

Université de Montréal

Application du SPR dans le criblage des ligands synthétiques du CD36 et sa
validation

par

Patrick Lambert-Lanteigne

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
en sciences pharmaceutiques
option pharmacologie

Décembre, 2011

© Patrick Lambert-Lanteigne, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Application du SPR dans le criblage des ligands synthétiques du CD36 et sa
validation**

présenté par :

Patrick Lambert-Lanteigne

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Sylvie Marleau

président-rapporteur

Huy Ong

directeur de recherche

James Féthière

codirecteur

Karen C. Waldron

membre du jury

Résumé

Le CD36 est un récepteur de type éboueur de classe B exprimé à la surface de nombreux types cellulaires dont les macrophages, les cellules endothéliales de la microvasculature et les plaquettes. Ce récepteur multiligand est impliqué dans plusieurs processus pathologiques notamment l'athérosclérose, l'angiogénèse et la malaria via la liaison spécifique de ligands comme les lipoprotéines oxydées de basse densité, la thrombospondine-1 et la protéine PfEMP-1, respectivement.

Les peptides de la relâche de l'hormone de croissance (GHRP) ont été identifiés comme les premiers ligands synthétiques du CD36. Afin de développer de nouveaux ligands synthétiques du CD36, l'établissement d'une méthode de criblage est essentiel pour découvrir des composés avec une liaison de haute affinité pour ce récepteur. Pour y parvenir, nous avons surexprimé le domaine extracellulaire du CD36 humain dans les cellules d'insectes Sf9. La protéine soluble purifiée par chromatographie d'affinité fut immobilisée à la surface d'une plaque de résonance de plasmons de surface (SPR) pour les études de liaison. La méthodologie développée a permis de caractériser les ligands du CD36 en déterminant leurs constantes de dissociation (K_D), et d'établir une relation structure-activité des ligands de la famille des azapeptides, des composés dérivés du GHRP-6. Afin de valider la méthode par spectroscopie SPR, une corrélation a été établie entre les valeurs de K_D obtenues en SPR et les valeurs d' CI_{50} de courbes d'inhibition de la phosphorylation des MAP kinases JNK1/2 induite par un phospholipide oxydé, le POVPC, en présence de concentrations croissantes de ligands du CD36 dans les macrophages RAW 264.7.

Mots clés : azapeptide, CD36, GHRP, peptide de la relâche de l'hormone de croissance, résonance des plasmons de surface, SPR

Abstract

CD36 is a class B scavenger receptor expressed at the cell surface of macrophages, endothelial cells and platelets, among others. This multiligand receptor is implicated in various diseases such as atherosclerosis, angiogenesis and malaria through the specific binding of ligands, such as oxidized low-density lipoproteins, thrombospondin-1 and the PfEMP-1 protein, respectively.

Growth hormone-releasing peptides (GHRP) were identified as the first CD36 synthetic ligands. In order to identify new CD36 synthetic ligands, the development of a high-throughput method is essential to unveil compounds of high binding affinity. We have expressed a recombinant CD36 ectodomain protein in Sf9 insect cells. The soluble and affinity purified protein was immobilized on a surface plasmon resonance (SPR) sensor for binding studies. Synthetic ligands were analyzed by SPR spectroscopy for determination of their respective dissociation constant (K_D). A structure-activity relationship of CD36 ligands was established. To validate the SPR binding signal, a good correlation was observed between K_D and the IC_{50} values obtained from the inhibition curves of the MAPK kinase JNK1/2 phosphorylation induced by an oxidized phospholipid, the POVPC, in the presence of increasing concentrations of CD36 ligands in RAW 264.7 macrophage cells.

Keywords : azapeptide, CD36, GHRP, growth hormone-releasing peptides, SPR spectroscopy, surface plasmon resonance

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des abréviations	x
Dédicace	xiv
Remerciements	xv
1. Revue de littérature	1
1.1 Introduction	2
1.2 Historique de la découverte du CD36	2
1.3 Les récepteurs de type éboueur	3
1.4 Les propriétés moléculaires du récepteur CD36	5
1.4.1 Caractérisation du gène du CD36	5
1.4.2 L'homologie entre les espèces	6
1.4.3 La topologie du CD36	6
1.4.4 La conformation globale du CD36	8
1.5 La distribution tissulaire du récepteur CD36	9
1.6 Les sites de liaison des ligands du CD36	10
1.7 La signalisation médiée par le récepteur éboueur CD36	11
1.8 Les fonctions physiologiques du CD36	16
1.8.1 L'implication du CD36 dans le métabolisme	16
1.8.2 L'implication du CD36 dans la progression de l'athérosclérose	16
1.8.3 Le rôle du CD36 dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge	17
1.8.4 Le rôle du CD36 dans la malaria	18
1.8.5 L'implication du CD36 dans le développement du diabète de type 2	19
1.9 Les méthodes de caractérisation des ligands du CD36	19
1.10 La résonance des plasmons de surface	20
2. Hypothèse de travail et objectifs	23
3. Précisions sur les méthodologies expérimentales	26

3.1 Caractérisation des ligands du CD36 par spectroscopie SPR	27
3.2 Essai cellulaire de l'inhibition de la phosphorylation induite de JNK	28
4. Manuscrit	30
Abstract	33
Introduction	34
Materials and methods	35
<i>Cell culture</i>	35
<i>Construction of the recombinant baculovirus</i>	36
<i>Expression of hCD36ED</i>	37
<i>Purification of hCD36ED</i>	37
<i>Glycosylation state of the recombinant hCD36</i>	38
<i>Western blot analysis</i>	38
<i>Circular dichroism measurements of hCD36ED</i>	38
<i>Screening ligands by SPR spectroscopy</i>	39
<i>JNK assay</i>	39
Results	40
<i>Expression and purification of hCD36ED in High Five insect cells</i>	40
<i>Screening synthetic ligands of CD36 by SPR spectroscopy</i>	42
<i>JNK assay and correlation with SPR spectroscopy data</i>	44
Discussion	47
Acknowledgements	50
References	51
5. Discussion	56
6. Perspectives	64
7. Références	66
8. Annexes	xvi
Annexe 1	xvii
Annexe 2	xviii
Annexe 3	xix
Annexe 4	xx
Annexe 5	xxi

9. Curriculum vitae

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Récepteurs de type éboueur.....	4
Tableau 1.2 : Structure du gène du CD36	5
Tableau 1.3 : Pourcentage d'homologie entre les espèces de la séquence primaire du CD36	6
Tableau 1.4 : Distribution tissulaire du CD36.....	10
Tableau 1.5 : Sites de liaison des ligands du CD36	11
Tableau 4.1 : Dissociation constant (K_D) values of selected azapeptide derivatives screened by SPR spectroscopy.	44

Liste des figures

Figure 1.1 : Topologie schématisée du récepteur CD36.....	8
Figure 1.2 : Signalisation du CD36 dans les macrophages	14
Figure 1.3 : Signalisation du CD36 dans les autres types cellulaires.....	15
Figure 1.4 : Exemple d'un azapeptide.....	20
Figure 1.5 : Résonance des plasmons de surface	21
Figure 3.1 : Représentation schématique de l'immobilisation du hCD36ED à la surface SPR	28
Figure 4.1 : Purification of hCD36ED affinity chromatography	41
Figure 4.2 : hCD36ED is glycosylated in High Five cells	42
Figure 4.3 : CD analysis of hCD36ED.....	42
Figure 4.4 : Inhibition curves of POVPC-induced phosphorylation of JNK1/2 in RAW 264.7 macrophage cells by azapeptide derivatives.....	46
Figure 4.5 : Correlation between the K_D values determined with the SPR spectroscopy method and the IC_{50} values obtained with the JNK assay.....	46
Figure 8.1 : Expression de His3C+hCD36ED dans les bactéries BL21	xvii
Figure 8.2 : Expression de MBP+hCD36ED dans les bactéries BL21	xviii
Figure 8.3 : Expression de TrxA + hCD36ED et DsbA + hCD36ED dans les bactéries BL21	xix
Figure 8.4 : Spécificité du signal de liaison des ligands du CD36.....	xx
Figure 8.5 : Courbe dose-réponse de l'augmentation de la phosphorylation induite de JNK avec le CP-AzaGly-Pro.....	xxi

Liste des abréviations

9-HODE : acide 9-hydroxy-10,12-octadécadiénoïque

13-HODE : acide 13-hydroxy-9,11-octadécadiénoïque

15d-PGJ2 : 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J2

ABCA1 : *ATP-binding cassette A1*

Ala : alanine

AMD : dégénérescence maculaire liée à l'âge (*age-related macular degeneration*)

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ApoE : apolipoprotéine E

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BCA : acide bicinchonique (*bicinchoninic acid*)

BSA : albumine sérique bovine (*bovine serum albumin*)

Ca²⁺ : calcium

CCL2 : *chemokine C-C motif ligand 2*

CD : dichroïsme circulaire (*circular dichroism*)

CD36 : *cluster of differentiation 36*

CD68 : *cluster of differentiation 68*

CI50 : concentration inhibitrice à 50%

CLA-1 : *CD36 and LIMP II analogous-1*

COX-2 : cyclooxygénase-2

DC-Lamp : *dendritic cell-lysosomal membrane glycoprotein*

DHFR : dihydrofolate réductase

DMEM : *Dulbecco's modified eagle medium*

DsbA : DsbA oxydoréductase

dSR-CI : *drosophila macrophage scavenger receptor class C type I*

DTT : dithiothréitol

E. coli : *Escherichia coli*

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

ERK1/2 : *extracellular signal-regulated kinase 1 and 2*

FABP : *fatty acid-binding receptor*
FAT : *fatty acid translocase*
FBS : sérum de veau fœtal (*fetal bovine serum*)
FEEL-1 : *fasciclin, EGF-like, lamin type EGF-like and link domain-containing scavenger receptor-1*
GHRP : peptide de la relâche de l'hormone de croissance (*growth hormone releasing peptide*)
Gly : glycine
GP IIIb : glycoprotéine IIIb
GP IV : glycoprotéine IV
hCD36ED : domaine extracellulaire du CD36 humain (*human CD36 ectodomain*)
HDL : lipoprotéine de haute densité (*high density lipoprotein*)
HEK : cellules embryonnaires humaines de rein (*human embryonic kidney*)
His : histidine
HRP : *horseradish peroxidase*
I κ B : *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor*
IC₅₀ : concentration inhibitrice à 50% (*inhibitory concentration at 50%*)
IgG : immunoglobuline de type G
IKK : *I κ B kinase*
iNOS : oxyde nitrique synthétase inductible (*inducible NO synthase*)
IRAK : *interleukin-1 receptor-associated kinase*
IRBC : érythrocytes infectés (*infected red blood cell*)
JNK1/2 : *c-Jun N-terminal kinase 1 and 2*
K_D : constante de dissociation
kDa : kiloDalton
Lamp-1 : *lysosomal membrane glycoprotein-1*
LDL : lipoprotéine de basse densité (*low-density lipoprotein*)
LDLox : lipoprotéine oxydée de basse densité (*oxidized low-density lipoprotein*)
LIMP II : *lysosomal integral membrane protein II*
LOX-1 : *lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1*
LTA : acide lipotéichoïque (*lipoteichoic acid*)

LXR α : *liver X receptor α*
Lys : lysine
MAP : *mitogen-activated protein*
MARCO : *macrophage receptor with collagenous structure*
MBP : *maltose-binding protein*
mCD36ED : *domaine extracellulaire du CD36 murin (murine CD36 ectodomain)*
Me : méthyle
MKK2 : *MAP kinase kinase 2*
MOI : *multiplicité d'infection (multiplicity of infection)*
Myd88 : *myeloid differentiation primary response gene 88*
NADPH oxidase : *nicotinamide adenine dinucléotide phosphate oxidase*
NaF : fluorure de sodium
NF- κ B : *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
Ni²⁺ : nickel
p130Cas : *p130 crk associated substrate*
PAS IV : *periodic acid/Schiff-positive band IV*
PDE3A : phosphodiesterase 3A
PEDF : *pigment endothelium-derived factor*
PfEMP-1 : *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1*
PGE1 : prostaglandine E1
Phe : phénylalanine
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PLC γ 1 : phospholipase C γ 1
PMSF : *phenylmethylsulfonyl fluoride*
PNGase : N-Glycosidase F
POVPC : 1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine
PPAR γ : *peroxisome proliferator-activated receptor- γ*
Pro : proline
Pyk2 : *protein tyrosine kinase 2*
RIPA : *radioimmunoprecipitation assay*

RPE : épithélium pigmentaire rétinien (*retinal pigment epithelium*)
RXR α : *retinoid X receptor α*
SCARA-5 : *scavenger receptor class A member-5*
SDS : dodécylsulfate de sodium (*sodium dodecyl sulfate*)
SDS-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante
(*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
Sp-1 : *specificity protein-1*
SPR : résonance des plasmons de surface (*surface plasmon resonance*)
SR-AI/II : *scavenger receptor class A I et II*
SR-BI : *scavenger receptor class B type I*
SRCL : *scavenger receptor with C-type lectin*
SREC : *scavenger receptors expressed by endothelial cell*
SR-PSOX : *scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein*
TBS-T : *tris buffer saline-tween 20*
TLR2/6 : *toll-like receptor 2 and 6*
TrX : thiorédoxine
TSP-1 : thrombospondine 1
TRAF6 : *TNF receptor associated factors 6*
Trp : tryptophane
VCAM-1 : *vascular cell adhesion protein-1*
VEGF : *vascular endothelium growth factor*
VEGFR2 : *vascular endothelium growth factor receptor 2*

Dédicace

« *Corpora non agunt nisi fixata* »

Les substances n'agissent pas si elles ne sont pas fixées

Paul Ehrlich

À tous ceux qui m'ont appuyé...

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Huy Ong, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche en tant qu'étudiant à la maîtrise et pour sa grande expertise dans le domaine de la recherche. Merci également à mon co-directeur, le Dr James Féthière, pour sa disponibilité et ses nombreux conseils.

Merci également aux membres du laboratoire : Christian, Petra, Kim et Annie pour vos conseils et les nombreuses discussions que nous avons eues.

Je voudrais remercier mes parents, Sylvie et Réjean, et mon frère, Dave, pour leur support et leurs encouragements. Finalement, un merci spécial est dédié à ma copine, Julie, pour son support, sa compréhension et ses conseils.

1. Revue de littérature

1.1 Introduction

Depuis sa découverte, le CD36 (cluster of differentiation 36) a suscité beaucoup d'intérêt notamment à cause de son caractère multiligand. Cette caractéristique est importante pour que le récepteur produise ses nombreux effets qui sont différents dépendamment du type cellulaire. Par exemple, l'un de ses ligands endogènes, la thrombospondine I (TSP-1), n'aura pas nécessairement le même effet s'il se lie au CD36 à la surface des plaquettes (1) comparativement à sa liaison à la surface des cellules endothéliales (2). Les travaux de *Barnwell et al.* ont permis d'identifier le CD36 comme un récepteur impliqué dans la séquestration des globules rouges infectés par le parasite de la malaria (3) et de mettre en évidence pour la première fois l'implication de ce récepteur dans les processus. Le rôle du CD36 dans la pathogénèse de nombreuses maladies a été démontré dont la progression de l'athérosclérose (4) ainsi que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (AMD, *age-related macular degeneration*) (5).

1.2 Historique de la découverte du CD36

Le récepteur CD36 fut initialement identifié à partir de membranes de plaquettes sanguines à la fin des années 1970. Un premier groupe décrivit le CD36, alors nommé glycoprotéine IV (GPIV), comme une protéine de 87 kDa résistante à la protéolyse lorsque des plaquettes humaines étaient digérées par la trypsine et la chymotrypsine (6). Le récepteur CD36 a par la suite été identifié par un autre groupe comme étant l'antigène réagissant avec l'anticorps OKM5 et fut alors nommé antigène OKM5 (7). L'immunoprécipitation de l'antigène OKM5 des monocytes a mené à la caractérisation d'une protéine d'environ 88 kDa (8), soit un poids moléculaire similaire à la GPIV (6). Les termes GPIV et antigène OKM5 furent remplacés par CD36. Cependant le récepteur porta d'autres noms, notamment FAT (fatty acid translocase) (9), GPIIb (glycoprotéine IIb) (10) et PAS IV (periodic acid/Schiff-positive band IV) (11).

1.3 Les récepteurs de type éboueur

Les récepteurs éboueurs sont une famille de protéines qui ont peu ou pas de similarité de séquence et de structure mais qui ont tous la capacité de lier les lipoprotéines modifiées par oxydation ou par acétylation et d'induire la transcription de leur propre gène (12). Cette famille de récepteurs, qui reconnaît aussi d'autres ligands polyanioniques (13), comprend au total 8 classes distinctes et plus de 15 protéines différentes (tableau 1.1).

Le CD36 fait partie de la classe B des récepteurs de type éboueur (14, 15). La classe B comprend également les récepteurs SR-BI (16) (un analogue du récepteur CLA-1 (17)) et LIMP II (18) (tableau 1.1). Le SR-BI est une protéine de 552 acides aminés et a une structure similaire au CD36 (19). Le pourcentage d'homologie chez l'humain entre le SR-BI et le CD36 est de seulement 33%. Le SR-BI est exprimé par les hépatocytes où il est responsable de la capture du cholestérol des HDLs (lipoprotéines de haute densité) (20). Il est exprimé à la surface des macrophages (21) et lie également les LDLs (lipoprotéines de basse densité) modifiées par oxydation ou par acétylation (14). Le SR-BI joue un rôle athéroprotecteur puisque l'apparition de plaques athérosclérotiques a été remarquée chez les souris transgéniques n'ayant plus le gène du SR-BI (22) alors que la surexpression du récepteur dans les hépatocytes en diminue la progression (23).

LIMP II est une protéine hautement glycosylée dont la séquence primaire de la protéine prédit une topologie ditopique due à deux segments d'acides aminés hydrophobes aux extrémités de la protéine (18). Chez l'humain, LIMP II possède 34% d'homologie avec le CD36 et 35% avec le SR-BI. Malgré que peu d'études aient été effectuées pour caractériser ce récepteur, il a été déterminé que LIMP II est localisé principalement dans les lysosomes (24). De plus, la déficience de LIMP II est associée à une défaillance rénale (25) alors qu'une mutation non-sens menant à une protéine tronquée est associée à l'épilepsie myoclonique (25).

Tableau 1.1 : Récepteurs de type éboueur (tiré de Plüddemann *et al.*(12))

Classes	Récepteurs	Espèces	Références
A	SR-AI	Humain	(26)
		Bovin	(27)
		Souris	(28)
	MARCO	Souris	(29)
		Humain	(30)
	SCARA-5	Souris	(31)
	SRCL	Souris	(32)
B	CD36	Humain	(6)
		Souris	(33)
		Rat	(34)
		Bovin	(35)
		Humain	(17)
	SR-BI/CLA-I	Souris	(14)
		Hamster	(14)
		Rat	(16)
		Bovin	(36)
		Humain	(37)
LIMP-II	Rat	(18)	
C	dSR-CI	<i>D. melanogaster</i>	(38)
D	CD68	Humain	(39)
	Macrosialin	Souris	(39)
	Lamp-1	Humain	(40)
	DC-Lamp	Humain	(41)
E	LOX-1	Humain	(42)
		Souris	(43)
		Porc	(44)
F	SREC	Souris	(45)
		Humain	(46)
G	SR-PSOX	Humain	(47)
H	FEEL	Humain	(48)

1.4 Les propriétés moléculaires du récepteur CD36

1.4.1 Caractérisation du gène du CD36

Le gène codant pour le récepteur CD36 est situé sur le chromosome 7 et positionné sur le locus 7q11.2 (49). Sa séquence fait plus de 77000 bases nucléotidiques (numéro d'accession : NT_007933) et est composée de 15 exons (50). La séquence codante débute entre les nucléotides 90-92 du troisième exon et se termine entre les nucléotides 160-162 du quatorzième exon où se trouve le codon arrêt. La séquence non-traduite de l'ARNm est donc constituée en 5' des exons 1, 2 et des 89 premiers nucléotides du troisième exon alors qu'en 3', il s'agit des nucléotides après le 163^e du quatorzième exon et l'exon 15 (50) (tableau 1.2).

Tableau 1.2 : Structure du gène du CD36 (tiré de Armesilla *et al.* (50))

Exons	Nucléotides correspondants sur l'ARNm	Acides aminés correspondants
1	1-106	
2	107-200	
3	201-409	1-40
4	410-470	41-94
5	471-718	95-143
6	719-898	144-203
7	899-990	204-234
8	991-1037	235-249
9	1038-1107	250-273
10	1108-1295	274-335
11	1296-1414	336-375
12	1415-1488	376-400
13	1489-1543	401-418
14	1544-1977	419-472
15	1978-2333	

1.4.2 L'homologie entre les espèces

Les études moléculaires ont mis en évidence la conservation de la séquence du récepteur CD36 à travers les espèces. La structure primaire du CD36 humain possède 84%, 87% et 83% d'homologie avec ses homologues chez la souris, le rat et le bovin, respectivement (tableau 1.3). Ces pourcentages grimpent à 94% chez les trois espèces lorsque les acides aminés similaires sont pris en considération. De plus, les cystéines dans les segments intracellulaires ainsi que dans le domaine extracellulaire sont toutes conservées chez les quatre espèces.

Tableau 1.3 : Pourcentage d'homologie entre les espèces de la séquence primaire du CD36

Espèces	% d'homologie
Humain vs bovin	83
Humain vs rat	87
Humain vs souris	84
Humain vs hamster	86
Bovin vs rat	86
Bovin vs souris	85
Bovin vs hamster	87
Rat vs souris	95
Rat vs hamster	92
Souris vs hamster	92

1.4.3 La topologie du CD36

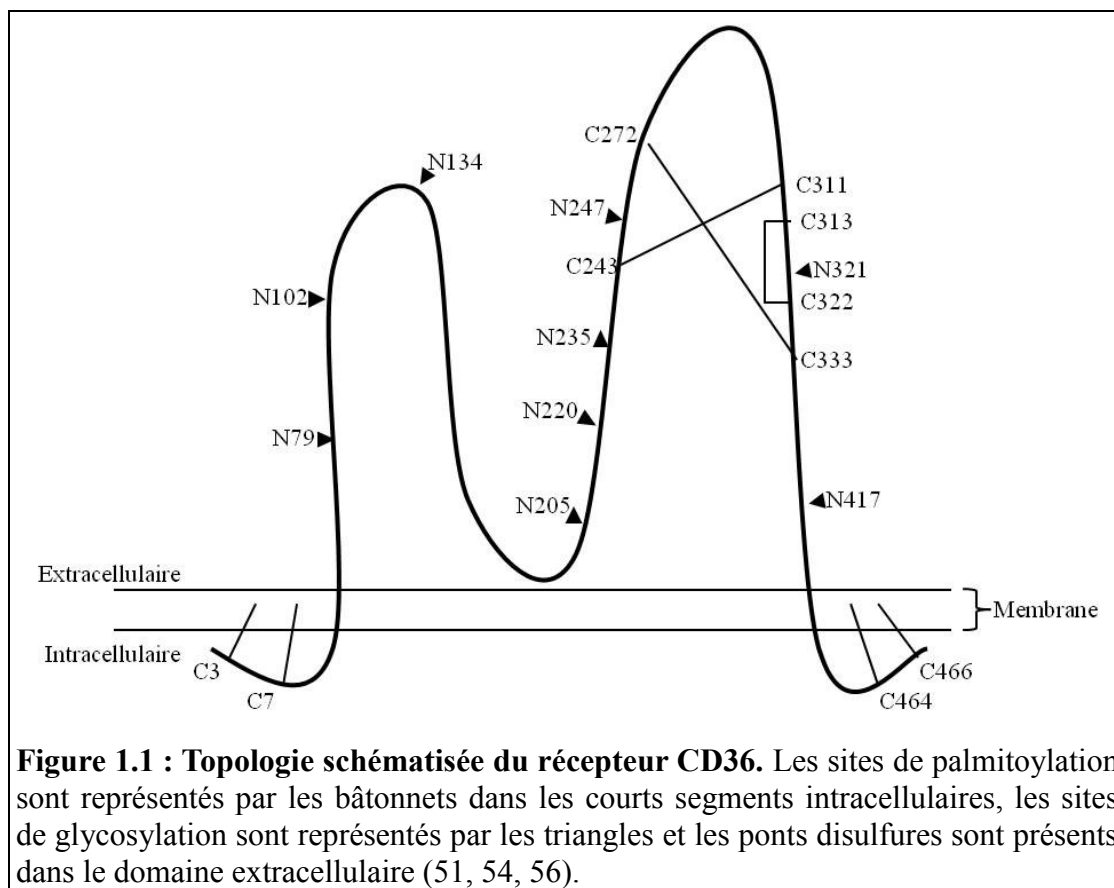
Suite à la publication de la séquence du gène humain du CD36 (50), la structure primaire complète du récepteur fut décrite. Ainsi, la topologie du récepteur a été prédite et deux segments d'acides aminés hydrophobes ont été identifiés en N- et C-terminal de la protéine. La topologie complète du récepteur a été confirmée par deux groupes différents (51, 52) et est constituée de deux courts segments intracellulaires en N- et C-terminal, de deux domaines transmembranaires ainsi

qu'une large boucle extracellulaire (figure 1.1).

Dès sa découverte, le CD36 était reconnu comme une protéine fortement modifiée de façon post-traductionnelle (6). Basé sur la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr (où X représente tout acide aminé sauf une proline (53)), dix sites potentiels de glycosylation ont été prédits. De ce nombre, 9 sites ont été confirmés pour être modifiés par glycosylation dans les cellules de mammifères (54) (figure 1.1) et seulement le site de l'asparagine 163 n'est pas glycosylé (54). Il a aussi été démontré que la glycosylation est importante pour la maturation ainsi que pour le trafic à la membrane du récepteur, sans affecter la liaison de ses ligands naturels (54).

On retrouve deux cystéines à chacun des courts segments intracellulaires en N- et C-terminal du CD36 (50). Ces quatre cystéines sont palmitoylées et l'ajout d'un acide gras de 16 carbones permet l'ancrage du récepteur à la membrane (figure 1.1) (51). Contrairement à la glycosylation (54), la palmitoylation n'est pas importante pour le trafic à la membrane ni pour la maturation de la protéine, mais joue un rôle dans la stabilité du récepteur ainsi que dans son incorporation dans les radeaux lipidiques (55).

Six autres cystéines se trouvent dans le domaine extracellulaire du récepteur. Ces cystéines forment un patron de trois ponts disulfures chez le bovin entre les résidus 242-310, 271-332 et 312-321 (35). La grande homologie entre les séquences primaires du bovin et de l'humain (tableau 1.3) permet de considérer un patron de ponts disulfures similaires pour le CD36 humain, entre les cystéines 243-311, 272-333 et 313-322 (figure 1.1) (8).



L'une des premières modifications post-traductionnelles est le clivage de la méthionine en position 1 lors de la maturation du récepteur (57). Finalement, le CD36 peut également être phosphorylé sur son domaine extracellulaire (58). En effet, il y a présence d'une séquence consensus de phosphorylation par la PKC (sérine/thréonine-X-lysine/arginine, où X représente un acide aminé non-chargé (59)) à l'endroit où se situe la thréonine 92 (58).

1.4.4 La conformation globale du CD36

La structure tridimensionnelle du domaine extracellulaire du CD36 n'est pas officiellement connue puisqu'aucune étude cristallographique n'a été publiée. Certains auteurs proposent que le segment compris entre les acides aminés 184 et 204 soit associé à la membrane plasmique (60, 61) en se basant sur le caractère fortement hydrophobe des résidus compris dans ce segment. De plus, il a été proposé que le

domaine extracellulaire du CD36 soit composé d'hélices alpha et de feuillets bêta (62). Pour appuyer la présence de structures secondaires, les acides aminés 139-154 du CD36 sont similaires à une séquence de la FABP (fatty acid-binding protein) qui correspond à la présence d'une hélice alpha dans sa conformation (63). Le caractère hydrophobe du segment 139-154 ainsi que la présence possible d'une hélice alpha appuie une association à la membrane afin d'accomplir sa fonction de translocase d'acides gras (voir section 1.8.1). D'autres indices laissent supposer un repliement complexe du CD36 tels que la présence d'une région riche en résidus proline (entre les acides aminés 242 et 333); ceci propose l'existence de coude bêta puisque la proline est souvent impliquée dans ce type de structure non-répétitive (64).

1.5 La distribution tissulaire du récepteur CD36

Le CD36 est exprimé dans un large éventail de types cellulaires différents (tableau 1.4). Il a tout d'abord été identifié à la surface des plaquettes humaines (6) puis des monocytes/macrophages (7). Le CD36 est exprimé à la surface de cellules qui nécessitent la translocation d'acides gras libres tels que les adipocytes (65), les cardiomyocytes (66), les pneumocytes (67) et les hépatocytes (68). Le récepteur est également exprimé à la surface d'autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales de la microvasculature (68), les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (70) et les cellules gustatives de la langue (71) où il exerce des fonctions variées.

Tableau 1.4 : Distribution tissulaire du CD36

Tissus	Fonctions	Références
Adipocytes	Translocation d'acides gras	(65)
Cardiomyocytes	Translocation d'acides gras	(66)
Cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien	Clairance des segments externes des photorécepteurs	(70, 72)
Cellules endothéliales de la microvasculature	Effet anti-angiogénique	(2, 60, 69, 73)
Cellules gustatives de la langue	Détection des acides gras alimentaires	(71)
Cellules sécrétrices épithéliales mammaires	Translocation d'acides gras	(74)
Entérocytes du petit intestin	Absorption des lipides alimentaires	(75, 76)
Fibroblastes	Translocation d'acides gras	(77)
Hépatocytes	Translocation d'acides gras	(68, 78)
Macrophages	Formation des cellules spumeuses	(7, 79)
Plaquettes	Agrégation plaquettaire	(1, 6, 80)
Pneumocytes	Translocation d'acides gras	(67)

1.6 Les sites de liaison des ligands du CD36

Le CD36 est un récepteur multiligand qui possède des sites de liaison distincts pour certains de ses ligands endogènes et exogènes (tableau 1.5). Le domaine de liaison le plus utilisé se situe entre les acides aminés 155-183. Il est responsable de la liaison des lipoprotéines oxydées de basse densité (LDLox) (81), des produits de glycation avancée (82), des cellules apoptotiques (61) et des ligands synthétiques tels que les GHRPs (83) et les azapeptides (84). La liaison de haute affinité des LDLox s'effectue par l'intermédiaire de la portion lipidique de la lipoprotéine (85, 86). Un site plus restreint a été défini pour les acides gras oxydés (87). Certains ligands

endogènes ont plus d'un site de liaison sur le CD36 comme les LDLox (81, 88) ou la TSP-1 (89) qui nécessite un changement dans sa conformation afin d'exposer le second site pour le CD36 (89).

Tableau 1.5 : Sites de liaison des ligands du CD36

Ligands	Résidus	Références
TSP-1	93-110	(89)
	139-155	(89)
LDLox	28-93	(88)
	120-155	(88)
	155-183	(81)
Acides gras oxydés	160-168	(87)
Produits de glycation avancée	155-183	(82)
GHRP	155-183	(83)
PfEMP-1	139-184	(90)
	145-171 ou 146-164	(90)
Cellules apoptotiques	155-183	(61)

1.7 La signalisation médiée par le récepteur éboueur CD36

Un des mécanismes général de la signalisation suivant la liaison du CD36 avec ses ligands est l'association aux protéines kinases de la famille des Src (91) à l'extrémité C-terminal du récepteur (79, 92). Le CD36 s'associe à différentes Src dépendamment du type cellulaire. Dans les macrophages, la protéine kinase lyn interagit avec l'extrémité C-terminal du CD36 dans la transduction du signal menant au développement des cellules spumeuses (79) (figure 1.2). La première étape consiste en la liaison des LDLox au CD36 puis de leur internalisation requérant la dynamine (93). Les LDLox internalisés libèrent dans la cellule du cholestérol ainsi que plusieurs lipides oxydés dont les 9- et 13-HODE (94), des ligands endogènes du PPAR γ (94). L'activation de PPAR γ conduisant à l'hétéromérisation avec le RXR α active la transcription du LXR α et du CD36 (95). La translocation du CD36 à la membrane crée une boucle d'activation qui accélère la progression de

l'athérosclérose (95, 96). Parallèlement, l'expression du transporteur du cholestérol ABCA1, après l'hétérodimérisation de LXR α et RXR α (97), crée un équilibre entre l'influx et l'efflux du cholestérol. L'équilibre est perturbé en faveur de l'accumulation du cholestérol et la formation de cellules spumeuses (98) notamment via la phosphorylation des MAP kinases JNK1/2 qui constitue une étape importante (79).

L'importance de la présence du CD36 à la surface des macrophages est supportée par les nombreuses fonctions du récepteur (figure 1.2). Le CD36 est également impliqué dans l'immunité puisqu'il participe à la clairance des cellules apoptotiques selon un mécanisme méconnu, mais impliquant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (99). Les bactéries *Staphylococcus aureus* sont reconnues à la surface des macrophages via l'acide lipotéichoïque (LTA), une molécule de leur paroi cellulaire, qui est reconnu par le CD36 (62, 100). Le LTA est ensuite transféré du CD36 au récepteur CD14 puis aux récepteurs toll-like (TLR) pour activer la voie de signalisation MyD88/NF- κ B menant à l'inflammation (62, 101).

Un composé dérivé des GHRPs, le EP 80317, a démontré une réduction de la progression de l'athérosclérose (102). Le EP 80317 agit notamment en diminuant la phosphorylation de la protéine Pyk2 ce qui entraîne une diminution de la migration des macrophages aux sites des plaques athéromateuses (103). Le EP 80317 agit aussi en augmentant l'expression de l'enzyme COX-2 menant à la synthèse du 15d-PGJ2 dans les macrophages (104), un ligand endogène du PPAR γ (105). Le PPAR γ active l'expression du LXR α permettant l'expression du transporteur ABCA1 et l'augmentation de l'efflux du cholestérol (104, 106). Au niveau vasculaire, le EP 80317 réduit l'expression des enzymes iNOS et NADPH oxidase ainsi que de la molécule d'adhésion VCAM-1 (vascular cell adhesion protein-1) pour diminuer le recrutement des macrophages aux sites des plaques athéromateuses (103).

La signalisation du CD36 est différente dépendamment du type cellulaire. Ainsi, la TSP-1 active une voie de signalisation dans les cellules endothéliales qui mène à l'inhibition de l'angiogénèse (2) alors que dans les plaquettes, la TSP-1 induit

l'agrégation plaquettaire (107) (figure 1.3). Les effets anti-angiogéniques de la TSP-1 s'effectuent en activant les protéines Caspase 3-like et JNK1/2 menant à l'activation du mécanisme d'apoptose de la cellule endothéliale (2) ou en inhibant la phosphorylation du récepteur du VEGF (73, 108). Dans les plaquettes, la liaison de la TSP-1 au récepteur CD36 favorise l'agrégation plaquettaire en entraînant l'activation de la phosphodiesterase 3A (PDE3A) ce qui entraîne la diminution de la concentration d'AMPc induit par l'activation de l'adénylate cyclase par la prostaglandine E1 (PGE1) (107).

La β -amyloïde lie un complexe formé par le récepteur CD36 et l'intégrine $\alpha_6\beta_1$ à la surface des microglies (109) (figure 1.3). Les effets inflammatoires de la β -amyloïde sont dûs à l'activation de p130Cas et ERK1/2 (109), alors que la migration des microglies vers les sites où se trouvent les plaques de β -amyloïde nécessite la phosphorylation de Pyk2 et la polymérisation de l'actine F (110).

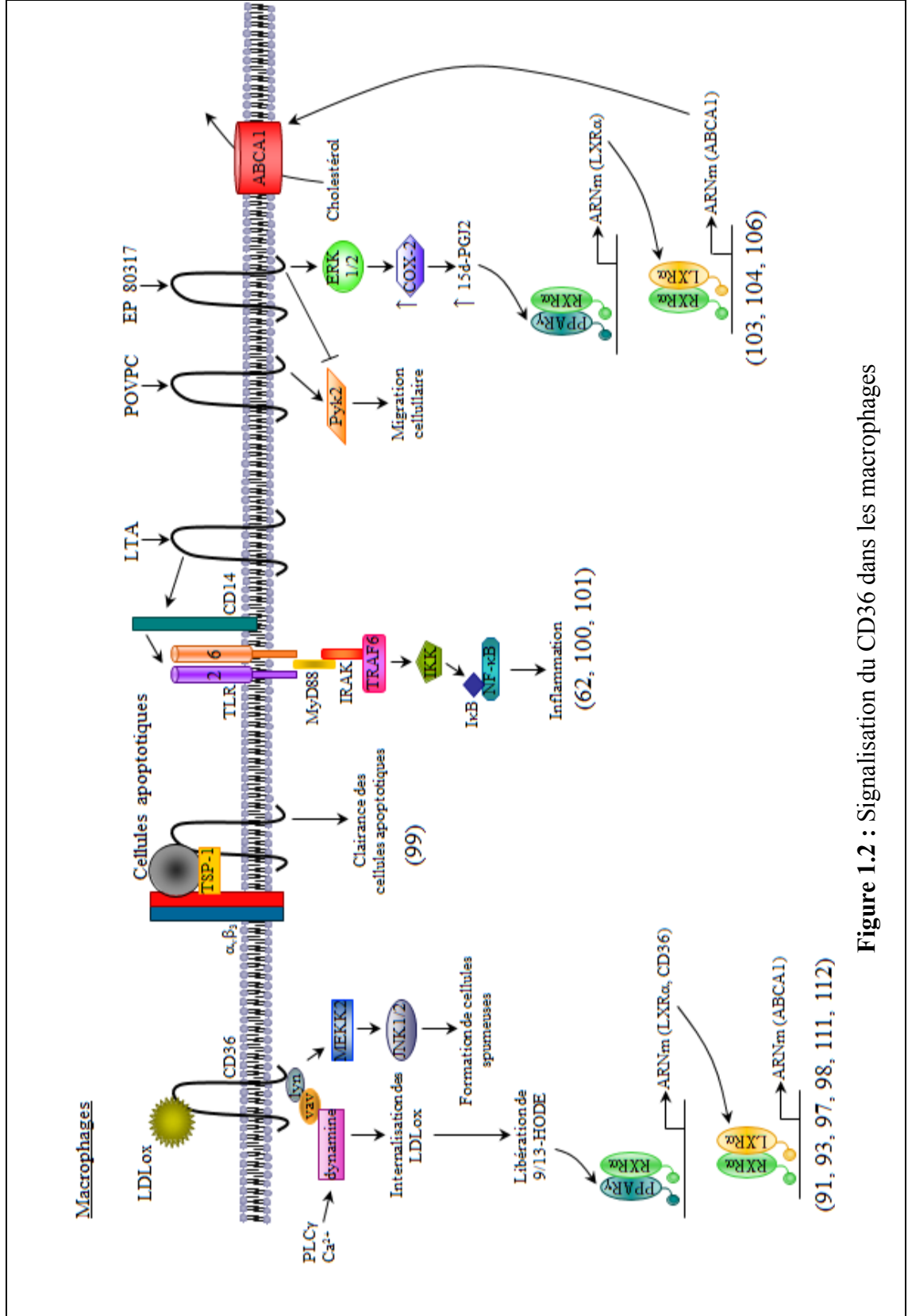


Figure 1.2 : Signalisation du CD36 dans les macrophages

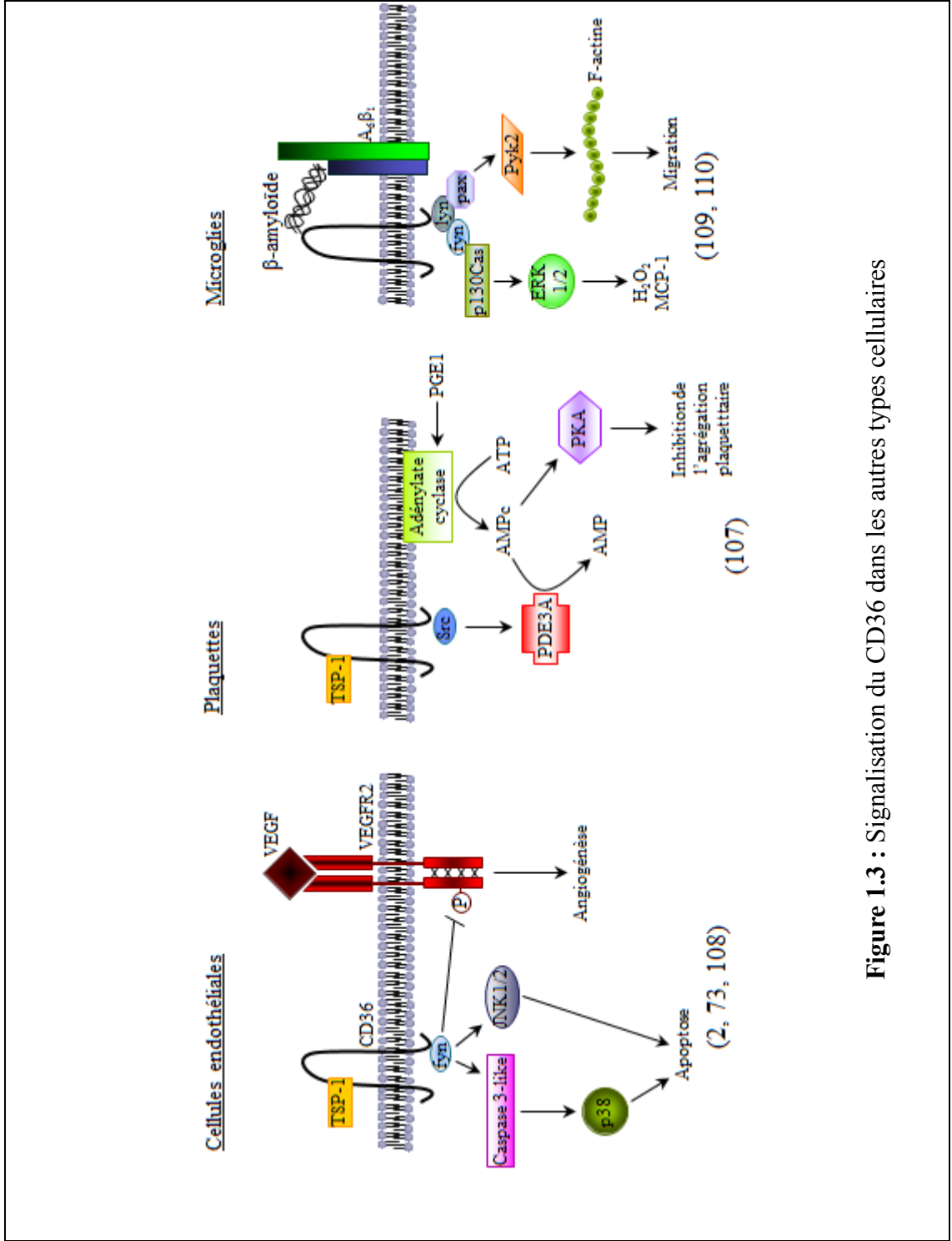


Figure 1.3 : Signalisation du CD36 dans les autres types cellulaires

1.8 Les fonctions physiologiques du CD36

1.8.1 L'implication du CD36 dans le métabolisme

Le transfert des acides gras de la circulation vers le milieu intracellulaire est un processus important pour plusieurs types cellulaires. Le CD36 fut identifié comme un transporteur d'acides gras lors d'une expérience d'inhibition de la capture des acides gras par un composé contenant un groupement sulfo-N-succinimidyl, le sulfo-N-succinimidyl oléate (113). Lors de la contraction prolongée des muscles, le transport des acides gras est augmenté, ce qui coïncide avec une augmentation de l'expression du récepteur CD36 à la membrane plasmique (9). Le récepteur est d'abord contenu dans des vésicules intracellulaires (114), puis transporté à la membrane plasmique lors de la contraction musculaire (115). Un mécanisme similaire survient lorsque les cellules musculaires sont stimulées avec l'insuline (116). Un apport élevé en glucose mène à une augmentation de la transcription du CD36 et du métabolisme oxydatif des acides gras dans les cellules endothéliales et les cardiomyocytes (117).

1.8.2 L'implication du CD36 dans la progression de l'athérosclérose

Dans la pathogenèse de l'athérosclérose, les macrophages jouent un rôle crucial dans l'accumulation du cholestérol et la formation des plaques athérosclérotiques. Le cholestérol est internalisé sous forme de LDLox via le CD36 exprimé à la surface des macrophages (98). Certaines mutations au gène du CD36 confèrent un phénotype de déficience où le récepteur n'est alors pas exprimé à la surface cellulaire (118). Les macrophages de patients qui n'expriment pas le CD36 lient jusqu'à 40% de moins les LDLox comparativement aux macrophages contrôles (119) ce qui démontre que le CD36 joue un rôle important dans la formation des cellules spumeuses. Pour les études *in vivo* de l'athérosclérose, les souris déficientes en apoE est le modèle le plus fréquemment utilisé où les souris présentent un

phénotype d'hyperlipidémie. Le groupe de Febbraio *et al.* a démontré une nette réduction de plus de 75% des plaques athérosclérotiques chez les souris CD36/apoE doubles déficientes comparées aux souris contrôles déficientes en apoE (4). Ces observations révèlent le rôle crucial que joue le récepteur CD36 dans le développement de l'athérosclérose.

1.8.3 Le rôle du CD36 dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge

L'AMD est une maladie qui affecte la vision centrale et est directement responsable de plus de 8% des cas de cécité (120). L'AMD se présente sous deux formes différentes. La première et la plus commune est la forme sèche, où il y a une dégénération de la choroïde, des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE : retinal pigment epithelium) et des photorécepteurs. La seconde forme est de type humide, où un phénomène de néovascularisation induit l'envahissement de l'espace sous rétinien par les microvaisseaux de la choroïde. Les études génétiques ont permis de déceler cinq polymorphismes d'un seul nucléotide du gène du CD36 associés au développement de l'AMD (5). Ces polymorphismes sont tous situés dans les introns, ce qui signifie qu'ils affectent plutôt le niveau d'expression du récepteur ou sa distribution tissulaire (5). Les souris transgéniques déficientes en CD36 présentent une augmentation de l'épaisseur de la membrane de Bruch qui résulte de l'accumulation des LDLox (121). L'absence du CD36 chez les jeunes souris mène également à une diminution de la vascularité de la choroïde (122). Cette manifestation s'explique par la diminution de la transcription de l'enzyme COX-2 (cyclooxygénase-2) et du facteur de croissance VEGF (vascular endothelial growth factor) qui est induite lorsque le CD36 phagocyte les segments externes des photorécepteurs (122). Ainsi, la préservation de la vascularité de la choroïde dépend du CD36.

Lors de la progression vers la forme humide de l'AMD, il se produit un déplacement de l'équilibre entre l'expression du facteur anti-angiogénique PEDF (*pigment epithelium-derived factor*) et le facteur pro-angiogénique VEGF (123). En

bloquant le site de la TSP-1 du CD36 chez les souris ayant un phénotype induit d'inflammation cornéenne, il se produit une augmentation de la transcription du VEGF et l'apparition de la néovascularisation choroïdienne (124). Le développement de la néovascularisation cornéenne est également démontré chez les souris plus âgées et déficientes en CD36 (125). Les souris déficientes en CD36 expriment moins la TSP-1 et davantage le VEGF afin de favoriser un effet pro-angiogénique (125). L'activation du CD36 par un de ses ligands, le POVPC (1-palmitoyl-2(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine), mène à la diminution de la néovascularisation (124). Ces observations démontrent bien l'effet protecteur du CD36 dans la progression de la maladie en fonction de l'âge.

1.8.4 Le rôle du CD36 dans la malaria

La malaria est causée par l'infection par un parasite de type *Plasmodium*. L'implication du CD36 dans la cytoadhérence des érythrocytes infectés (IRBC, *infected red blood cell*) par le parasite *Plasmodium falciparum* a été démontrée lors d'une expérience de compétition avec un anticorps contre une protéine de 88 kDa (3) par la suite identifiée comme étant le récepteur CD36 (126). De plus, l'inhibition de l'expression du CD36 à la surface cellulaire a pour effet de réduire l'adhérence des IRBCs aux cellules endothéliales (127) et ainsi confirmer l'implication du CD36 dans la malaria.

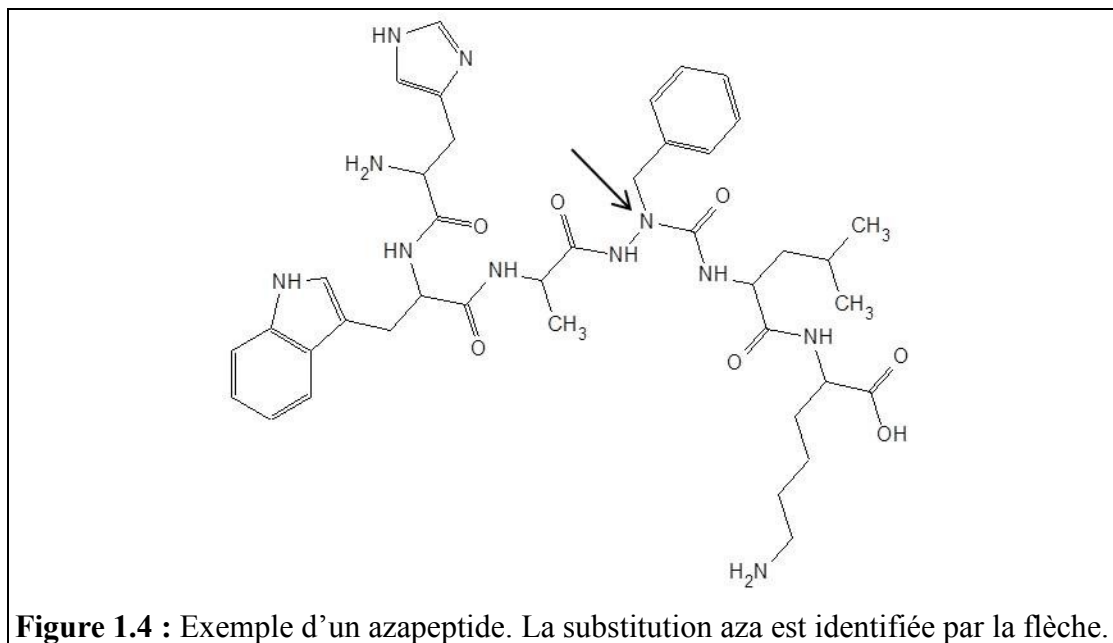
Les études génétiques ont également permis de dénoter une association entre le CD36 et la malaria. La mutation de la désoxythymidine 1264 par la désoxyguanosine (T1264G) mène à une protéine tronquée responsable de la déficience du CD36 qui confère une protection contre la malaria (128). L'expression d'une autre protéine tronquée du CD36 confère également un phénotype semblable de protection (129). Paradoxalement, d'autres polymorphismes sur la séquence codante du CD36 conduisent à une augmentation de la sévérité de la maladie (130).

1.8.5 L'implication du CD36 dans le développement du diabète de type 2

Le diabète de type 2 est provoqué notamment par la résistance à l'insuline menant à l'hyperglycémie. Lors de l'apparition de la maladie, il y a translocation permanente du récepteur CD36 à la surface du sarcolemme des muscles squelettiques provoquant une augmentation de l'influx des acides gras libres (131). De plus, la désensibilisation du récepteur de l'insuline est provoquée par la liaison des LDLox au CD36 au niveau des adipocytes et des macrophages (132). Un groupe a remarqué la présence d'un fragment soluble du CD36 dans le sérum de patients diabétiques et a proposé ce marqueur pour le diagnostic du diabète (133). Le CD36 sérique se trouve dans sa forme intégrale et est sécrété sous forme de microparticules (134).

1.9 Les méthodes de caractérisation des ligands du CD36

Le potentiel thérapeutique du CD36 a mené à l'établissement de méthodes de criblage de ses ligands. Les études de liaison par photomarquage covalent avec un radiotracteur ($[^{125}\text{I}]$ -Tyr-Bpa-Ala-Hexaréline) représentent l'un des standards pour le criblage des ligands du CD36 (135, 136). Cette technique a permis de caractériser de nouveaux ligands synthétiques du CD36 dont le EP 80317 (104), les azapeptides (84, 137) (figure 1.4) et les α - et β -amino- γ -lactames (138). L'identification de quelques antagonistes de la liaison des LDLox a été déterminée à l'aide d'un essai de type ELISA avec un fragment soluble du CD36 (139) ou à l'aide des cellules d'insectes Sf9, dérivées de *Spodoptera frugiperda*, exprimant le CD36 (140). L'utilisation de cellules transfectées avec le CD36 et de la β -amyloïde fluoromarkée a également permis d'identifier l'acide ursolique comme antagoniste de la liaison de la β -amyloïde au CD36 (141).



1.10 La résonance des plasmons de surface

La résonance des plasmons de surface (SPR) est un phénomène qui a été décrit pour la première fois en 1902 lorsqu'un patron de diffraction inhabituel a été observé lors de la réflexion d'un faisceau lumineux sur un miroir muni d'une surface métallique (142). À l'époque, plusieurs hypothèses ont été émises par différents auteurs (142, 143, 144, 145) mais ce ne fut qu'en 1968 que le phénomène fut expliqué par deux groupes indépendants (146, 147). Les premières réelles applications du SPR furent la caractérisation de surfaces métalliques (148) et la compréhension de divers phénomènes optiques (149, 150). Ce n'est qu'au milieu des années 1980 qu'une application biologique utilisant le SPR a été développée (151).

Les plasmons de surface sont toujours présents à la surface d'une mince couche d'or déposée sur le verre et résultent de l'oscillation des électrons de ce métal à l'interface or-solution (figure 1.5). La résonance des plasmons de surface repose sur un phénomène optique où, lorsqu'un faisceau lumineux entre en contact avec la surface métallique, les plasmons peuvent entrer en résonance grâce à leur interaction avec le champ électrique du faisceau. En modifiant l'angle du faisceau incident,

l'intensité du faisceau réfléchi atteint un minimum d'intensité lorsque les plasmons à la surface sont en résonance (figure 1.5). Cet angle est nommé angle de résonance où l'énergie des photons qui entrent en contact avec l'interface or-solution est transférée aux électrons libres du métal pour former une onde évanescente. L'énergie est transférée jusqu'à la surface de la fine couche métallique et permet aux plasmons de surface d'entrer en résonance. Cependant lorsqu'une masse est fixée à la surface du film d'or, les propriétés des plasmons de surface sont perturbées de même que l'indice de réfraction, ce qui affecte l'angle de réflexion sous le métal. Ainsi, une protéine immobilisée à la surface du capteur SPR fera augmenter la masse apparente et la masse sera augmentée davantage lorsque des concentrations croissantes d'un composé se lieront à la protéine d'intérêt lors d'études de liaison. De cette façon, les propriétés du faisceau réfléchi sont altérées, ce qui résulte en la variation de son intensité ou de sa longueur d'onde en fonction de la masse apparente à la surface or-solution. Les données enregistrées sont traitées pour permettre la caractérisation de l'affinité de liaison entre le récepteur immobilisé à la surface de la mince couche d'or et les ligands contenus dans la solution qui interagissent avec le récepteur.

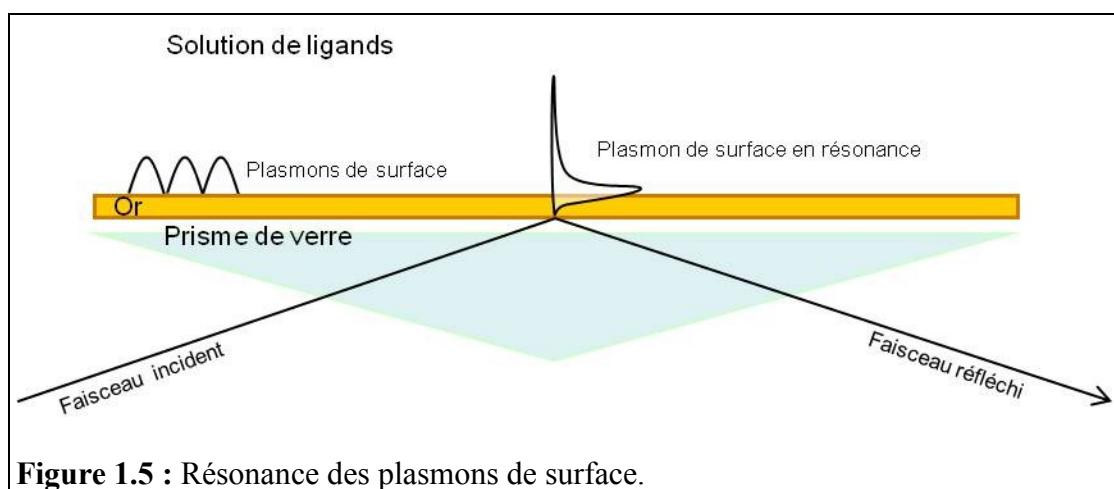


Figure 1.5 : Résonance des plasmons de surface.

La commercialisation par Biacore de systèmes utilisant le SPR (152) a permis de faciliter les études protéomiques. L'immunologie est l'un des premiers domaines biologiques qui a bénéficié du SPR où les interactions entre les anticorps et les antigènes, sans marqueur, ont été étudiées (153) pour vérifier l'état conformationnel des antigènes (154). L'utilisation d'une monocouche auto-assemblée permet la

reconnaissance moléculaire de protéine cible (155) et facilite notamment les études d'interactions protéines-protéines (156). Il est alors possible d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction en faisant passer un extrait cellulaire et en combinant la spectroscopie de masse au SPR (157). L'un des principaux avantages du SPR est la détection de molécules de faibles poids moléculaires ce qui permet son utilisation lors du criblage à haut débit de petites molécules (158) ou l'évaluation de paramètres pharmacocinétiques (159). Les applications du SPR s'étendent jusqu'à la médecine, les analyses alimentaires ou la protection environnementale (voir revue de Homola (160)).

2. Hypothèse de travail et objectifs

L'identification d'une cible thérapeutique constitue l'une des premières étapes du développement des médicaments. Une seconde étape importante est le développement d'une méthode de criblage robuste pour caractériser l'interaction des molécules avec la cible. Cette étape permet l'identification de composés dont les caractéristiques seront modifiées par chimie de synthèse afin d'améliorer, entre autres, leur affinité de liaison pour leur cible. Le criblage est donc une étape critique dans la découverte de nouvelles thérapies.

Malgré son rôle dans la transduction du signal et son implication dans de nombreuses pathologies, une thérapie qui cible spécifiquement le récepteur CD36 n'est pas encore disponible. Après la découverte des GHRP comme ligands synthétiques du CD36 (161), de nouvelles classes de composés ont été synthétisées, dont les azapeptides (84, 137). La méthode de criblage fut une méthode de photomarquage avec un traceur radioactif dans une approche de compétition du radiotracer avec les ligands à cribler (162). Brièvement, cette méthode implique l'utilisation de membranes biologiques exprimant le CD36 qui lie de façon covalente le radiotracer photoactivable en présence de concentrations croissantes de ligands à caractériser. Chaque échantillon de membranes est ensuite analysé sur gel de polyacrylamide exposé à un écran radiographique intensifiant pour pouvoir quantifier les bandes radioactives. Cette méthode de criblage est longue et fastidieuse et utilise un marqueur radioactif. De plus, cette approche de liaison covalente ne se fait pas à l'équilibre et mène à une surestimation des valeurs des CI_{50} obtenues pour chacun des ligands et par conséquent de leur affinité apparente (K_i) (84).

Afin de caractériser les composés déjà synthétisés ou le développement d'une nouvelle classe de ligands, les travaux effectués dans le cadre de cette maîtrise décrivent les étapes menant à l'élaboration et l'application d'une méthode de criblage par spectroscopie SPR en collaboration avec le groupe du Dr Jean-François Masson de l'Université de Montréal. Cette méthode permet de caractériser plusieurs composés en solution rapidement comparativement à l'approche standard lors d'étude de liaison par photomarquage covalent. Pour ce faire, il a fallu établir un système

d'expression du domaine extracellulaire du CD36 humain dans des cellules d'insectes. Sa purification à homogénéité a été effectuée par chromatographie d'affinité. La protéine purifiée, c'est-à-dire la cible, a ensuite été immobilisée sur la surface du capteur SPR afin de pouvoir cribler et caractériser, par détermination de la constante de dissociation (K_D), l'affinité des peptides synthétiques dérivés du GHRP-6. Afin de valider le signal obtenu en SPR, nous avons développé, dans les macrophages RAW 264.7, un essai kinase basé sur l'inhibition de la phosphorylation des MAP kinases JNK1/2 induite par le POVPC, un phospholipide oxydé contenu dans les LDLox, par les mêmes peptides synthétiques. Il a été établi que le POVPC active la phosphorylation de JNK, reconnue pour être importante dans le processus d'activation de la formation des cellules spumeuses (79). Nous avons montré que certains des composés criblés inhibent la phosphorylation de JNK.

3. Précisions sur les méthodologies expérimentales

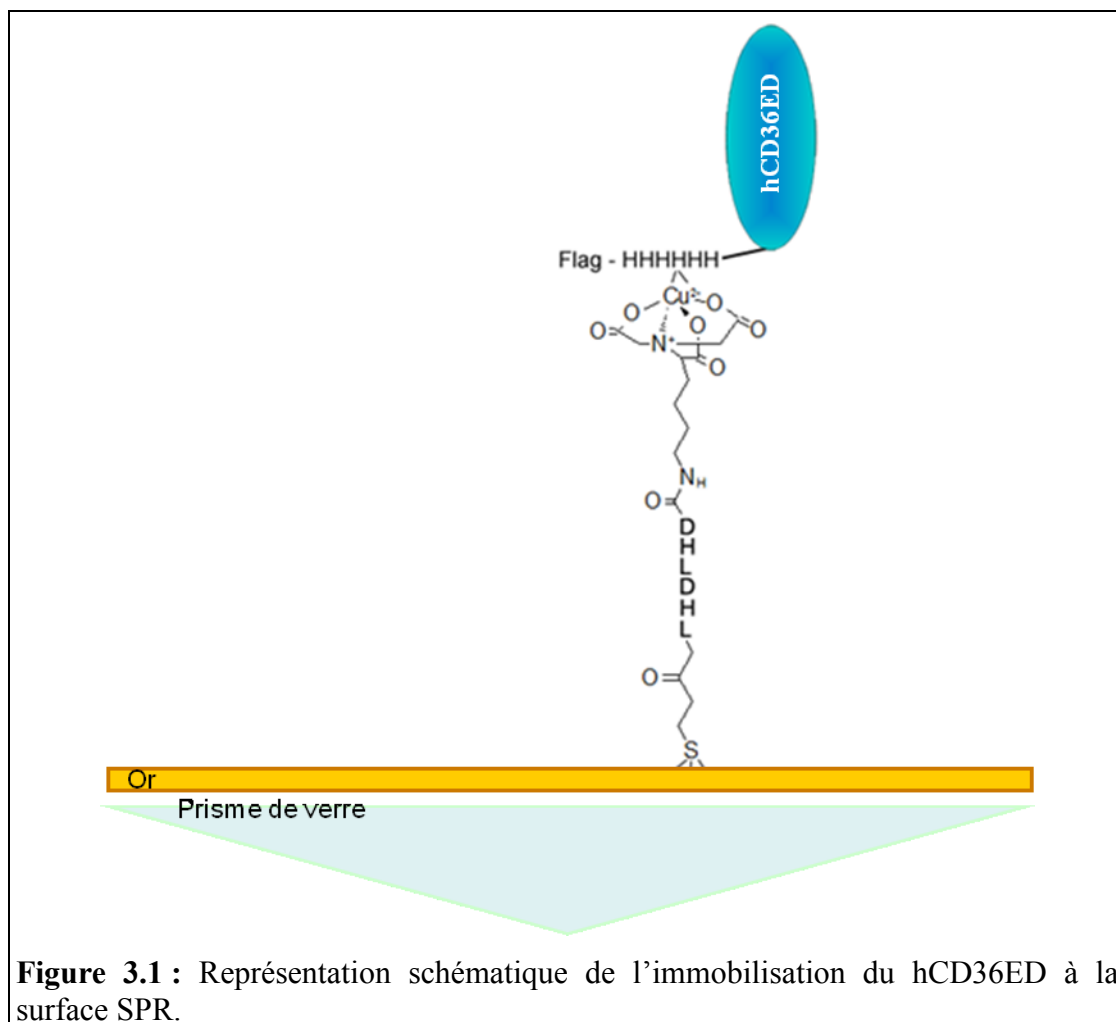
3.1 Caractérisation des ligands du CD36 par spectroscopie SPR

La caractérisation des ligands synthétiques du CD36 par spectroscopie SPR a été effectuée en collaboration avec les membres du groupe du Dr Jean-François Masson et la mise au point fut publiée dans la revue *Analyst* par Bolduc, Lambert-Lanteigne *et al.* (163). Plus spécifiquement, une plaquette SPR recouverte d'une fine couche d'or lie de façon covalente un dérivé peptidique qui contient un groupement chélateur en C-terminal (N α ,N α -bis(carboxyméthyl)-L-lysine) afin de fixer un ion de cuivre. Le hCD36ED est ensuite immobilisé via sa séquence spécifique polyhistidine à l'ion cuivre de la surface SPR (figure 3.1). Le hCD36ED est préalablement dilué à 5 $\mu\text{g/mL}$ et 25 μL est exposé à la surface SPR pendant 15 minutes. La quantité de hCD36ED immobilisé à la surface SPR est alors évaluée à 3,2 pmol. Les ligands sont dilués dans le PBS et 25 μL de chaque ligand est exposé sur la surface SPR pendant 5 minutes à des concentrations variantes entre 100 nM et 30 μM , requérant 750 pmol de ligands pour la concentration la plus élevée. La réponse SPR est obtenue en temps réel à une fréquence de 1 hertz (1 acquisition de données à chaque seconde).

Lors du traitement des données, la variation de la longueur d'onde ($\Delta\lambda_{\text{SPR}}$) est calculée pour chaque concentration injectée en soustrayant la longueur d'onde minimale (obtenu avec un blanc de PBS) de la longueur maximale obtenu pour chaque concentration. Les valeurs de variation de longueur d'onde sont entrées dans le logiciel MATLAB qui détermine les valeurs de K_D selon l'isotherme de Langmuir

$$\Delta\lambda_{\text{SPR}} = (K[\text{ligand}]) \Delta\lambda_{\text{SPRmax}} (1 + K[\text{ligand}])^{-1}$$

où $K = 1/K_D$. Les étapes expérimentales ainsi que l'étape d'analyse demande peu de temps ce qui permet de cribler et caractériser plus de 10 composés par semaine, en triplicata.



3.2 Essai cellulaire de l'inhibition de la phosphorylation induite de JNK

La caractérisation des ligands synthétiques du CD36 par étude d'inhibition de la phosphorylation des MAP kinases JNK1/2 induite par le POVPC a nouvellement été développée. Cette méthode requiert l'utilisation de la lignée de macrophages murins RAW 264.7. Les cellules sontensemencées dans des plaques de 6 puits et sevrées toute la nuit dans un milieu sans sérum. Elles sont ensuite prétraitées 2 heures, avec des concentrations variantes entre 1 nM et 1 μ M, puis stimulées 30 minutes avec une faible concentration de POVPC (10 μ g/mL) (utilisant entre 3 pmol et 3 nmol de ligand et 50 nmol de POVPC). Les cellules sont ensuite lysées sur glace puis centrifugées. Le surnageant est récolté et la concentration protéique est

déterminée afin de charger 30 µg de protéine du surnageant de chaque échantillon sur gel de polyacrylamide. Les protéines sont séparées par électrophorèse pendant environ 90 minutes à 135 volts et sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose pendant 90 minutes à 75 volts. La membrane est bloquée avec une solution de lait en poudre pendant 60 minutes puis incubée toute la nuit avec l'anticorps primaire contre JNK phosphorylé. La membrane est lavée puis incubée 60 minutes avec l'anticorps secondaire puis elle est révélée avec un substrat chimioluminescent. Après une étape de *stripping* de la membrane, où la liaison des anticorps primaires et secondaires est renversée, elle est réutilisée cette fois en incubant avec l'anticorps primaire contre JNK total. L'analyse s'effectue en quantifiant l'intensité des bandes de JNK phosphorylé et de JNK total obtenues par immunobuvardage *western*. Les valeurs de ratio JNK phosphorylé/JNK total sont entrées dans le logiciel Prism afin de déterminer les valeurs de CI₅₀. Ces étapes demandent beaucoup de temps entre chacune des manipulations. Par conséquent, cet essai cellulaire permet de caractériser que 3 composés au maximum par semaine.

4. Manuscrit

Ma contribution pour l'article "*Surface plasmon resonance (SPR) sensing for high-throughput screening of synthetic ligands of scavenger receptor CD36*" consiste en l'établissement d'un système d'expression du hCD36ED dans les cellules d'insectes, la mise au point d'une méthode de purification du hCD36ED jusqu'à homogénéité, l'analyse et l'établissement d'une relation structure-activité entre les différents composés caractérisés, l'établissement et mise au point d'un essai cellulaire de l'inhibition par les ligands synthétiques de la phosphorylation des MAP kinases JNK1/2 induite par le POVPC ainsi que l'écriture du manuscrit. La contribution d'Olivier R. Bolduc consiste en la mise au point du criblage des ligands synthétiques du CD36 alors que Caroline Proulx a synthétisé les azapeptides. Les Dr James Féthière, Dr Jean-François Masson, Dr William D. Lubell et Dr Huy Ong ont tous contribué à corriger et peaufiner le manuscrit.

Ce manuscrit sera soumis au journal *Analytical Biochemistry*.

Surface plasmon resonance (SPR) sensing for high-throughput screening of synthetic ligands of scavenger receptor CD36

Patrick Lambert-Lanteigne^a, Olivier R. Bolduc^b, Caroline Proulx^b, William D. Lubell^b, James Féthière^c, Jean-François Masson^b and Huy Ong^{a*}

^aFaculty of pharmacy, Université de Montréal, H3C 3J7, Montréal, Canada

^bDepartment of Chemistry, Université de Montréal, H3C 3J7, Montréal, Canada

^cInstitut de recherche en immunologie et oncologie (IRIC), Université de Montréal, H3C 3J7, Montréal, Canada

Short title: SPR sensing assay to screen synthetic ligands

Subject category: physical techniques

Abstract

Therapies targeting the receptor CD36 have emerged as promising avenues towards treatment of pathological conditions such as atherosclerosis and age-related macular degeneration. A screening method is reported for the characterization of CD36 ligands by surface plasmon resonance (SPR) using a recombinant soluble CD36 ectodomain, which was expressed in *Trichopulsia ni* High five insect. The purified protein was immobilized on the SPR surface and dissociation constants (K_D 's) for azapeptides, a new class of CD36 selective ligands derived from the growth hormone-releasing peptide-6, were determined as described by Bolduc *et al* [18]. Compounds with potential clinical significance were characterized by determination of their K_D 's of 0.77 and 0.72 μM for DBG178 and CP-3(IV), respectively. In order to validate this screening method, K_D 's of selected azapeptides were correlated to their IC_{50} values obtained from a POVPC-induced JNK1/2 phosphorylation assay in RAW 264.7 murine macrophage cells. Compounds exhibiting high to medium binding affinity to CD36 had IC_{50} 's in the nanomolar range in contrast to those showing low to no apparent binding affinity which were without biological activity. The reported SPR method offers interesting potential as a high-throughput screening assay for characterizing ligands of CD36.

Key words: CD36; surface plasmon resonance; SPR; EP 80317; atherosclerosis; age-related macular degeneration

Introduction

In drug discovery, binding studies are important for the identification and chemical optimization of candidate compounds. Reliable screening methods are thus required to provide high quality data for investigating binding of newly synthesized compounds. Label-free methods have emerged as inexpensive and reliable for screening because they avoid radioactive and fluorescent tags, which may be costly and lead to false-positives/negatives [1]. In particular, surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy has proven effective as a label-free biosensor for studying molecular interactions, and for providing accurate affinity and kinetic data [2].

The Cluster of Differentiation 36 receptor (CD36) belongs to the family of type B scavenger receptors and is expressed on a wide variety of cells, including endothelial cells of the microvasculature [3], platelets [4], retinal pigment epithelium [5] and, to a greater extent, macrophages [6]. The CD36 receptor protein features a large extracellular binding domain flanked by two short N- and C-intracellular tails. In addition to being involved in the internalization of oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) [7], CD36 binds a large variety of endogenous ligands [6] and has been shown to transduce signals that regulate inflammatory and apoptotic processes [8,9]. Growth hormone-releasing peptides (GHRPs) have previously been identified as the first class of small synthetic ligands that bind to the CD36 scavenger receptor [10] inducing reduction of atherosclerotic lesions in aorta [11] and diminishing Bruch's membrane thickness in the sub-retinal space [12] in a CD36-dependent manner.

Considering its promiscuity and various roles in pathological processes, the CD36 scavenger receptor is a target with significant clinical potential. A sensitive and

reproducible binding assay is thus desired for evaluating ligand affinity to this receptor. Previous screening assays such as an ELISA-like method with a recombinant soluble CD36 protein [13], the inhibition of DiI-AcLDL (acetylated low density lipoprotein labeled with 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate) uptake in *Spodoptera frugiperda* Sf9 insect cells expressing CD36 [14], or a competitive photolabeling binding assay with a photoactivable [¹²⁵I]-hexarelin radioligand [15] have been reported. None of these methods have proven effective for high-throughput evaluation of CD36 ligands. A SPR binding assay is here reported featuring the soluble recombinant binding domain of the human CD36 receptor. Moreover, the SPR binding data have been correlated with a cellular response of the tested ligands in a RAW 264.7 murine macrophage cell model featuring the inhibition of MAP kinase JNK1/2 phosphorylation induced by POVPC (1-palmitoyl-2(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine), a mildly oxLDL-derived phospholipid [16]. The correlation between binding affinity and kinase inhibition validate the SPR spectroscopy screening method. The sensitivity and efficacy of the SPR spectroscopy method demonstrate potential for high-throughput screening of CD36 ligands.

Materials and methods

Cell culture

Spodoptera frugiperda Sf9 insect cells (Invitrogen, Burlington, Canada) were grown in Sf900 II serum free medium (Invitrogen) containing 50 µg/mL penicillin (Wisent,

St-Bruno, Canada) and Grace insect cell medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Wisent) and 100 µg/mL penicillin at 27°C. *Trichoplusia ni* High Five insect cells (Invitrogen) were grown in EX-CELL 405 medium (SAFC, St. Louis, MO) containing 50 µg/mL penicillin. RAW 264.7 murine macrophage cells (American Type Culture Collection, Manassas, VA) were maintained in DMEM high glucose (Wisent) containing 100 µg/ml penicillin and supplemented with 10% heat-inactivated FBS. Cells were used between passage 5 and 20.

Construction of the recombinant baculovirus

Human CD36 ectodomain (hCD36ED) (residues 30 → 439) was amplified by PCR using a *Pfx* DNA polymerase (Invitrogen) from pcDNA3.1+hCD36 (kindly provided by M. Febbraio, Lerner Research Institute, Cleveland). Primers used for amplification were designed with the addition of unique restriction sites: a 5' *NcoI* (underlined) (GGGCCATGGGGGAGACCTGCTTATCCAGAAGACA) and a 3' *EcoRI* (underlined) (CCCGAATTCTTAGTTTATTTTCCAGTTACTTGACTTCT). The PCR fragment was digested with *EcoRI* and *NcoI* (New England Biolabs, Pickering, Canada) and subcloned into a modified pFastBac1 transfer plasmid (pKMJ-His3C, kindly provided by M. Jinek, University of California, Berkeley) carrying an N-terminal viral signal sequence, a Flag epitope and a hexahistidine tag. Sequencing was performed to validate insertion of hCD36ED (data not shown). Recombinant baculovirus was produced using the standard Bac-to-Bac protocol according to the manufacturer.

Expression of hCD36ED

The recombinant CD36 binding domain was expressed as a secreted protein in *Trichoplusia ni* High Five insect cells. Protein expression was achieved by infecting 3 L of shaking culture cells at a density of 2×10^6 cells/ml with the recombinant baculovirus at a MOI (multiplicity of infection) of 3. After 72 h post-infection, the conditioned medium was cleared of cells by centrifugation (10,000 x g for 30 min) and diafiltered by tangential flow ultrafiltration using a 30 kDa cut-off cartridge (Pall, Port Washington, NY) in binding buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride)) at 4 °C. A 10-fold dilution of the original media was achieved.

Purification of hCD36ED

The recombinant hCD36ED was first purified by Ni²⁺ affinity chromatography on a Poros perfusion chromatography column (Applied Biosystems, Foster City, CA) pre-equilibrated with binding buffer. After extensive washing, the protein was eluted with a 0-500 mM imidazole gradient (5 mL fractions) in 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl and 1 mM PMSF. Fractions were analysed by Western blot using an antiCD36 antibody (Novus Biologicals, Littleton, CO) (see *Western blot analysis*). Positive fractions were pooled and dialysed in 50 mM Tris-HCl pH 8.0 containing 150 mM NaCl for immunoaffinity purification on an anti-flag M2 affinity gel (Sigma, St. Louis, MO). The protein was eluted with 1 M glycine buffer pH 3.5 (1 mL fractions) into tubes containing 25 µL of 1 M Tris-HCl buffer pH 8.0. Fractions were analyzed by Western blotting (see *Western blot analysis*). Positive fractions were pooled and concentrated on a 30 kDa cut-off Amicon Ultracel centrifugal filter unit (Millipore,

Billerica, MA). Protein concentration was determined with the BCA assay (Thermo Scientific, Rockford, IL).

Glycosylation state of the recombinant hCD36

To assess the glycosylation state of the secreted ectodomain, a small aliquot of protein (10 µg) was denatured in 0.5% SDS and 40 mM DTT buffer at 100 °C for 10 min, and deglycosylated with a PNGase (N-Glycosidase F) deglycosylation kit (New England Biolabs, Pickering, Canada). The digestion was kept on ice prior to analysis by western blotting (see *Western blot analysis*).

Western blot analysis

Protein samples were analysed on 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electrotransferred on a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). The membrane was blocked with Tris-buffered saline (20 mM Tris pH 7.4, NaCl 150 mM) with 0.05% Tween 20 (TBS-T) containing 5% milk powder (BioShop, Burlington, Canada) for 1 h at room temperature and incubated with primary antibody against CD36 (1:2,000) (Novus Biologicals, Littleton, CO) in TBS-T with 5% milk powder overnight at 4 °C. The membrane was washed 5 times with TBS-T and incubated with secondary HRP-conjugated (horseradish peroxidase-conjugated) goat anti-rabbit IgG antibody (1:50,000) (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc., West Grove, PA) in TBS-T with 5% milk powder for 1 h at room temperature. After washing 5 times with TBS-T, membrane was visualized with ChemiImager 5500 (Alpha Innotech Corp, San Leandro, CA) using SuperSignal West Dura substrate (Thermo scientific, Rockford, IL).

Circular dichroism measurements of hCD36ED

The native recombinant hCD36ED was dialyzed in phosphate buffer (10 mM

Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ pH 7.4, 100 mM NaF), and used at a concentration of 25 µg/mL for CD measurements in a 10 mm cell on a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan). Denaturation was achieved with the addition of 6 M GnHCl. Far UV scans were collected between 260 to 190 nm in 0.5 nm steps at room temperature. The blank spectra were subtracted and the raw data were converted to mean residue molar ellipticity (MRE) in the usual way. Secondary structural content was estimated from the CD spectra using the Dicroweb website (dichroweb.cryst.bbk.ac.uk) based on the Whitmore and Wallace method [33].

Screening ligands by SPR spectroscopy

Pure recombinant soluble His-tagged hCD36ED (20 µg/ml) was immobilized on a self-assembled peptide-derived monolayer covalently linked to a thin gold layer as described previously [17]. Azapeptide ligand solutions with concentrations ranging from 100 nM to 30 µM were injected. Wavelength shift signal was recorded using SpectraSuite software (Ocean Optics, Dunedin, FL) and K_D 's were determined as described [18]. Briefly, minimum wavelength with PBS blank was subtracted to obtain wavelength variation for each concentration ($\Delta\lambda_{\text{SPR}}$). Every $\Delta\lambda_{\text{SPR}}$ were plotted in MATLAB software (MathWorks, Torrance, CA) in order to determine the K_D with the Langmuir isotherm (equation 1) of each compounds screened.

$$\Delta\lambda_{\text{SPR}} = (K[\text{ligand}]) \Delta\lambda_{\text{SPRmax}} (1 + K[\text{ligand}])^{-1} \text{ (equation 1)}$$

where $K = 1/K_D$.

JNK assay

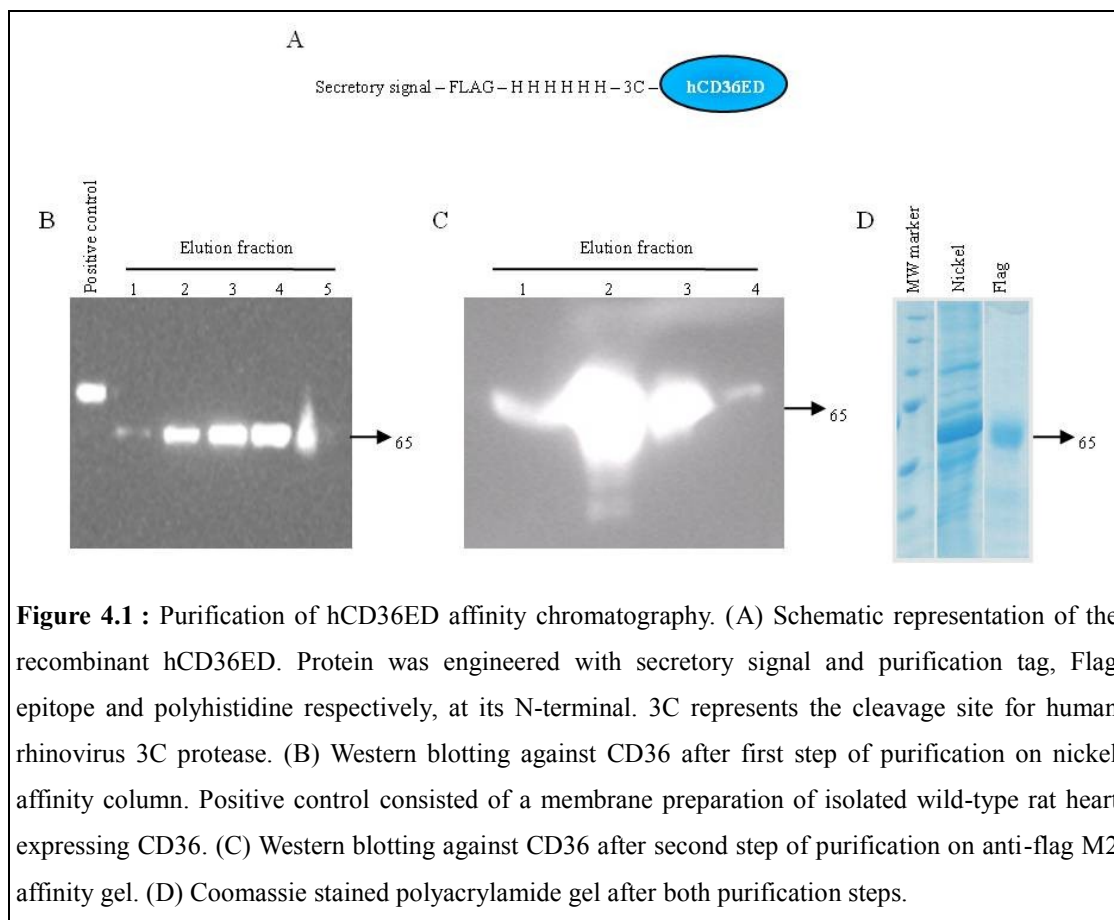
RAW 264.7 murine macrophage cells were seeded at 2×10^6 cells/well in a 6-well plate and starved in serum-free media overnight at 37 °C. Cells were first pre-treated with azapeptide ligand at concentrations ranging from 10^{-9} to 10^{-6} M for 2 h and then stimulated with 10 µg/mL POVPC (Cayman chemical, Ann Arbor, MI) for 30 min at 37 °C. Medium was then removed and cell plates were immediately frozen at -80 °C.

Cells were then scrapped into 100 μ l of RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 25 mM NaF) containing 1 mM PMSF and 1 mM Na_3VO_4 , and incubated on ice for 30 min. The soluble fractions were isolated by centrifugation at 12,000 \times g for 30 min. The supernatant was collected and proteins were assayed with BCA reagent. Aliquots (30 μ g/mL) were analyzed on 10% SDS-PAGE and electrotransferred on nitrocellulose membrane. Membrane was blocked with 5% BSA in TBS-T and incubated overnight with primary antibody against phospho-JNK or total-JNK (1:500) (Cell signalling, Pickering, Canada) in 5% BSA TBS-T. The membranes were then washed 5 times with TBS-T and incubated with secondary HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (1:10,000) in 5% BSA TBS-T for 1 h at room temperature. The reaction was visualized by chemiluminescence using SuperSignal West Dura (Thermo scientific, Rockford, IL) and signals analyzed with ChemiImager 5500 (Alpha Innotech, San Leandro, CA). The intensity of each band was measured by densitometry using Image Quant software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) and the phosphorylation state was determined from the intensity ratio of phospho-JNK/total-JNK. To determine IC_{50} of inhibition, intensity ratio data were plotted using Prism 4 software (GraphPad, La Jolla, CA).

Results

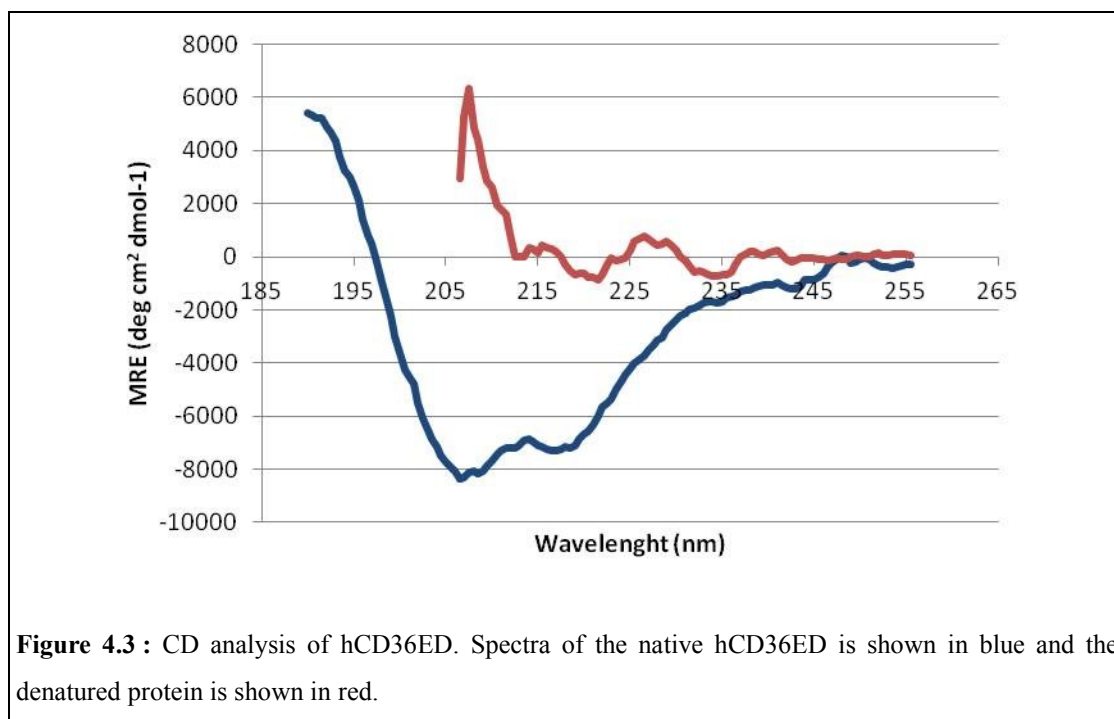
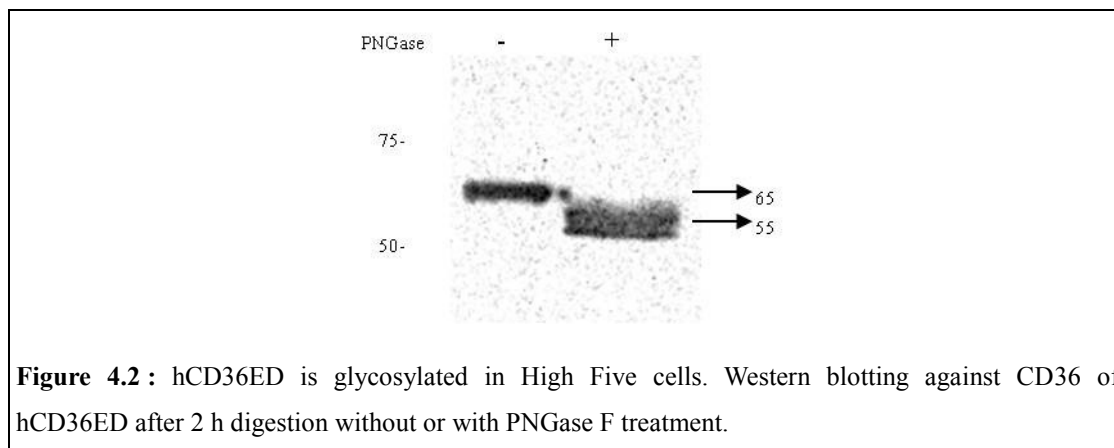
Expression and purification of hCD36ED in High Five insect cells

The human CD36 ectodomain (residues Gly³⁰ \rightarrow Asn⁴³⁹) harbouring a Flag epitope and a polyhistidine tag at the N-terminus (Figure 4.1A) was expressed in High Five insect cells. Maximum expression was attained with a MOI of 3 after 72 hours (data not shown). The secreted protein was purified from the supernatant after concentration and diafiltration. A two step purification scheme consisting of Ni^{2+} affinity chromatography followed by immunoaffinity on an anti-Flag affinity gel was necessary to achieve high purity (Figure 4.1B, 4.1C and 4.1D).



The recombinant hCD36ED, which had an apparent molecular weight of 65 kDa on polyacrylamide gel, was converted to a protein with an apparent molecular weight of 55 kDa upon deglycosylation with PNGase (Figure 4.2), indicating optimal processing of the recombinant protein in insect cells. In order to confirm the folded state of the protein, far-UV CD spectra were measured. The results presented in figure 4.3 shows a typical spectrum for a folded protein with strong minima around 205 and 220 nm indicative of high helical content. A radical change in the CD profile is observed after denaturation in GnHCl, indicating that the freshly purified protein features structural elements of a folded protein as previously reported (21;31). The spectrum of the native hCD36 was evaluated for secondary structure content using

the Dichroweb analytical package. The results indicate a 24% and 23% of alpha-helix and beta-sheet content, respectively.



Screening synthetic ligands of CD36 by SPR spectroscopy

Using the pure recombinant soluble binding domain of the hCD36ED receptor, synthetic CD36 azapeptide ligands [15,19] were screened by SPR spectroscopy as

reported by Bolduc *et al.* [18]. Azapeptide structures and their corresponding K_D 's ascertained by SPR spectroscopy are shown in Table 4.1. DBG178 and CP3-(IV) with the aza-substitution at position 4 and the D-Phe-Lys-NH₂ sequence at the C-terminal of the hexapeptide displayed the highest binding affinities with K_D 's of 0.77×10^{-6} M and 0.72×10^{-6} M, respectively. Reduced binding affinity was observed for analogs possessing aza-residues at the position 3: CP-2A(V), CP-AP-4 and CP-2B(I) exhibited respectively K_D 's of 2.75×10^{-6} M, 6.22×10^{-6} M and 3.10×10^{-6} M. The EP 51389 tripeptide Aib-D-Trp(2-Me)-D-Trp(2-Me)-NH₂ used as a negative control for non specific binding, exhibited a $K_D > 10^{-5}$ M and the GHRP derivative EP 80317, which has been previously identified as a CD36 ligand [11], used as a positive control, exhibited a K_D of 2.75×10^{-6} M.

Tableau 4.1 : Dissociation constant (K_D) values of selected azapeptide derivatives screened by SPR spectroscopy.

Compounds	Sequence	K_D (μM)
GHRP-6	His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	25,6
EP 80317	Haic-D-2-MeTrp-D-Lys-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	2,75
CP-1A(IV)	Ala-AzaPhe-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	10,2
CP-2B(I)	His-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Ala-NH ₂	31,0
CP-2B(V)	Ala-D-Trp-AzaLeu-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	4,66
CP-AP-4	His-D-Trp-AzaPro-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	6,22
CP-AzaGly-Pro	His-D-Trp-AzaGly-Pro-D-Phe-Lys-NH ₂	2,20
CP-2A(I)	His-D-Trp-AzaGly-Trp-D-Phe-Ala-NH ₂	8,25
CP-2A(III)	His-D-Trp-AzaGly-Ala-D-Phe-Lys-NH ₂	6,66
CP-2A(V)	Ala-D-Trp-AzaGly-Trp-D-Phe-Lys-NH ₂	2,86
CP-3(II)	His-D-Trp-Ala-AzaPhe-D-Ala-Lys-NH ₂	67,0
CP-3(IV)	Ala-D-Trp-Ala-AzaPhe-D-Phe-Lys-NH ₂	0,72
CP-AP-3	His-D-Trp-Ala-AzaPro-D-Phe-Lys-NH ₂	6,01
DBG178	His-D-Trp-Ala-AzaTyr-D-Phe-Lys-NH ₂	0,77
CP-04-25A	His- DTrp-Ala-(Aza-1- <i>m</i> -methoxyphenyl-2,3-triazole-3-alanine)- D-Phe-Lys-NH ₂	1,73
CP-04-25B	His- DTrp-Ala-(Aza-1- <i>p</i> -methoxyphenyl-2,3-triazole-3-alanine)- D-Phe-Lys-NH ₂	3,54
CP-04-25C	His- DTrp-Ala-(Aza-1- <i>p</i> -toluyl-2,3-triazole-3-alanine)- D-Phe-Lys- NH ₂	5,07
CP-04-25D	His- DTrp-Ala-(Aza-1- <i>p</i> -fluorophenyl-2,3-triazole-3-alanine)- D- Phe-Lys-NH ₂	1,73
CP-04-25E	His- DTrp-Ala-(Aza-1- <i>m</i> -trifluoromethylphenyl-2,3-triazole-3- alanine)- D-Phe-Lys-NH ₂	7,74
CP-04-25F	His- DTrp-Ala-(Aza-1-(1-naphthyl)-2,3-triazole-3-alanine)- D-Phe- Lys-NH ₂	2,42
EP 51389	Aib-D-Trp(2-Me)-D-Trp(2-Me)-NH ₂	>10

JNK assay and correlation with SPR spectroscopy data

The SPR spectroscopy binding data were next correlated with the inhibitory effects of the azapeptides on MAP kinase JNK1/2 phosphorylation induced by POVPC, an oxidized-derived phospholipid, in a cellular assay, and compared with those of EP 80317 and the EP 51389 tripeptide as positive and negative controls, respectively. No inhibitory effect was observed when azapeptide ligands and POVPC were incubated together (data not shown). We have thus evaluated the effect of preincubation of the cells with a representative azapeptide prior to POVPC stimulation of JNK

phosphorylation. A time-course of preincubation with DBG178 at 10^{-7} M showed that a 2-hours pretreatment with the azapeptide was sufficient and necessary to observe a significant inhibition of JNK phosphorylation. Dose-dependent inhibitory curves and IC_{50} values were determined for a selected group of compounds for which a K_D values were obtained by SPR spectroscopy (Figure 4.4). DBG178 exhibited IC_{50} values of 2.14×10^{-7} M, commensurate with its binding affinities measured by SPR spectroscopy. The IC_{50} values for EP 80317, CP-AP-4, CP-2A(V), CP-2B(I) and the EP 51389 tripeptide (as negative control) were respectively 3.76×10^{-7} M, 5.24×10^{-7} M, 7.37×10^{-7} M, $>10^{-5}$ M and $>10^{-5}$ M. The lack of inhibitory effect exhibited by CP-2B(I) and the EP 51389 tripeptide correlated with their low binding affinities to CD36 in the SPR spectroscopy assay (Figure 4.5). However, an order of magnitude difference with the binding affinities was observed for most of the other compounds.

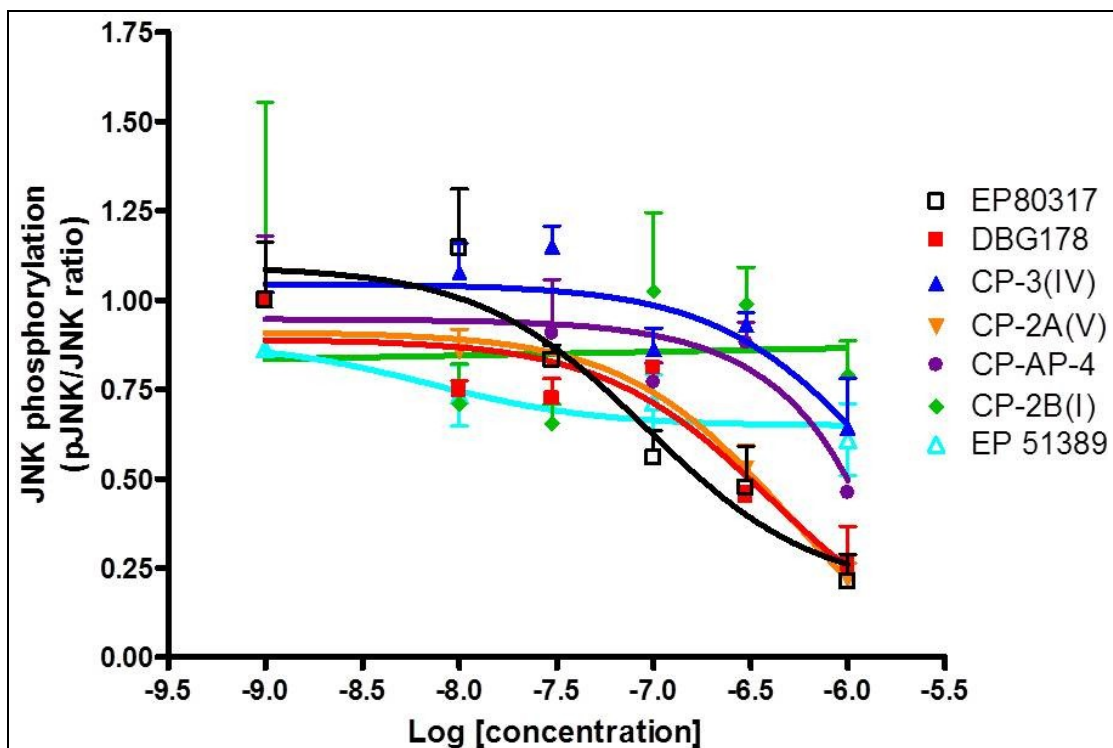


Figure 4.4 : Inhibition curves of POVPC-induced phosphorylation of JNK1/2 in RAW 264.7 macrophage cells by azapeptide derivatives. Cells were pre-treated with concentrations ranging from 1 nM to 1 μ M of EP 80317, DBG178, CP-2A(V), CP-2B(i) and EP 51389 for 2 h and stimulated with 10 μ g/mL POVPC. Phosphorylation of JNK1/2 was analyzed by densitometry of phospho-JNK/total-JNK ratios.

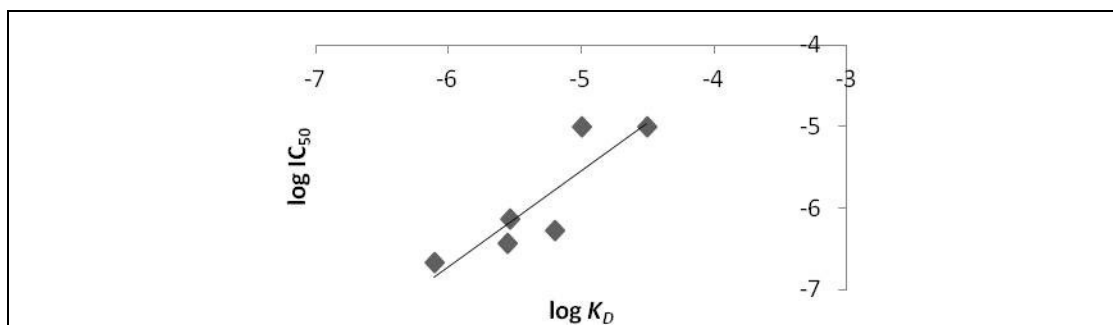


Figure 4.5 : Correlation between the K_D values determined with the SPR spectroscopy method and the IC_{50} values obtained with the JNK assay. Correlation coefficient was determined with the linear regression of a log-log plot of K_D and IC_{50} .

Discussion

The CD36 receptor is a promising therapeutic target for combating diseases such as atherosclerosis and age-related macular degeneration (AMD). In the former, CD36-mediated internalization of oxLDL and foam cell formation and, in the latter, the role of CD36 in the appearance of drusen in Bruch's membrane are hallmarks of the diseases. By immobilizing a His-tagged variant of the extracellular binding domain of CD36 to a SPR surface modified with a peptide monolayer, we have shown that an optical spectroscopy real-time and label-free method for ligand screening is an alternative to other standard method such as competitive covalent CD36 binding assay.

The purified form of hCD36ED was expressed and used to screen synthetic ligands by SPR spectroscopy. The secreted soluble form of hCD36ED produced in High five insect cells was confirmed to be glycosylated, indicating that it had gone through the folding machinery in the endoplasmic reticulum and most likely, adopted a folded conformation. The glycosylation of the extracellular binding domain of CD36 seems to play an important role in the folding process, because we were unable to generate well folded material from bacterial expression (data not shown). In addition, it was reported that a glycosylation-deficient CD36 mutant aggregated and did not fold properly in HEK cells [20].

The SPR approach features many advantages compare to the enzyme-linked immunosorbent assay based on the competition of soluble CD36 binding to immobilized oxidized LDL [13]. The latter required the immobilization of modified lipoproteins with varying degrees of oxidation and consequently different affinities

for CD36 [6,22]. Moreover, doubt has been cast on the competent folding of the soluble binding domain of hCD36 [13], which was expressed as inclusion bodies and refolded at pH 7.3 without a redox system, because the elaborate pattern of disulfide bridges in the extracellular domain may likely not have been formed [30]. Considering the importance of glycosylation for proper folding [20] and the elaborate pattern of disulfide bridges in the extracellular domain of the native full length receptor [30], it is quite doubtful that this refolded binding domain from *E. coli* adopts a native conformation. Our data indicate that the soluble hCD36 binding domain used in the current study adopts a folded conformation. As previously reported [21], a mix of alpha-helices and beta-sheets is present in the CD36 ectodomain; our evaluation indicates an equivalent proportion of these structural elements. Thus, the soluble hCD36 binding domain used in the current study is competent for binding CD36-specific ligands, and is suitable for high-throughput screening. A direct means for measuring binding affinity (K_D) of CD36 ligands, the SPR spectroscopy approach was more sensitive and less tedious to perform than the covalent photoaffinity competition binding assay, which may underestimate the K_D values, due to the non-equilibrium covalent binding condition [31,32].

Small mass peptides such as azapeptides were not expected to generate a significant change in refractive index in the SPR spectroscopy assay; however, certain azapeptides induced significant amplification of the SPR signal, suggesting that the binding to CD36 may cause a significant conformational change within the immobilized extracellular domain. In such cases, azapeptide affinity for the receptor immobilized onto a peptide monolayer was selective and enabled us to investigate their structure-activity relationships. The combination of an amidated D-Phe-Lys

moiety at the C-terminal and the aza substitution at position 4 were determinants for the high affinity binding to CD36 as shown by the K_D 's of DBG178 and CP-3(IV). On the contrary, the presence of an aza residue at position 3 provided only a ten-fold higher binding affinity or no significant increase in binding affinity compared to the positive control GHRP-6.

Ligand binding to CD36 has been shown to cause activation of intracellular signalling pathways involving Src family kinases and MAPK kinases [7]. For example, the binding of oxLDLs to CD36 leads to the phosphorylation of MAP kinases JNK1/2 within macrophage cells [24], generating proinflammatory chemokines and cytokines [25]. Exposure of the RAW 264.7 macrophage cell line to the oxLDL-derived phospholipid POVPC induced JNK1/2 phosphorylation [24]. The JNK1/2 activation was reversed by pre-treatment of the macrophage cells with azapeptides in a dose-dependent manner. A correlation was observed between the relative binding affinity of the azapeptide analogs measured by SPR spectroscopy and their IC_{50} values for the inhibition of JNK phosphorylation induced by POVPC ($r^2 = 0.77$ for the linear regression of the log-log plot of K_D and IC_{50} , $n = 6$).

Azapeptides are a new class of selective synthetic peptide ligands for the type B scavenger receptor CD36, which have been derived from growth hormone-releasing peptides [15]. Previously, the GHRP derivative EP 80317 has been shown to decrease the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice (apoE^{-/-}) by reducing the uptake of modified LDL by macrophage cells, and to induce the up-regulation of genes involved in cholesterol/phospholipid efflux [11,26]. In addition, EP 80317 reduced the expression of proinflammatory proteins, including NADPH oxidase, induced nitric oxide synthase (iNOS), vascular endothelial cell

adhesion molecule-1 (VCAM-1) and CCL2 chemokine in aortae from apoE^{-/-} mice [27]. Considering the roles of CD36 ligands in downregulating proinflammatory and oxidative pathways responsible for the formation of atherosclerotic plaques [11], fibrinogenesis in chronic kidney disease [28] as well as subretinal deposits in the development of age-related macular degeneration [12], azapeptides such as DBG178 and CP-3(IV) represent interesting leads for developing therapeutic agents to treat such conditions.

In conclusion, a SPR spectroscopy method, which uses the His-tagged scavenger receptor CD36 ectodomain immobilized on a peptide monolayer, has been validated for the screening of GHRP-6 derivative ligands. This optical wave technology may find its application for high-throughput analysis of other classes of CD36 ligands as well as for screening of other ligand and receptor classes.

Acknowledgements

We gratefully thank Ms. Petra Pohankova and Michael Pruneau for their skilful help and their excellent technical assistance.

References

- [1] Cooper MA, Label-free screening of bio-molecular interactions, *Anal Bioanal Chem.* 377 (2003) 834-842.
- [2] Karlsson R, SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas, *J Mol Recognit.* 17 (2004) 151-161.
- [3] Silverstein RL, Febbraio M, CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior, *Sci. Signal.* 72 (2009) re3.
- [4] Tandon NN, Lipsky RH, Burgess WH, Jamieson GA, Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36), *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 7570-7575.
- [5] Ryeom SW, Sparrow JR, Silverstein RL, CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium, *J. Cell. Sci.* 109 (1996) 387-395.
- [6] Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL, CD36 and macrophages in atherosclerosis, *Cardiovasc Res.* 75 (2007) 468-477.
- [7] Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA, CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 11811-11816.
- [8] 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.* 6 (2000) 41-8.
- [9] Kennedy DJ, Kuchibhotla S, Westfall KM, Silverstein RL, Morton RE, Febbraio M, A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling, *Cardiovasc Res.* 89 (2011) 604-613.
- [10] Bodart V, Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, Perreault A, Sejlitz

T, Escher E, Silverstein RL, Lamontagne D, Ong H, CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart, *Circ. Res.* 90 (2002) 844-849.

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

[12] Picard E, Houssier M, Bujold K, Sapiha P, Lubell W, Dorfman A, Racine J, Hardy P, Febbraio M, Lachapelle P, Ong H, Sennlaub F, Chemtob S, CD36 plays an important role in the clearance of oxLDL and associated age-dependent sub-retinal deposits, *Aging* 2 (2010) 981-989.

[13] Wang L, Bao Y, Yang Y, Wu Y, Chen X, Si S, Hong B, Discovery of antagonists for human scavenger receptor CD36 via an ELISA-like high-throughput screening assay, *J. Biomol. Screen.* 15 (2010) 239-250.

[14] Xu Y, Wang J, Bao Y, Jiang W, Zuo L, Song D, Hong B, Si S, Identification of two antagonists of the scavenger receptor CD36 using a high-throughput screening model, *Anal. Biochem.* 400 (2010) 207-212.

[15] Sabatino D, Proulx C, Klocek S, Bourguet CB, Boeglin D, Ong H, Lubell WD, Exploring side-chain diversity by submonomer solid-phase aza-peptide synthesis. *Org Lett.* 11 (2009) 3650-3.

[16] Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ, Shan L, Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL, Hoff HF, Salomon RG, Hazen SL, A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions,

J. Biol. Chem. 277 (2002) 38517-38523.

[17] Bolduc OR, Clouthier CM, Pelletier JN, Masson JF, Peptide self-assembled monolayers for label-free and unamplified surface plasmon resonance biosensing in crude cell lysate, *Anal Chem.* 81 (2009) 6779-6788.

[18] Bolduc OR, Lambert-Lanteigne P, Colin DY, Zhao SS, Proulx C, Boeglin D, Lubell WD, Pelletier JN, Féthière J, Ong H, Masson JF, Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors, *Analyst.* 136 (2011) 3142-3148.

[19] Proulx C, Lubell WD, Aza-1,2,3-triazole-3-alanine synthesis via copper-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition on aza-progargylglycine, *J Org Chem.* 75 (2010) 5385-5387.

[20] Hoosdally SJ, Andress EJ, Wooding C, Martin CA, Linton KJ, The Human Scavenger Receptor CD36: glycosylation status and its role in trafficking and function, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 16277-16288.

[21] Jimenez-Dalmaroni MJ, Xiao N, Corper AL, Verdino P, Ainge GD, Larsen DS, Painter GF, Rudd PM, Dwek RA, Hoebe K, Beutler B, Wilson IA. Soluble CD36 ectodomain binds negatively charged diacylglycerol ligands and acts as a co-receptor for TLR2, *PLoS One.* 4 (2009) e7411.

[22] Guy RA, Maguire GF, Crandall I, Connelly PW, Kain KC, Characterization of peroxynitrite-oxidized low density lipoprotein binding to human CD36, *Atherosclerosis.* 155 (2001)19-28.

[23] Cheng Y, Prusoff WH, Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction, *Biochem Pharmacol.* 22 (1973) 3099-3108.

- [24] Rahaman SO, Lennon DJ, Febbraio M, Podrez EA, Hazen SL, Silverstein RL, A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation, *Cell Metab.* 4 (2006) 211-221.
- [25] Yamashita S, Hirano K, Kuwasako T, Janabi M, Toyama Y, Ishigami M, Sakai N, Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients, *Mol Cell Biochem.* 299 (2007) 19-22.
- [26] Bujold K, Rhainds D, Jossart C, Febbraio M, Marleau S, Ong H, CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPARgamma activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages, *Cardiovasc. Res.* 83 (2009) 457-464.
- [27] 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, *Cardiovasc Res.* 83 (2009) 42-51.
- [28] Okamura DM, Pennathur S, Pasichnyk K, López-Guisa JM, Collins S, Febbraio M, Heinecke J, Eddy AA, CD36 regulates oxidative stress and inflammation in hypercholesterolemic CKD, *J Am Soc Nephrol.* 20 (2009) 495-505.
- [29] Greenfield NJ, Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data, *Anal Biochem.* 235 (1996) 1-10.
- [30] Rasmussen JT, Berglund L, Rasmussen MS, Petersen TE, Assignment of disulfide bridges in bovine CD36, *Eur. J. Biochem.* 257 (1998) 488-494.
- [31] Sabatino D, Proulx C, Klocek S, Bourguet CB, Boeglin D, Ong H, Lubell WD, Exploring side-chain diversity by submonomer solid-phase aza-peptide synthesis. *Org Lett.* 11 (2009) 3650-3653.
- [32] Bodart V, Bouchard JF, McNicoll N, Escher E, Carrière P, Ghigo E, Sejlitz T,

Sirois MG, Lamontagne D, Ong H, Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ Res.* 85 (1999) 796-802.

[33] Whitmore L, Wallace BA, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers.* 89 (2008) 392-400.

5. Discussion

Le but de notre étude était d'appliquer une méthode de criblage des ligands synthétiques du CD36 par l'approche de la résonance des plasmons de surface et de valider les résultats avec un essai cellulaire. La première étape de ce travail consistait en l'expression du domaine extracellulaire du CD36 humain dans les bactéries et les cellules d'insectes. La seconde étape consistait en l'obtention de la protéine pure en exploitant des séquences spécifiques d'affinité permettant la purification par chromatographie d'affinité. La troisième étape était l'application de la technique de criblage par SPR, telle que décrite par Bolduc *et al.* (163), pour établir la relation structure-activité des différents ligands synthétiques pour leur liaison au récepteur de type éboueur CD36. La dernière étape consistait à valider les données du signal SPR par une étude de corrélation avec la réponse cellulaire des ligands. L'essai cellulaire dans les macrophages RAW 264.7 est basé sur l'effet modulateur d'un pré-traitement avec les peptides synthétiques sur l'activation de la phosphorylation de la MAP kinase JNK1/2 induite par le POVPC.

Le domaine extracellulaire du CD36 humain (hCD36ED) a initialement été exprimé dans les bactéries BL21 (His3C+hCD36ED) (voir annexe 1a). L'analyse des fractions solubles et insolubles a révélé que la protéine est exclusivement exprimée dans les corps d'inclusion des bactéries, rendant sa solubilisation difficile (annexe 1b et 1c). En faisant varier certaines conditions de culture, on peut favoriser la solubilité et le bon repliement des protéines exprimées. Plusieurs conditions ont été testées, dont l'abaissement de la température pour diminuer la vitesse de la synthèse protéique (164) et la co-expression avec des protéines chaperones pour favoriser le bon repliement du CD36 recombinant. L'ajout de partenaire de fusion permet d'augmenter la solubilité (ajout de la MBP (maltose-binding protein)) ou de favoriser la formation de ponts disulfures (ajout de la TrX (thiorédoxine) ou la DsbA (DsbA oxydoréductase)). Cependant aucune augmentation de la solubilité de notre protéine d'intérêt n'a été observée avec les différentes conditions testées (annexe 2 et 3).

Le hCD36ED recombinant n'est pas soluble lorsqu'il est exprimé dans les bactéries. Le CD36 contient un segment très riche en acides aminés hydrophobes

entre les acides aminés 184 et 204, ce qui pourrait expliquer l'agrégation dans les corps d'inclusion (165). Nos résultats sont en accord avec ce qui a été publié précédemment où, pour identifier le site de liaison des LDLox, de courts fragments peptidiques synthétiques du récepteur CD36 devaient être dissous dans un solvant organique (90) et où l'utilisation d'un tampon de repliement était nécessaire pour solubiliser le hCD36ED contenu dans les corps d'inclusion des bactéries *E. coli* afin d'être utilisé pour le criblage par méthode immuno-enzymatique (139). Bien que ces stratégies aient été publiées, il n'est pas clair que le CD36 adopte un bon repliement. Par exemple, le tampon de repliement utilisé par Wang *et al.* (139) ne permet pas la formation des ponts disulfures et il est donc possible que le CD36 ne soit pas dans sa conformation active. Selon nos résultats, la solubilité du hCD36ED reste limitée dans les bactéries malgré l'utilisation de partenaires de fusion.

Les bactéries ne possèdent pas les enzymes nécessaires qui permettent la glycosylation des protéines. La glycosylation est reconnue comme une modification post-traductionnelle permettant une meilleure solubilité et l'obtention d'un état conformationnel optimal (95, 166). La mutation de tous les sites de glycosylation du CD36 empêche son expression à la membrane puisque le récepteur se retrouve agrégé à l'intérieur des cellules de mammifères (54), tel qu'observé avec le hCD36ED dans les bactéries. La glycosylation n'est cependant pas le seul facteur qui permet le bon repliement des protéines. Puisque le bon repliement des protéines dépend de plusieurs facteurs et que les bactéries sont incapables de modifier post-traductionnellement les protéines, un nouveau système d'expression dans les cellules eucaryotes qui contient la machinerie requise pour le repliement optimal de protéines eucaryotes a été utilisé.

L'utilisation des cellules d'insectes permet l'expression de glycoprotéines avec une structure glucosidique qui se rapproche de celle retrouvée chez les mammifères (167). Nous avons procédé à l'expression d'une forme sécrétée du hCD36ED dans les cellules d'insectes High Five, ce qui a permis de récupérer la protéine exprimée dans le milieu culture. La glycosylation a par la suite été confirmée. Notre système d'expression du hCD36ED est similaire à celui utilisé pour exprimer le domaine extracellulaire du CD36 murin (mCD36ED), qui utilise les

mêmes cellules d'insectes (62). Considérant la forte homologie de séquence entre les formes humaine et murine (84%), il est tout à fait raisonnable de considérer que les domaines extracellulaires sécrétés auront des structures similaires (62).

Nos résultats démontrent que la purification du hCD36ED récupéré directement du milieu de culture nécessite une approche associant la chromatographie d'affinité sur colonne de nickel et sur colonne d'anticorps M2 qui reconnaît l'épitope Flag contenu dans la structure primaire de la protéine à purifiée. La grande spécificité de la purification permet d'obtenir une protéine pure à plus de 90%. Le rendement est cependant relativement faible et est estimé à environ 70 µg de protéines recombinantes produites par litre de milieu. Les résultats obtenus par dichroïsme circulaire montrent que la protéine recombinante contient un mélange d'hélices alpha et de feuillets bêta dans sa conformation globale. En accord avec ce qui a été publié précédemment (62), nos résultats montrent que notre hCD36ED possède un repliement optimal et peut être utilisé pour les études de liaison.

Les étapes de la mise au point de la méthode de criblage par spectroscopie SPR décrites dans Bolduc *et al.* (163) ont été développées en utilisant la fraction hautement purifiée du hCD36ED et le EP 80317 comme ligand synthétique contrôle du CD36 (102, 104). Nos résultats montrent la spécificité de liaison des ligands pour le CD36. Lors de la mise au point de la méthode, des concentrations croissantes du EP 80317 (102) ont été injectées à la surface SPR et un signal croissant a été enregistré lorsque le hCD36ED y était immobilisé (annexe 4). Lorsqu'une autre protéine, la dihydrofolate réductase (DHFR), est immobilisé à la surface SPR, on ne dénote aucun signal non spécifique lorsque des concentrations croissantes de EP 80317 sont injectées (annexe 4). Ce résultat démontre que le signal enregistré est spécifique à la liaison des ligands au récepteur CD36 immobilisé à la surface SPR.

Plusieurs ligands ont été criblés et nos résultats démontrent que certaines caractéristiques des ligands favorisent la liaison au CD36. En regardant la structure, un seul composé, le CP-1A(IV), possède la substitution aza en position 2 et son

affinité de liaison est faible. La substitution aza en position 3 contribue à une meilleure affinité de liaison, mais ce sont certains des composés ayant la substitution aza en position 4, le DBG178 et CP-3(IV), qui possèdent la meilleure affinité de liaison. Cependant, la substitution aza en position 4 seule ne mène pas à une haute affinité de liaison puisque le CP-3(II) possède très peu d'affinité au CD36. Le remplacement de la phénylalanine par une alanine en position 5 du CP-3(II) semble affecter l'affinité de liaison au CD36. La combinaison des deux derniers résidus en C-terminal semble donc avoir également un rôle dans l'affinité de liaison. Les composés possédant la combinaison D-Phe-Lys ont généralement une meilleure affinité de liaison pour le CD36 comparativement à D-Phe-Ala et D-Ala-Lys. De façon générale, la substitution aza en position 4 et la présence de D-Phe-Lys-NH₂ en C-terminal contribuent à la liaison de haute affinité des ligands synthétiques au CD36. Cependant, le CP-AP-3 possède ces caractéristiques et son affinité de liaison n'est pas aussi élevée que le DBG178 et CP-3(IV). Il est possible que le résidu proline en position 4 affecte la géométrie du peptide, en plus de l'affinité au CD36, puisque la présence de cet acide aminé dans la séquence d'un peptide peut affecter la conformation du peptide (64).

Le positionnement des peptides synthétiques sur le site de liaison du CD36 est important puisqu'ils doivent interagir avec la méthionine 169, le résidu qui est le point de contact avec ceux-ci (83). La substitution aza confère un repliement bêta à la conformation des peptides (168) et améliore leur spécificité pour le CD36 (84). Nos résultats indiquent que la position de la substitution aza est importante pour l'affinité de liaison au CD36. Quelques facteurs peuvent expliquer ce phénomène : la géométrie du peptide conféré par le repliement bêta et les interactions des chaînes latérales (137).

Le criblage des ligands du CD36 par SPR se démarque de la méthode utilisée précédemment dans notre laboratoire (137) et de celles publiées par d'autres groupes (139, 140). La méthode standard de criblage par photomarquage covalent surestime les valeurs d'affinité (K_i) puisque la liaison covalente de l'hexaréline radiomarquée

au CD36 défavorise l'équilibre entre le ligand à caractériser et le radiotracteur. Les méthodes de criblage utilisant les LDLox comme compétiteur aux ligands à tester (139, 140) peuvent présenter des problèmes de reproductibilité puisque l'affinité de liaison des LDLox varie dépendamment du niveau d'oxydation (169). Avec la méthode de criblage par spectroscopie SPR, le hCD36ED est immobilisé à son extrémité N-terminal via une séquence spécifique polyhistidine à l'ion de cuivre chélaté en C-terminal d'un dérivé peptidique qui est fixé de façon covalente à la surface SPR. Le récepteur est alors immobilisé à la surface SPR via l'une de ses extrémités ce qui lui confère tout de même un grand degré de liberté pour les interactions entre le récepteur immobilisé et les ligands contenus en solution. En effet, la conformation de la boucle extracellulaire du CD36 est flexible lorsque le récepteur est immobilisé à une seule extrémité. Le choix d'utiliser les séquences de purification en N-terminal du hCD36ED se base sur le fait que la signalisation du récepteur avec ses partenaires d'interaction s'effectue avec l'extrémité C-terminal du récepteur à l'intérieur de la cellule (79, 92). Par conséquent, les chances d'interférence dans le signal de liaison sont diminuées si un changement dans la conformation du récepteur dépend de la partie intacte en C-terminal. Ce modèle à un seul ancrage ne reflète cependant pas la topologie du récepteur puisque celui-ci possède deux domaines transmembranaires. Il est difficile de spéculer quelle serait l'impact sur l'affinité de liaison si le récepteur complet était immobilisé à la surface SPR. Afin de vérifier l'effet sur l'affinité de liaison des ligands au CD36 dans sa topologie originale par spectroscopie SPR, il faudrait insérer la forme complète du récepteur dans une couche bilipidique à la surface SPR et comparer avec les valeurs de K_D obtenues avec le domaine extracellulaire seul.

Lorsque les ligands sont injectés à la surface SPR, le large signal obtenu a été attribué à un changement dans la conformation du récepteur (163). En effet, le changement de l'indice de réfraction devrait être négligeable lorsque de petites molécules, telles que nos composés synthétiques, se lient au récepteur immobilisé à la surface SPR. Ainsi, les composés possédant une haute affinité de liaison interagissent avec le CD36 et induisent un changement dans sa conformation à faible concentration

pour perturber les plasmons de surface. Inversement, les composés ayant une faible affinité de liaison interagissent peu avec le récepteur et induisent un changement conformationnel à des concentrations plus élevées. De ce fait, cette méthode de criblage met en évidence les interactions allostériques que modulent les ligands sur le CD36 et permettrait le développement de ligands qui ciblent d'autres sites de liaison sur le CD36, contrairement à ce qui a été publié précédemment (137, 139-140). De plus, les données obtenues en temps réel reflètent directement l'affinité de liaison des ligands puisque ceux-ci interagissent uniquement avec le récepteur sans compétition avec un marqueur radiomarqué (137) ou les LDLox (139, 140). Finalement, le SPR est une technique qui requiert de faibles quantités de matériel (protéine et ligand) et est suffisamment sensible pour permettre le criblage de petites molécules (158) telles nos peptides synthétiques.

Le CD36 est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation (2, 79, 103, 104, 132, 170, 171). L'établissement d'un essai cellulaire a initialement été tenté dans la lignée de macrophages murins J774 ciblant l'expression de la protéine COX-2 tel que décrit par Bujold *et al.* (104). Les résultats de l'expression de COX-2 n'étaient pas suffisamment reproductibles pour développer un essai robuste (données non montrées). Un second essai cellulaire a été mis au point en utilisant la lignée de macrophages murins RAW 264.7 où la phosphorylation des protéines JNK1/2 a été déterminée. Dans cette lignée, la phosphorylation de JNK1/2 est l'un des signaux les plus spécifiques au CD36 suite à la liaison des LDLox puisqu'elle se retrouve dans la formation des cellules spumeuses (79) ainsi que dans la désensibilisation du récepteur de l'insuline (132).

Nos résultats montrent que les ligands de haute et moyenne affinité de liaison inhibent de la phosphorylation de JNK induite par un fragment actif des LDLox, le POVPC (86, 103). Les composés de basse ou sans affinité de liaison apparente pour le CD36 ne démontrent aucun effet d'inhibition. Il existe donc une relation entre l'affinité de liaison et la réponse biologique. L'analyse combinée des constantes de dissociations (K_D) obtenues en SPR et des CI_{50} de l'essai cellulaire permet d'observer une corrélation entre les deux essais ($r^2 = 0,77$), validant ainsi les signaux obtenus par

SPR. L'absence d'activité biologique des ligands de faible affinité de liaison est cohérente avec la corrélation obtenue avec les composés de haute et moyenne affinité de liaison.

Le mécanisme par lequel les peptides exercent cet effet inhibiteur n'est pour l'instant pas élucidé. Le CD36 est reconnu pour s'associer aux protéine kinases de la famille des Src (91) via son extrémité C-terminal (92). Il est possible que la liaison des azapeptides résulte en la dissociation de *lyn* avec le CD36 ou favorise l'association avec une autre protéine kinase de la famille des Src. Un mécanisme semblable a été rapporté dans les cellules endothéliales où, en l'absence de TSP-1, le CD36 s'associe avec la protéine kinase *src*, alors que la liaison du TSP-1 mène à une association avec *fyn* (172). Plus d'expériences seront nécessaires afin d'élucider le mécanisme d'inhibition de la phosphorylation induite de JNK.

Avec ce même essai cellulaire, nous avons remarqué que certains composés ont un effet additif sur la phosphorylation de JNK induite par le POVPC (annexe 5). Les effets différents des peptides ne peuvent être expliqués par le site de liaison puisque tous les peptides partagent le même site entre les résidus 155 et 183 (83, 137). L'hypothèse qui prévaut pour expliquer les effets cellulaires différents de certains peptides par rapport à d'autres est l'existence de différents changements conformationnels du domaine extracellulaire du CD36 qui mènent à l'activation de voies de signalisation différentes. Ainsi, les composés qui modulent à la hausse les effets du POVPC se lient à un site distinct de ce dernier afin de provoquer un changement conformationnel à distance. Bien que ceci représente une nouvelle hypothèse pour le CD36, la modulation allostérique des récepteurs couplés aux protéines G est une théorie biophysique qui est établie depuis quelques années (173). Les résultats obtenus en SPR suggèrent que le signal modulé par de petites molécules résulterait d'un changement conformationnel dans le domaine extracellulaire du CD36 suite à sa liaison aux ligands synthétiques (annexe 4). Les données SPR ne permettent toutefois pas de discriminer des états conformationnels différents et de plus amples expériences devront être effectuées pour prouver cette hypothèse.

6. Perspectives

Les études cristallographiques constituent un outil puissant lors des études structurales et permettent de dévoiler l'état conformationnel des protéines étudiées. La relation structure-activité établie dans le cadre de nos travaux aura permis d'identifier certaines caractéristiques importantes pour atteindre un haut niveau d'affinité de liaison, mais elle ne permet pas une compréhension complète des interactions entre les peptides synthétiques et le site de liaison sur le CD36. La cristallisation de la protéine recombinante du hCD36ED hautement purifiée seule ou sous forme liée avec ses ligands, permettra d'identifier les interactions favorables et défavorables avec les résidus du domaine extracellulaire du récepteur. Une meilleure compréhension des interactions moléculaires entre les ligands et leur récepteur permettra un développement rationnel des ligands synthétiques et l'obtention de composés avec une meilleure affinité de liaison. Pour valider l'importance des interactions avec certains acides aminés, les études cristallographiques permettront d'identifier certains résidus clés qui pourront être mutés afin de vérifier leur influence lors d'études d'affinité de liaison en employant la méthode de criblage par spectroscopie SPR.

Les études cristallographiques permettront également d'élucider l'importance de la conformation du CD36 qui induit des réponses cellulaires différentes. En identifiant les résidus cibles pour obtenir une conformation précise et un effet cellulaire spécifique, on peut définir et développer un type spécifique de ligand.

7. Références

1. Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL, Nachman RL. **Isolation of the thrombospondin membrane receptor.** *J Clin Invest.* 1987; 79(4): 1054-61.
2. 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.
3. Barnwell JW, Ockenhouse CF, Knowles DM. **Monoclonal antibody OKM5 inhibits the in vitro binding of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to monocytes, endothelial, and C32 melanoma cells.** *J Immunol.* 1985; 135(5): 3494-7.
4. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL. **Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice.** *J Clin Invest.* 2000; 105(8): 1049-56.
5. Kondo N, Honda S, Kuno S, Negi A. **Positive association of common variants in CD36 with neovascular age-related macular degeneration.** *Aging.* 2009; 1(2): 266-74.
6. Okumura T, Jamieson GA. **Platelet glycoprotein. I. Orientation of glycoproteins of the human platelet surface.** *J Biol Chem.* 1976; 251(19): 5944-9.
7. Talle MA, Allegar N, Makowski M, Rao PE, Mittler RS, Goldstein G. **Classification of human lymphocytes and monocytes with the OK series of monoclonal antibodies.** *Diagn Immunol.* 1983; 1(3): 129-35.
8. Talle MA, Rao PE, Westberg E, Allegar N, Makowski M, Mittler RS, Goldstein G. **Patterns of antigenic expression on human monocytes as defined by monoclonal antibodies.** *Cell Immunol.* 1983; 78(1): 83-99.
9. Bonen A, Dyck DJ, Ibrahimi A, Abumrad NA. **Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36.** *Am J Physiol.* 1999; 276(4 Pt 1): E642-9.
10. Catimel B, McGregor JL, Hasler T, Greenwalt DE, Howard RJ, Leung LL. **Epithelial membrane glycoprotein PAS-IV is related to platelet glycoprotein IIIb binding to thrombospondin but not to malaria-infected**

- erythrocytes.** *Blood.* 1991; 77(12): 2649-54.
11. Greenwalt DE, Watt KW, So OY, Jiwani N. **PAS IV, an integral membrane protein of mammary epithelial cells, is related to platelet and endothelial cell CD36 (GP IV).** *Biochemistry.* 1990; 29(30): 7054-9.
 12. Plüddemann A, Neyen C, Gordon S. **Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands.** *Methods.* 2007; 43(3): 207-17.
 13. Platt N, Gordon S. **Scavenger receptors: diverse activities and promiscuous binding of polyanionic ligands.** *Chem Biol.* 1998; 5(8): R193-203.
 14. Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. **Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor.** *J Biol Chem.* 1994; 269(33): 21003-9.
 15. Rigotti A, Acton SL, Krieger M. **The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids.** *J Biol Chem.* 1995; 270(27): 16221-4.
 16. Mizutani T, Sonoda Y, Minegishi T, Wakabayashi K, Miyamoto K. **Cloning, characterization, and cellular distribution of rat scavenger receptor class B type I (SRBI) in the ovary.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 234(2): 499-505.
 17. Cao G, Garcia CK, Wyne KL, Schultz RA, Parker KL, Hobbs HH. **Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1.** *J Biol Chem.* 1997; 272(52): 33068-76.
 18. Vega MA, Seguí-Real B, García JA, Calés C, Rodríguez F, Vanderkerckhove J, Sandoval IV. **Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36.** *J Biol Chem.* 1991; 266(25): 16818-24.
 19. Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, Kodama T. **Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system.** *Cell Mol Life Sci.* 1998; 54(7): 628-40.
 20. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. **Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein**

- receptor.** *Science*. 1996; 271(5248): 518-20.
21. Hirano K, Yamashita S, Nakagawa Y, Ohya T, Matsuura F, Tsukamoto K, Okamoto Y, Matsuyama A, Matsumoto K, Miyagawa J, Matsuzawa Y. **Expression of human scavenger receptor class B type I in cultured human monocyte-derived macrophages and atherosclerotic lesions.** *Circ Res*. 1999; 85(1): 108-16.
 22. Van Eck M, Twisk J, Hoekstra M, Van Rij BT, Van der Lans CA, Bos IS, Kruijt JK, Kuipers F, Van Berkel TJ. **Differential effects of scavenger receptor BI deficiency on lipid metabolism in cells of the arterial wall and in the liver.** *J Biol Chem*. 2003; 278(26): 23699-705.
 23. Kozarsky KF, Donahee MH, Glick JM, Krieger M, Rader DJ. **Gene transfer and hepatic overexpression of the HDL receptor SR-BI reduces atherosclerosis in the cholesterol-fed LDL receptor-deficient mouse.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(3): 721-7.
 24. Barriocanal JG, Bonifacino JS, Yuan L, Sandoval IV. **Biosynthesis, glycosylation, movement through the Golgi system, and transport to lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins.** *J Biol Chem*. 1986; 261(35): 16755-63.
 25. Berkovic SF, Dibbens LM, Oshlack A, Silver JD, Katerelos M, Vears DF, Lüllmann-Rauch R, Blanz J, Zhang KW, Stankovich J, Kalnins RM, Dowling JP, Andermann E, Andermann F, Faldini E, D'Hooge R, Vadlamudi L, Macdonell RA, Hodgson BL, Bayly MA, Savige J, Mulley JC, Smyth GK, Power DA, Saftig P, Bahlo M. **Array-based gene discovery with three unrelated subjects shows SCARB2/LIMP-2 deficiency causes myoclonus epilepsy and glomerulosclerosis.** *Am J Hum Genet*. 2008; 82(3): 673-84.
 26. Matsumoto A, Naito M, Itakura H, Ikemoto S, Asaoka H, Hayakawa I, Kanamori H, Aburatani H, Takaku F, Suzuki H. **Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(23): 9133-7.
 27. Kodama T, Freeman M, Rohrer L, Zabrecky J, Matsudaira P, Krieger M. **Type**

- I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils.** *Nature*. 1990; 343(6258): 531-5.
28. Ashkenas J, Penman M, Vasile E, Acton S, Freeman M, Krieger M. **Structures and high and low affinity ligand binding properties of murine type I and type II macrophage scavenger receptors.** *J Lipid Res*. 1993; 34(6): 983-1000.
 29. Elomaa O, Kangas M, Sahlberg C, Tuukkanen J, Sormunen R, Liakka A, Thesleff I, Kraal G, Tryggvason K. **Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages.** *Cell*. 1995; 80(4): 603-9.
 30. Elshourbagy NA, Li X, Terrett J, Vanhorn S, Gross MS, Adamou JE, Anderson KM, Webb CL, Lysko PG. **Molecular characterization of a human scavenger receptor, human MARCO.** *Eur J Biochem*. 2000; 267(3): 919-26.
 31. Jiang Y, Oliver P, Davies KE, Platt N. **Identification and characterization of murine SCARA5, a novel class A scavenger receptor that is expressed by populations of epithelial cells.** *J Biol Chem*. 2006; 281(17): 11834-45.
 32. Nakamura K, Funakoshi H, Tokunaga F, Nakamura T. **Molecular cloning of a mouse scavenger receptor with C-type lectin (SRCL)(1), a novel member of the scavenger receptor family.** *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1522(1): 53-8.
 33. Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC. **Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36.** *J Biol Chem*. 1997; 272(34): 21654-9.
 34. Harmon CM, Abumrad NA. **Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids.** *J Membr Biol*. 1993; 133(1): 43-9.
 35. Rasmussen JT, Berglund L, Rasmussen MS, Petersen TE. **Assignment of disulfide bridges in bovine CD36.** *Eur J Biochem*. 1998; 257(2): 488-94.
 36. Rajapaksha WR, McBride M, Robertson L, O'Shaughnessy PJ. **Sequence of**

- the bovine HDL-receptor (SR-BI) cDNA and changes in receptor mRNA expression during granulosa cell luteinization in vivo and in vitro.** *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 134(1): 59-67.
37. Fujita H, Takata Y, Kono A, Tanaka Y, Takahashi T, Himeno M, Kato K. **Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding the 85 kDa human lysosomal sialoglycoprotein (hLGP85) in human metastatic pancreas islet tumor cells.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 184(2): 604-11.
38. Pearson A, Lux A, Krieger M. **Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(9): 4056-60.
39. Ramprasad MP, Fischer W, Witztum JL, Sambrano GR, Quehenberger O, Steinberg D. **The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserine-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(21): 9580-4.
40. Mattei MG, Matterson J, Chen JW, Williams MA, Fukuda M. **Two human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2, are encoded by genes localized to chromosome 13q34 and chromosome Xq24-25, respectively.** *J Biol Chem.* 1990; 265(13): 7548-51.
41. de Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, Vanbervliet B, Pin JJ, Ait-Yahia S, Patel S, Mattei MG, Banchereau J, Zurawski S, Davoust J, Caux C, Lebecque S. **A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment.** *Immunity.* 1998; 9(3): 325-36.
42. Yamanaka S, Zhang XY, Miura K, Kim S, Iwao H. **The human gene encoding the lectin-type oxidized LDL receptor (OLR1) is a novel member of the natural killer gene complex with a unique expression profile.** *Genomics.* 1998; 54(2): 191-9.
43. Hoshikawa H, Sawamura T, Kakutani M, Aoyama T, Nakamura T, Masaki T. **High affinity binding of oxidized LDL to mouse lectin-like oxidized LDL receptor (LOX-1).** *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 245(3): 841-6.

44. Chen M, Narumiya S, Masaki T, Sawamura T. **Conserved C-terminal residues within the lectin-like domain of LOX-1 are essential for oxidized low-density-lipoprotein binding.** *Biochem J.* 2001; 355(Pt 2): 289-96.
45. Ishii J, Adachi H, Aoki J, Koizumi H, Tomita S, Suzuki T, Tsujimoto M, Inoue K, Arai H. **SREC-II, a new member of the scavenger receptor type F family, trans-interacts with SREC-I through its extracellular domain.** *J Biol Chem.* 2002; 277(42): 39696-702.
46. Shibata M, Ishii J, Koizumi H, Shibata N, Dohmae N, Takio K, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H. **Type F scavenger receptor SREC-I interacts with advillin, a member of the gelsolin/villin family, and induces neurite-like outgrowth.** *J Biol Chem.* 2004; 279(38): 40084-90.
47. Shimaoka T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Kataoka H, Kita T, Yonehara S. **Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages.** *J Biol Chem.* 2000; 275(52): 40663-6.
48. Adachi H, Tsujimoto M. **FEEL-1, a novel scavenger receptor with in vitro bacteria-binding and angiogenesis-modulating activities.** *J Biol Chem.* 2002; 277(37): 34264-70.
49. Fernández-Ruiz E, Armesilla AL, Sánchez-Madrid F, Vega MA. **Gene encoding the collagen type I and thrombospondin receptor CD36 is located on chromosome 7q11.2.** *Genomics.* 1993; 17(3): 759-61.
50. Armesilla AL, Vega MA. **Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein.** *J Biol Chem.* 1994; 269(29): 18985-91.
51. Tao N, Wagner SJ, Lublin DM. **CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails.** *J Biol Chem.* 1996; 271(37): 22315-20.
52. Gruarin P, Thorne RF, Dorahy DJ, Burns GF, Sitia R, Alessio M. **CD36 is a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 275(2): 446-54.
53. Marshall RD. **Glycoproteins.** *Annu Rev Biochem.* 1972; 41: 673-702.
54. Hoosdally SJ, Andress EJ, Wooding C, Martin CA, Linton KJ. **The Human**

- Scavenger Receptor CD36: glycosylation status and its role in trafficking and function.** *J Biol Chem.* 2009; 284(24): 16277-88.
55. Thorne RF, Ralston KJ, de Bock CE, Mhaidat NM, Zhang XD, Boyd AW, Burns GF. **Palmitoylation of CD36/FAT regulates the rate of its post-transcriptional processing in the endoplasmic reticulum.** *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1803(11): 1298-307.
56. Silverstein RL, Febbraio M. **CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior.** *Sci Signal.* 2009; 2(72): re3.
57. Tandon NN, Lipsky RH, Burgess WH, Jamieson GA. **Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36).** *J Biol Chem.* 1989; 264(13): 7570-5.
58. Asch AS, Liu I, Briccetti FM, Barnwell JW, Kwakye-Berko F, Dokun A, Goldberger J, Pernambuco M. **Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain.** *Science.* 1993; 262(5138): 1436-40.
59. Woodgett JR, Gould KL, Hunter T. **Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements.** *Eur J Biochem.* 1986; 161(1): 177-84.
60. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. **Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine.** *Blood.* 1992; 80(5): 1105-15.
61. Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL. **CD36 and macrophages in atherosclerosis.** *Cardiovasc Res.* 2007; 75(3): 468-77.
62. Jimenez-Dalmaroni MJ, Xiao N, Corper AL, Verdino P, Ainge GD, Larsen DS, Painter GF, Rudd PM, Dwek RA, Hoebe K, Beutler B, Wilson IA. **Soluble CD36 ectodomain binds negatively charged diacylglycerol ligands and acts as a co-receptor for TLR2.** *PLoS One.* 2009; 4(10): e7411.

63. Baillie AG, Coburn CT, Abumrad NA. **Reversible binding of long-chain fatty acids to purified FAT, the adipose CD36 homolog.** *J Membr Biol.* 1996; 153(1): 75-81.
64. Hutchinson EG, Thornton JM. **A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins.** *Protein Sci.* 1994; 3(12): 2207-16.
65. Harmon CM, Luce P, Beth AH, Abumrad NA. **Labeling of adipocyte membranes by sulfo-N-succinimidyl derivatives of long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport.** *J Membr Biol.* 1991; 121(3): 261-8.
66. Luiken JJ, Willems J, van der Vusse GJ, Glatz JF. **Electrostimulation enhances FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake by isolated rat cardiac myocytes.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 281(4): E704-12.
67. Guthmann F, Haupt R, Looman AC, Spener F, Rüstow B. **Fatty acid translocase/CD36 mediates the uptake of palmitate by type II pneumocytes.** *Am J Physiol.* 1999; 277(1 Pt 1): L191-6.
68. Krammer J, Digel M, Eehalt F, Stremmel W, Füllekrug J, Eehalt R. **Overexpression of CD36 and acyl-CoA synthetases FATP2, FATP4 and ACSL1 increases fatty acid uptake in human hepatoma cells.** *Int J Med Sci.* 2011; 8(7): 599-614.
69. Swerlick RA, Lee KH, Wick TM, Lawley TJ. **Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro.** *J Immunol.* 1992; 148(1): 78-83.
70. Ryeom SW, Sparrow JR, Silverstein RL. **CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium.** *J Cell Sci.* 1996; 109 (Pt 2): 387-95.
71. Laugerette F, Passilly-Degrace P, Patris B, Niot I, Febbraio M, Montmayeur JP, Besnard P. **CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions.** *J Clin Invest.* 2005; 115(11): 3177-84.
72. Finnemann SC, Silverstein RL. **Differential roles of CD36 and alphavbeta5 integrin in photoreceptor phagocytosis by the retinal pigment epithelium.**

- J Exp Med.* 2001; 194(9): 1289-98.
73. Zhang X, Kazerounian S, Duquette M, Perruzzi C, Nagy JA, Dvorak HF, Parangi S, Lawler J. **Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level.** *FASEB J.* 2009; 23(10): 3368-76.
 74. Greenwalt DE, Mather IH. **Characterization of an apically derived epithelial membrane glycoprotein from bovine milk, which is expressed in capillary endothelia in diverse tissues.** *J Cell Biol.* 1985; 100(2): 397-408.
 75. Lobo MV, Huerta L, Ruiz-Velasco N, Teixeira E, de la Cueva P, Celdrán A, Martín-Hidalgo A, Vega MA, Bragado R. **Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary lipids.** *J Histochem Cytochem.* 2001; 49(10): 1253-60.
 76. Chen M, Yang Y, Braunstein E, Georgeson KE, Harmon CM. **Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes.** *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 281(5): E916-23.
 77. Ibrahim A, Sfeir Z, Magharaie H, Amri EZ, Grimaldi P, Abumrad NA. **Expression of the CD36 homolog (FAT) in fibroblast cells: effects on fatty acid transport.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(7): 2646-51.
 78. Zhang X, Fitzsimmons RL, Cleland LG, Ey PL, Zannettino AC, Farmer EA, Sincock P, Mayrhofer G. **CD36/fatty acid translocase in rats: distribution, isolation from hepatocytes, and comparison with the scavenger receptor SR-B1.** *Lab Invest.* 2003; 83(3): 317-32.
 79. Rahaman SO, Lennon DJ, Febbraio M, Podrez EA, Hazen SL, Silverstein RL. **A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation.** *Cell Metab.* 2006; 4(3): 211-21.
 80. Dixit VM, Haverstick DM, O'Rourke KM, Hennessy SW, Grant GA, Santoro SA, Frazier WA. **A monoclonal antibody against human thrombospondin inhibits platelet aggregation.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82(10): 3472-6.
 81. Puente Navazo MD, Daviet L, Ninio E, McGregor JL. **Identification on human CD36 of a domain (155-183) implicated in binding oxidized low-**

- density lipoproteins (Ox-LDL).** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16(8): 1033-9.
82. Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H. **CD36, a member of the class b scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products.** *J Biol Chem.* 2001; 276(5): 3195-202.
83. Demers A, McNicoll N, Febbraio M, Servant M, Marleau S, Silverstein R, Ong H. **Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study.** *Biochem J.* 2004; 382(Pt 2): 417-24.
84. Sabatino D, Proulx C, Klocek S, Bourguet CB, Boeglin D, Ong H, Lubell WD. **Exploring side-chain diversity by submonomer solid-phase azapeptide synthesis.** *Org Lett.* 2009; 11(16): 3650-3.
85. Nicholson AC, Frieda S, Pearce A, Silverstein RL. **Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15(2): 269-75.
86. Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M, Finton PJ, Shan L, Gugiu B, Fox PL, Hoff HF, Salomon RG, Hazen SL. **Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36.** *J Biol Chem.* 2002; 277(41): 38503-16.
87. Kar NS, Ashraf MZ, Valiyaveetil M, Podrez EA. **Mapping and characterization of the binding site for specific oxidized phospholipids and oxidized low density lipoprotein of scavenger receptor CD36.** *J Biol Chem.* 2008; 283(13): 8765-71.
88. Pearce SF, Roy P, Nicholson AC, Hajjar DP, Febbraio M, Silverstein RL. **Recombinant glutathione S-transferase/CD36 fusion proteins define an oxidized low density lipoprotein-binding domain.** *J Biol Chem.* 1998; 273(52): 34875-81.
89. Leung LL, Li WX, McGregor JL, Albrecht G, Howard RJ. **CD36 peptides enhance or inhibit CD36-thrombospondin binding. A two-step process of ligand-receptor interaction.** *J Biol Chem.* 1992; 267(25): 18244-50.

90. Baruch DI, Ma XC, Pasloske B, Howard RJ, Miller LH. **CD36 peptides that block cytoadherence define the CD36 binding region for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.** *Blood*. 1999; 94(6): 2121-7.
91. Huang MM, Bolen JB, Barnwell JW, Shattil SJ, Brugge JS. **Membrane glycoprotein IV (CD36) is physically associated with the Fyn, Lyn, and Yes protein-tyrosine kinases in human platelets.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88(17): 7844-8.
92. Malaud E, Hourton D, Giroux LM, Ninio E, Buckland R, McGregor JL. **The terminal six amino-acids of the carboxy cytoplasmic tail of CD36 contain a functional domain implicated in the binding and capture of oxidized low-density lipoprotein.** *Biochem J*. 2002; 364(Pt 2): 507-15.
93. Sun B, Boyanovsky BB, Connelly MA, Shridas P, van der Westhuyzen DR, Webb NR. **Distinct mechanisms for OxLDL uptake and cellular trafficking by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI.** *J Lipid Res*. 2007; 48(12): 2560-70.
94. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. **Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma.** *Cell*. 1998; 93(2): 229-40.
95. Live DH, Kumar RA, Beebe X, Danishefsky SJ. **Conformational influences of glycosylation of a peptide: a possible model for the effect of glycosylation on the rate of protein folding.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93(23): 12759-61.
96. Silverstein RL. **Inflammation, atherosclerosis, and arterial thrombosis: role of the scavenger receptor CD36.** *Cleve Clin J Med*. 2009; 76 Suppl 2: S27-30.
97. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. **A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis.** *Mol Cell*. 2001; 7(1): 161-71.
98. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA. **CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein.** *J Biol Chem*.

- 1993; 268(16): 11811-6.
99. 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.
 100. Stuart LM, Deng J, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessy EJ, Ezekowitz RA, Moore KJ. **Response to Staphylococcus aureus requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain.** *J Cell Biol.* 2005; 170(3): 477-85.
 101. Takeda K, Akira S. **TLR signaling pathways.** *Semin Immunol.* 2004; 16(1): 3-9.
 102. Marleau S, Harb D, Bujold K, Avallone R, Iken K, Wang Y, Demers A, Sirois MG, Febbraio M, Silverstein RL, Tremblay A, Ong H. **EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions.** *FASEB J.* 2005; 19(13): 1869-71.
 103. 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.** *Cardiovasc Res.* 2009; 83(1): 42-51.
 104. Bujold K, Rhoads D, Jossart C, Febbraio M, Marleau S, Ong H. **CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPARgamma activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages.** *Cardiovasc Res.* 2009; 83(3): 457-64.
 105. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, Motoshima H, Taguchi T, Sonoda K, Kukidome D, Takuwa Y, Kawada T, Brownlee M, Nishikawa T, Araki E. **Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages.** *Circ Res.* 2007; 100(10): 1442-51.
 106. Taketa K, Matsumura T, Yano M, Ishii N, Senokuchi T, Motoshima H, Murata Y, Kim-Mitsuyama S, Kawada T, Itabe H, Takeya M, Nishikawa T, Tsuruzoe K, Araki E. **Oxidized low density lipoprotein activates peroxisome**

- proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) and PPARgamma through MAPK-dependent COX-2 expression in macrophages.** *J Biol Chem.* 2008; 283(15): 9852-62.
107. Roberts W, Magwenzi S, Aburima A, Naseem KM. **Thrombospondin-1 induces platelet activation through CD36-dependent inhibition of the cAMP/protein kinase A signaling cascade.** *Blood.* 2010; 116(20): 4297-306.
108. Primo L, Ferrandi C, Roca C, Marchiò S, di Blasio L, Alessio M, Bussolino F. **Identification of CD36 molecular features required for its in vitro angiostatic activity.** *FASEB J.* 2005; 19(12): 1713-5.
109. Moore KJ, El Khoury J, Medeiros LA, Terada K, Geula C, Luster AD, Freeman MW. **A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid.** *J Biol Chem.* 2002; 277(49): 47373-9.
110. Stuart LM, Bell SA, Stewart CR, Silver JM, Richard J, Goss JL, Tseng AA, Zhang A, El Khoury JB, Moore KJ. **CD36 signals to the actin cytoskeleton and regulates microglial migration via a p130Cas complex.** *J Biol Chem.* 2007; 282(37): 27392-401.
111. Nozaki S, Tanaka T, Yamashita S, Sohmiya K, Yoshizumi T, Okamoto F, Kitaura Y, Kotake C, Nishida H, Nakata A, Nakagawa T, Matsumoto K, Kameda-Takemura K, Tadokoro S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kawamura K, Matsuzawa Y. **CD36 mediates long-chain fatty acid transport in human myocardium: complete myocardial accumulation defect of radiolabeled long-chain fatty acid analog in subjects with CD36 deficiency.** *Mol Cell Biochem.* 1999; 192(1-2): 129-35.
112. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. **PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL.** *Cell.* 1998 Apr 17;93(2):241-52.
113. Harmon CM, Luce P, Abumrad NA. **Labelling of an 88 kDa adipocyte membrane protein by sulpho-N-succinimidyl long-chain fatty acids: inhibition of fatty acid transport.** *Biochem Soc Trans.* 1992; 20(4): 811-3.
114. Müller H, Deckers K, Eckel J. **The fatty acid translocase (FAT)/CD36 and the glucose transporter GLUT4 are localized in different cellular**

- compartments in rat cardiac muscle.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 293(2): 665-9.
115. Bonen A, Luiken JJ, Arumugam Y, Glatz JF, Tandon NN. **Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase.** *J Biol Chem.* 2000; 275(19): 14501-8.
116. Luiken JJ, Koonen DP, Willems J, Zorzano A, Becker C, Fischer Y, Tandon NN, Van Der Vusse GJ, Bonen A, Glatz JF. **Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36.** *Diabetes.* 2002; 51(10): 3113-9.
117. Farhangkhoe H, Khan ZA, Barbin Y, Chakrabarti S. **Glucose-induced up-regulation of CD36 mediates oxidative stress and microvascular endothelial cell dysfunction.** *Diabetologia.* 2005; 48(7): 1401-10.
118. Kashiwagi H, Tomiyama Y, Kosugi S, Shiraga M, Lipsky RH, Kanayama Y, Kurata Y, Matsuzawa Y. **Identification of molecular defects in a subject with type I CD36 deficiency.** *Blood.* 1994; 83(12): 3545-52.
119. Nozaki S, Kashiwagi H, Yamashita S, Nakagawa T, Kostner B, Tomiyama Y, Nakata A, Ishigami M, Miyagawa J, Kameda-Takemura K. **Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects.** *J Clin Invest.* 1995; 96(4): 1859-65.
120. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, Mariotti SP. **Global data on visual impairment in the year 2002.** *Bull World Health Organ.* 2004; 82(11): 844-51.
121. Picard E, Houssier M, Bujold K, Sapieha P, Lubell W, Dorfman A, Racine J, Hardy P, Febbraio M, Lachapelle P, Ong H, Sennlaub F, Chemtob S. **CD36 plays an important role in the clearance of oxLDL and associated age-dependent sub-retinal deposits.** *Aging.* 2010; 2(12): 981-9.
122. Houssier M, Raoul W, Lavalette S, Keller N, Guillonneau X, Baragatti B, Jonet L, Jeanny JC, Behar-Cohen F, Coceani F, Scherman D, Lachapelle P, Ong H, Chemtob S, Sennlaub F. **CD36 deficiency leads to choroidal involution via COX2 down-regulation in rodents.** *PLoS Med.* 2008; 5(2): e39.

123. Bhutto IA, McLeod DS, Hasegawa T, Kim SY, Merges C, Tong P, Luttly GA. **Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration.** *Exp Eye Res.* 2006; 82(1): 99-110.
124. Mwaikambo BR, Sennlaub F, Ong H, Chemtob S, Hardy P. **Activation of CD36 inhibits and induces regression of inflammatory corneal neovascularization.** *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47(10): 4356-64.
125. Mwaikambo BR, Sennlaub F, Ong H, Chemtob S, Hardy P. **Genetic ablation of CD36 induces age-related corneal neovascularization.** *Cornea.* 2008; 27(9): 1037-41.
126. Ockenhouse CF, Tandon NN, Magowan C, Jamieson GA, Chulay JD. **Identification of a platelet membrane glycoprotein as a falciparum malaria sequestration receptor.** *Science.* 1989; 243(4897): 1469-71.
127. Wright PS, Cross-Doersen DE, Schroeder KK, Bowlin TL, McCann PP, Bitonti AJ. **Disruption of Plasmodium falciparum-infected erythrocyte cytoadherence to human melanoma cells with inhibitors of glycoprotein processing.** *Biochem Pharmacol.* 1991; 41(12): 1855-61.
128. Chilongola J, Balthazary S, Mpina M, Mhando M, Mbugi E. **CD36 deficiency protects against malarial anaemia in children by reducing Plasmodium falciparum-infected red blood cell adherence to vascular endothelium.** *Trop Med Int Health.* 2009; 14(7): 810-6.
129. Pain A, Urban BC, Kai O, Casals-Pascual C, Shafi J, Marsh K, Roberts DJ. **A non-sense mutation in Cd36 gene is associated with protection from severe malaria.** *Lancet.* 2001; 357(9267): 1502-3.
130. Das A, Das TK, Sahu U, Das BP, Kar SK, Ranjit MR. **CD36 T188G gene polymorphism and severe falciparum malaria in India.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009; 103(7): 687-90.
131. Coort SL, Hasselbaink DM, Koonen DP, Willems J, Coumans WA, Chabowski A, van der Vusse GJ, Bonen A, Glatz JF, Luiken JJ. **Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese zucker rats.** *Diabetes.* 2004; 53(7): 1655-63.

132. Kennedy DJ, Kuchibhotla S, Westfall KM, Silverstein RL, Morton RE, Febbraio M. **A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling.** *Cardiovasc Res.* 2011; 89(3): 604-13.
133. Handberg A, Levin K, Højlund K, Beck-Nielsen H. **Identification of the oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor CD36 in plasma: a novel marker of insulin resistance.** *Circulation.* 2006; 114(11): 1169-76.
134. Alkhatatbeh MJ, Mhaidat NM, Enjeti AK, Lincz LF, Thorne RF. **The putative diabetic plasma marker, soluble CD36, is non-cleaved, non-soluble and entirely associated with microparticles.** *J Thromb Haemost.* 2011; 9(4): 844-51.
135. Bodart V, Bouchard JF, McNicoll N, Escher E, Carrière P, Ghigo E, Sejlitz T, Sirois MG, Lamontagne D, Ong H. **Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart.** *Circ Res.* 1999; 85(9): 796-802.
136. Ong H, Bodart V, McNicoll N, Lamontagne D, Bouchard JF. **Binding sites for growth hormone-releasing peptide.** *Growth Horm IGF Res.* 1998; 8 Suppl B: 137-40.
137. Sabatino D, Proulx C, Pohankova P, Ong H, Lubell WD. **Structure-activity relationships of GHRP-6 azapeptide ligands of the CD36 scavenger receptor by solid-phase submonomer azapeptide synthesis.** *J Am Chem Soc.* 2011; 133(32): 12493-506.
138. Boutard N, Jamieson AG, Ong H, Lubell WD. **Structure-activity analysis of the growth hormone secretagogue GHRP-6 by alpha- and beta-amino gamma-lactam positional scanning.** *Chem Biol Drug Des.* 2010; 75(1): 40-50.
139. Wang L, Bao Y, Yang Y, Wu Y, Chen X, Si S, Hong B. **Discovery of antagonists for human scavenger receptor CD36 via an ELISA-like high-throughput screening assay.** *J Biomol Screen.* 2010; 15(3): 239-50.
140. Xu Y, Wang J, Bao Y, Jiang W, Zuo L, Song D, Hong B, Si S. **Identification of two antagonists of the scavenger receptor CD36 using a high-**

- throughput screening model.** *Anal Biochem.* 2010; 400(2): 207-12.
141. Wilkinson K, Boyd JD, Glicksman M, Moore KJ, El Khoury J. **A high content drug screen identifies ursolic acid as an inhibitor of amyloid beta protein interactions with its receptor CD36.** *J Biol Chem.* 2011; 286(40): 34914-22.
142. Wood RW. **On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum.** *Philos Mag.* 1902; 4(21):396-402.
143. Rayleigh L. **Dynamical theory of the grating.** *Proc.Roy.Soc.* 1907; 79(532): 399-416.
144. Palmer H. **Diffraction Grating Anomalies. II. Coarse Gratings.** *J. Opt. Soc. Am.* 1956; 46(1): 50-53.
145. Fano U. **The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves).** *J. Opt. Soc. Am.* 1941; 31: 213–222.
146. Otto A. **Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection.** *Z. Phys.* 1968; 216: 398-410.
147. Kretschmann E., Raether H. **Radiative decay of nonradiative surface plasmons excited by light.** *Z. Naturforsch.* 1968; 23: 2135-6.
148. Spiller E. **Interference filters for the ultraviolet and the surface plasmon of aluminum.** *Appl Opt.* 1974; 13(5): 1209-15.
149. Wysin GM, Simon HJ, Deck RT. **Optical bistability with surface plasmons.** *Opt Lett.* 1981; 6(1): 30-2.
150. Weber WH, Ford GW. **Optical electric-field enhancement at a metal surface arising from surface-plasmon excitation.** *Opt Lett.* 1981; 6(3): 122-4.
151. Liedberg B., Nylander C., Lunström I. **Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing.** *Sens. Actuators.* 1983; 4: 299-304.
152. Jönsson U, Fägerstam L, Ivarsson B, Johnsson B, Karlsson R, Lundh K, Löfås S, Persson B, Roos H, Rönnerberg I. **Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology.** *Biotechniques.* 1991; 11(5): 620-7.

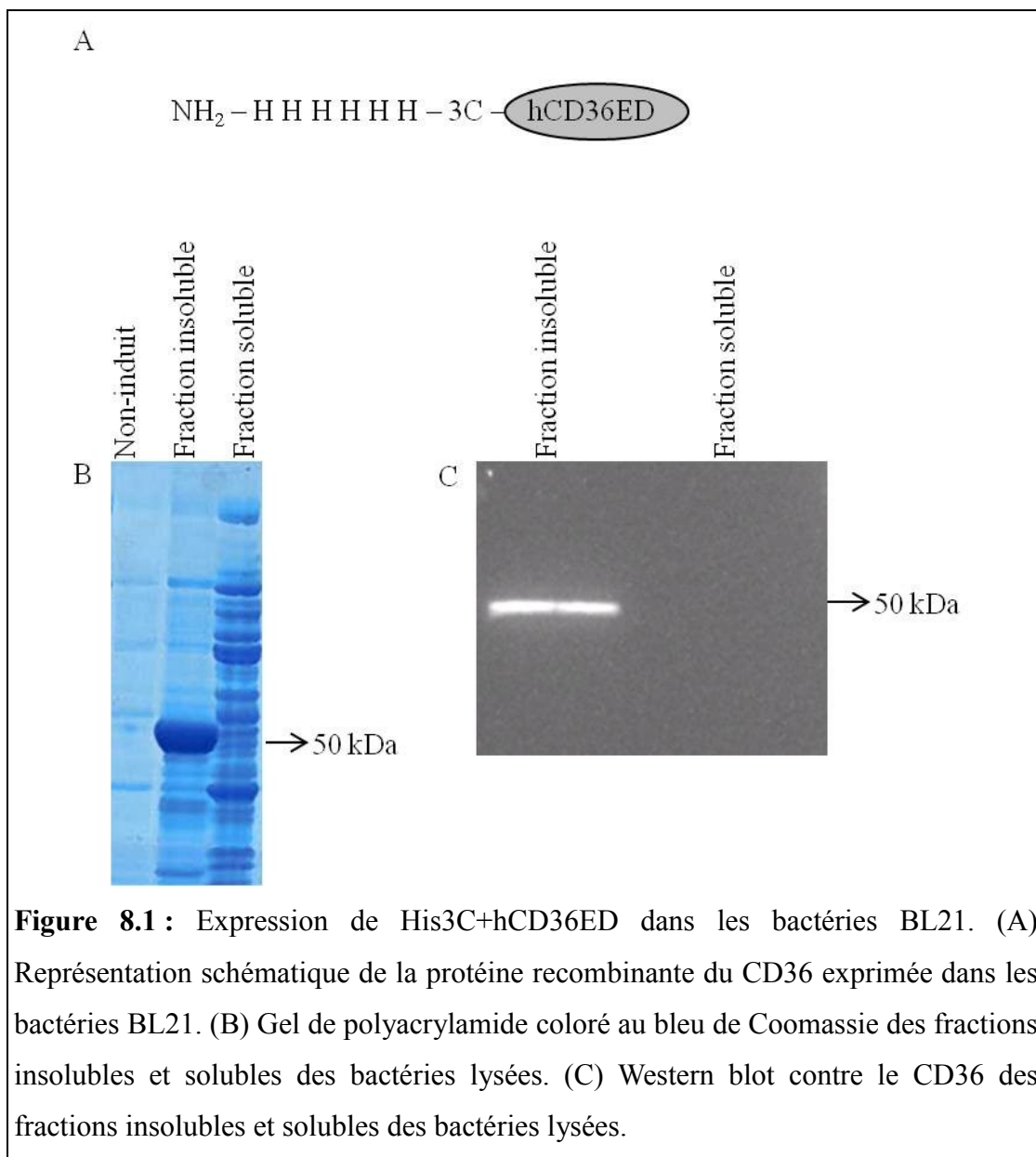
153. Karlsson R, Michaelsson A, Mattsson L. **Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system.** *J Immunol Methods*. 1991; 145(1-2): 229-40.
154. Dubs MC, Altschuh D, Van Regenmortel MH. **Interaction between viruses and monoclonal antibodies studied by surface plasmon resonance.** *Immunol Lett*. 1992; 31(1): 59-64.
155. Sigal GB, Bamdad C, Barberis A, Strominger J, Whitesides GM. **A self-assembled monolayer for the binding and study of histidine-tagged proteins by surface plasmon resonance.** *Anal Chem*. 1996; 68(3): 490-7.
156. Chen H, Lee M, Choi S, Kim JH, Lee J, Koh K. **Comparative study of protein immobilization properties on calixarene monolayers.** *Sensors*. 2007; 7(7): 1091-107.
157. Gilligan JJ, Schuck P, Yergey AL. **Mass spectrometry after capture and small-volume elution of analyte from a surface plasmon resonance biosensor.** *Anal Chem*. 2002; 74(9): 2041-7.
158. Maynard JA, Lindquist NC, Sutherland JN, Lesuffleur A, Warrington AE, Rodriguez M, Oh SH. **Surface plasmon resonance for high-throughput ligand screening of membrane-bound proteins.** *Biotechnol J*. 2009; 4(11): 1542-58.
159. Zhou B, Li R, Zhang Y, Liu Y. **Kinetic analysis of the interaction between amphotericin B and human serum albumin using surface plasmon resonance and fluorescence spectroscopy.** *Photochem Photobiol Sci*. 2008; 7(4): 453-9.
160. Homola J. **Present and future of surface plasmon resonance biosensors.** *Anal Bioanal Chem*. 2003; 377(3): 528-39.
161. Bodart V, Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, Perreault A, Sejlitz T, Escher E, Silverstein RL, Lamontagne D, Ong H. **CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart.** *Circ Res*. 2002; 90(8): 844-9.
162. Ong H, McNicoll N, Escher E, Collu R, Deghenghi R, Locatelli V, Ghigo E, Muccioli G, Boghen M, Nilsson M. **Identification of a pituitary growth**

- hormone-releasing peptide (GHRP) receptor subtype by photoaffinity labeling.** *Endocrinology*. 1998; 139(1): 432-5.
163. Bolduc OR, Lambert-Lanteigne P, Colin DY, Zhao SS, Proulx C, Boeglin D, Lubell WD, Pelletier JN, Féthière J, Ong H, Masson JF. **Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors.** *Analyst*. 2011; 136(15): 3142-8.
164. Georgiou G, Valax P. **Expression of correctly folded proteins in Escherichia coli.** *Curr Opin Biotechnol*. 1996; 7(2): 190-7.
165. Schein CH. **Optimizing protein folding to the native state in bacteria.** *Curr Opin Biotechnol*. 1991; 2(5): 746-50.
166. Welinder KG, Tams JW. **Effects of glycosylation on protein folding, stability and solubility. Studies of chemically modified or engineered plant and fungal peroxidases.** *Progress in Biotech*. 1995; 10: 205-10.
167. Harrison RL, Jarvis DL. **Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell expression system and engineering of insect cells to produce "mammalianized" recombinant glycoproteins.** *Adv Virus Res*. 2006; 68: 159-91.
168. 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.
169. Guy RA, Maguire GF, Crandall I, Connelly PW, Kain KC. **Characterization of peroxynitrite-oxidized low density lipoprotein binding to human CD36.** *Atherosclerosis*. 2001; 155(1): 19-28.
170. Chen K, Febbraio M, Li W, Silverstein RL. **A specific CD36-dependent signaling pathway is required for platelet activation by oxidized low-density lipoprotein.** *Circ Res*. 2008; 102(12): 1512-9.
171. Yipp BG, Robbins SM, Resek ME, Baruch DI, Looareesuwan S, Ho M. **Src-family kinase signaling modulates the adhesion of Plasmodium falciparum on human microvascular endothelium under flow.** *Blood*. 2003; 101(7): 2850-7.
172. Sun J, Hopkins BD, Tsujikawa K, Perruzzi C, Adini I, Swerlick R, Bornstein

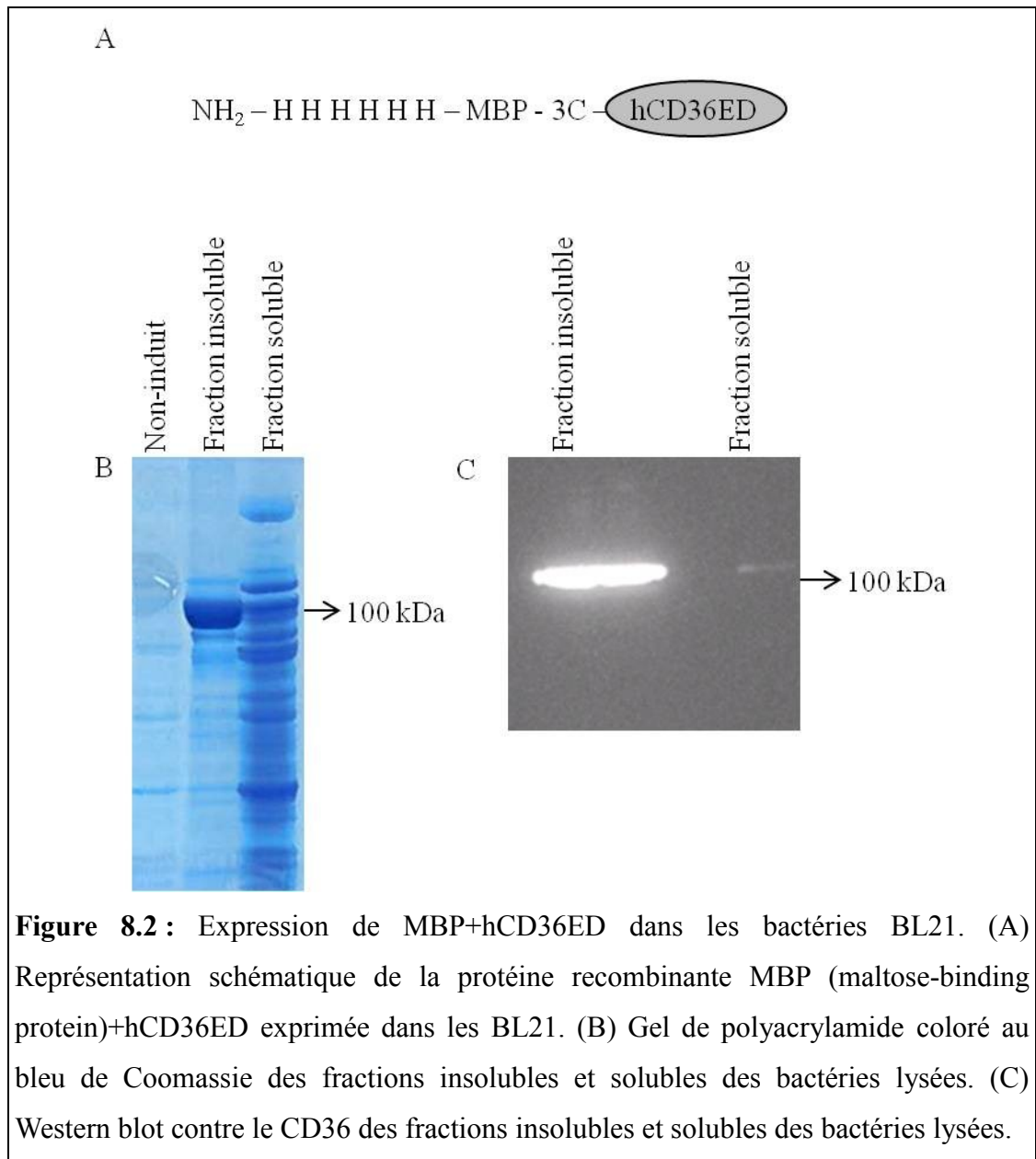
- P, Lawler J, Benjamin LE. **Thrombospondin-1 modulates VEGF-A-mediated Akt signaling and capillary survival in the developing retina.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 296(5): H1344-51.
173. Hoffmann C, Zürn A, Bünemann M, Lohse MJ. **Conformational changes in G-protein-coupled receptors-the quest for functionally selective conformations is open.** *Br J Pharmacol.* 2008; 153 Suppl 1: S358-66.

8. Annexes

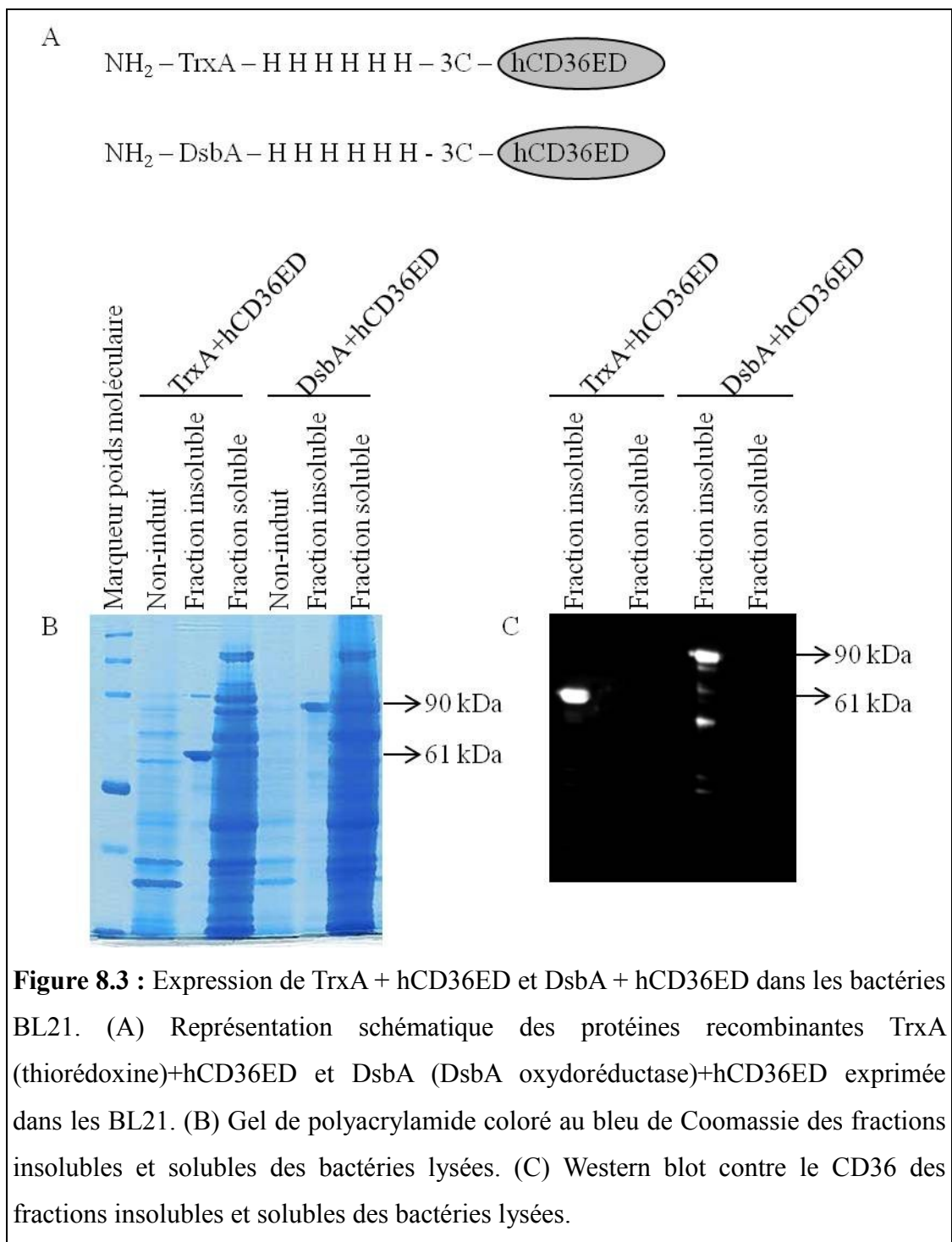
Annexe 1



Annexe 2



Annexe 3



Annexe 4

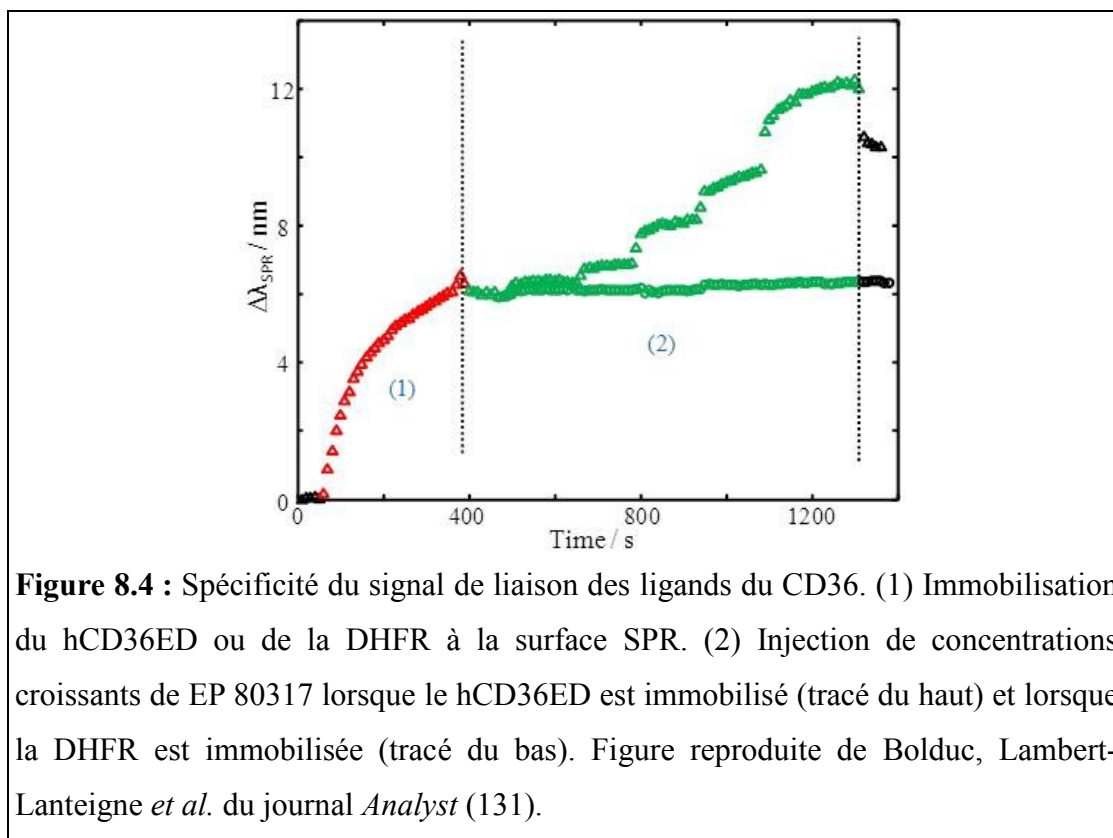
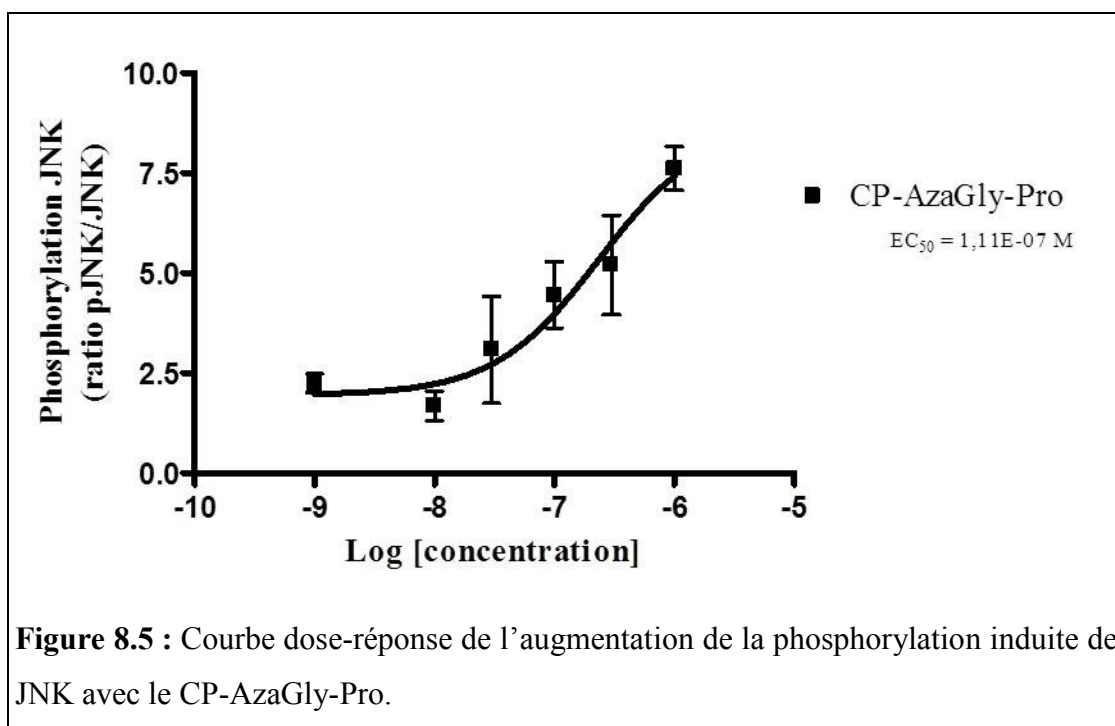


Figure 8.4 : Spécificité du signal de liaison des ligands du CD36. (1) Immobilisation du hCD36ED ou de la DHFR à la surface SPR. (2) Injection de concentrations croissantes de EP 80317 lorsque le hCD36ED est immobilisé (tracé du haut) et lorsque la DHFR est immobilisée (tracé du bas). Figure reproduite de Bolduc, Lambert-Lanteigne *et al.* du journal *Analyst* (131).

Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors. *Analyst*. 2011; 136(15): 3142-8 - Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry

Annexe 5



9. Curriculum vitae

Formation

Maîtrise en sciences pharmaceutiques option pharmacologie, Université de Montréal. 2009-2011.

Baccalauréat en pharmacologie, Université de Sherbrooke. 2005-2008.

Publications

Patrick Lambert-Lanteigne, Olivier R. Bolduc, Caroline Proulx, William D. Lubell, James Féthière, Jean-François Masson and Huy Ong. **Surface plasmon resonance (SPR) sensing for high-throughput screening of synthetic ligands of scavenger receptor CD36.** *Anal Biochem.* En préparation.

Caroline Proulx, Patrick Lambert-Lanteigne, Michael Pruneau, Jean-François Masson, Huy Ong and William D. Lubell. **N-Amino-imidazolin-2-one Peptide Mimics: Diversity-Oriented Synthesis, Conformational Analysis and Bioactivity.** *JACS.* Soumis.

Bolduc OR, Lambert-Lanteigne P, Colin DY, Zhao SS, Proulx C, Boeglin D, Lubell WD, Pelletier JN, Féthière J, Ong H, Masson JF. **Modified peptide monolayer binding His-tagged biomolecules for small ligand screening with SPR biosensors.** *Analyst.* 2011; 136(15): 3142-8.

Communications scientifiques par affiche

Patrick Lambert-Lanteigne, Olivier Bolduc, Caroline Proulx, William D. Lubell, James Fethiere, Jean-François Masson, Huy Ong. **Screening of CD36 synthetic ligands by surface plasmon resonance (SPR).** *CSPS.* Mai 2011.

Patrick Lambert-Lanteigne, Olivier Bolduc, Caroline Proulx, William D. Lubell, James Fethiere, Jean-François Masson, Huy Ong. **Criblage des ligands synthétiques du CD36 par la technique de résonance des plasmons de surface (SPR).** *GRUM.* Novembre 2010.

