Febbraio M, Sirois MG, Ong H, Marleau S. The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation. *Cardiovascular Research*. 2009;83(1):42-51.
167. Triantafilou M, Gamper FGJ, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, et al. Membrane Sorting of Toll-like Receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 Heterodimers at the Cell Surface Determines Heterotypic Associations with CD36 and Intracellular Targeting*. *J Biol Chem*. 2006;281(41):31002-11.

168. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the Apolipoprotein E–Deficient Mouse. 2004;24(6):1006-14.
169. Getz GS, Reardon CA. Diet and murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(2):242-9. Epub 2005/12/24.
170. Loftus I. Dans: Fitridge R, Thompson M, rédacteurs. *Mechanisms of Vascular Disease: A Reference Book for Vascular Specialists.* Adelaide (AU): University of Adelaide Press
- © The Contributors 2011.; 2011.
171. Park YM. CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis. *Exp Mol Med.* 2014;46(6):e99. Epub 2014/06/07.
172. Kojima Y, Weissman IL, Leeper NJ. The Role of Efferocytosis in Atherosclerosis. 2017;135(5):476-89.
173. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 2010;123(Pt 24):4195-200. Epub 2010/12/03.
174. Rekhter MD. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovascular Research.* 1999;41(2):376-84.
175. Rohwedder I, Montanez E, Beckmann K, Bengtsson E, Dunér P, Nilsson J, et al. Plasma fibronectin deficiency impedes atherosclerosis progression and fibrous cap formation. *EMBO Mol Med.* 2012;4(7):564-76. Epub 2012/04/20.
176. Olejarz W, Łacheta D, Kubiak-Tomaszewska G. Matrix Metalloproteinases as Biomarkers of Atherosclerotic Plaque Instability. *Int J Mol Sci.* 2020;21(11). Epub 2020/06/04.
177. Yang Y, Friggeri A, Banerjee S, Bdeir K, Cines DB, Liu G, et al. Urokinase-type plasminogen activator inhibits efferocytosis of neutrophils. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(12):1516-23. Epub 2010/07/27.
178. Sobel BE, Taatjes DJ, Schneider DJ. Intramural Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 and Coronary Atherosclerosis. 2003;23(11):1979-89.
179. Thorp E, Vaisar T, Subramanian M, Mautner L, Blobel C, Tabas I. Shedding of the Mer tyrosine kinase receptor is mediated by ADAM17 protein through a pathway involving reactive oxygen species, protein kinase C δ , and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). *J Biol Chem.* 2011;286(38):33335-44. Epub 2011/08/11.
180. Taruc K, Yin C, Wootton DG, Heit B. Quantification of Efferocytosis by Single-cell Fluorescence Microscopy. *J Vis Exp.* 2018(138). Epub 2018/09/04.