

Université de Montréal

**Régulation du métabolisme et du transport des lipides
dans les macrophages: potentiel anti-athérosclérotique
des ligands du CD36**

par

Kim Bujold

Faculté de pharmacie

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en sciences
pharmaceutiques, option pharmacologie

Décembre, 2011

© Kim Bujold, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Régulation du métabolisme et du transport des lipides dans les macrophages: potentiel anti-athérosclérotique des ligands du CD36

Présentée par :
Kim Bujold

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Marc Servant, président-rapporteur
Huy Ong, directeur de recherche
Sylvie Marleau, co-directrice
Céline Fiset, membre du jury
Yves L. Marcel, examinateur externe
[Taper le nom] , représentant du doyen de la FES

Résumé

Les maladies cardiovasculaires sont la principale cause de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. Le récepteur CD36, exprimé à la surface des macrophages, joue un rôle déterminant dans l'internalisation des lipoprotéines oxydées menant à la formation des cellules spumeuses dans l'espace sous endothélial, première étape du développement des lésions athérosclérotiques. Nous avons montré précédemment que les sécrétines de l'hormone de croissance sont des ligands du récepteur CD36 qui possèdent un site de liaison qui chevauche celui des lipoprotéines oxydées. Cependant, aucune étude n'avait rapporté les effets potentiels des ligands sélectifs du CD36 sur la progression des lésions athérosclérotiques et le métabolisme lipidique au niveau des macrophages. Ainsi, ce projet de doctorat visait à évaluer le potentiel anti-athérosclérotique du EP 80317, un ligand sélectif du CD36, et élucider les mécanismes à l'origine de ses effets sur le métabolisme et le transport des lipides au niveau des macrophages.

À cette fin, des souris déficientes en apolipoprotéine E (apoE^{-/-}), nourries avec une diète riche en lipides et en cholestérol, ont été traitées quotidiennement pendant 12 semaines avec le EP 80317, montrant un puissant effet anti-athérosclérotique associé à une réduction de 51% des lésions aortiques et de 30% du taux plasmatique de cholestérol total. Cette même étude a permis de montrer une réduction de l'internalisation des lipoprotéines oxydées ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes/protéines impliqués dans l'efflux du cholestérol au niveau des macrophages, comme le *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ), *liver x receptor α* (LXR α) et les transporteurs ABCA1 et ABCG1, entraînant une réduction de la formation des cellules spumeuses. Ces observations nous ont conduits à élucider les mécanismes moléculaires engendrés par la liaison d'un

ligand sélectif au récepteur CD36 dans les macrophages. Les études ont permis de montrer que les ligands du CD36 entraînent une augmentation de l'efflux du cholestérol vers les transporteurs ABCA1 et ABCG1 en augmentant l'expression protéique de la cyclooxygénase 2 (COX-2) consécutive à la phosphorylation de la MAP kinase ERK1/2. L'activation de COX-2 stimule la production intracellulaire de la prostaglandine 15d-PGJ₂, cette dernière conduisant à l'activation du PPAR γ . Finalement, une troisième étude nous a permis de mettre en évidence les effets du EP 80317 sur le transport inverse du cholestérol *in vivo*. L'injection de macrophages J774 radiomarqués avec du cholestérol tritié dans la cavité péritonéale de souris avec le EP 80317 nous a permis de montrer que le EP 80317 entraîne une réduction de la radioactivité retrouvée dans le foie tandis qu'il augmente celle retrouvée dans les fèces par comparaison aux souris contrôles, sans néanmoins modifier le profil plasmatique du radiotracer entre les deux groupes. De plus, l'expression des gènes impliqués dans le transport du cholestérol au niveau intestinal comme le LXR α , ABCA1, ABCG5 ainsi que ABCG8 ont été régulés à la hausse par le EP 80317 tandis que l'expression de NPC1L1, un transporteur impliqué dans l'absorption du cholestérol, a été régulé à la baisse. Toutefois, les gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol au niveau du foie ne sont pas modulés par le EP 80317.

En conclusion, les travaux effectués dans le cadre de cette thèse nous ont permis de montrer que l'activation du récepteur CD36 par le EP 80317 pourrait s'avérer être une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de l'athérosclérose. Les effets anti-athérosclérotiques et hypocholestérolémiantes des ligands synthétiques du récepteur CD36 sont en partie engendrés par 1) la régulation du métabolisme des lipides au niveau des macrophages en réponse à l'activation du PPAR γ par son ligand endogène, le 15d-PGJ₂ et

2) par une augmentation du transport inverse du cholestérol, particulièrement par une augmentation de l'efflux transintestinal.

Mots-clés: CD36, macrophages, athérosclérose, efflux du cholestérol, transport inverse

Abstract

Cardiovascular diseases are the major cause of mortality and morbidity in industrialized countries. CD36, a type B scavenger receptor expressed on macrophages, appears to play a major role in foam cell formation through scavenging oxidatively modified lipoproteins, thus leading to fatty streak lesion formation in the arterial wall. We have previously reported that growth hormone-releasing peptides (GHRP) are synthetic ligands that share the same binding site as oxidized low density lipoprotein (oxLDL) on the CD36 receptor. However, no study has reported the anti-atherosclerotic effects of CD36 ligands and their role in macrophage lipid metabolism. Thus, this project aimed to evaluate the anti-atherosclerotic effects of EP 80317, a CD36 selective ligand, and to elucidate the role of GHRP on macrophage lipid metabolism and transport.

Apolipoprotein E deficient mice ($\text{apoE}^{-/-}$) fed a high fat high cholesterol diet were treated for 12 weeks with EP 80317. Our study showed that EP 80317 exerted potent anti-atherosclerotic effects as shown by reduced lesion areas (up to 51%) and hypocholesterolemia. We further showed that a chronic treatment with EP 80317 reduced oxLDL uptake and increased the expression of genes/proteins involved in macrophage cholesterol efflux, such as peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), liver x receptor α (LXR α) and ATP-binding cassette A1 (ABCA1) and ABCG1, thus reducing foam cell formation. Our second study aimed to elucidate the molecular mechanisms by which CD36 ligands lead to an increase in macrophage cholesterol efflux following PPAR γ activation. [^3H]-cholesterol-labeled murine macrophages incubated in the presence of EP 80317 showed a significant increase in cholesterol efflux to both ABCA1 and ABCG1 transporters of cholesterol. EP 80317-mediated macrophage cholesterol efflux through

PPAR γ involved an increase in intracellular 15d-PGJ₂ levels that were elicited by extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) stimulation, itself dependent on COX-2 activation. The third and last study of this thesis aimed to investigate the effect of CD36 selective ligand on reverse cholesterol transport *in vivo*. ApoE^{-/-} mice treated or not with EP 80317 were injected intraperitoneally with [³H]-cholesterol-labeled murine J774 macrophage-like cells. The radioactivity recovered in the livers of EP 80317-treated mice was significantly lower than that found in vehicle-treated mice whereas feces radioactivity was higher. Yet, the radioactivity in plasma did not achieve statistical differences between the two groups. Furthermore, the expression of genes involved in intestinal cholesterol transport such as LXR α , ABCA1, ABCG5 and ABCG8 was upregulated in EP 80317-treated mice while the expression of NPC1L1, a transporter involved in cholesterol absorption, was downregulated compared to vehicle-treated mice. In contrast, genes involved in hepatic cholesterol metabolism were not modulated by EP 80317.

In conclusion, the work conducted in this thesis supported that activation of CD36 signaling pathways by EP 80317 may constitute a novel therapeutic approach for the treatment of atherosclerosis. The anti-atherosclerotic and hypocholesterolemic effects of synthetic CD36 selective ligands might be explained, at least in part, by 1) the regulation of macrophage cholesterol metabolism as a result of an increase in PPAR γ activation by its endogenous ligand, 15d-PGJ₂ and 2) the stimulation of reverse cholesterol transport, in particular that of transintestinal cholesterol efflux.

Keywords: CD36, macrophages, atherosclerosis, cholesterol efflux, reverse cholesterol transport

Table des matières

Chapitre 1 et 2: Introduction générale.....	2
1 Le récepteur éboueur de type B: le CD36.....	3
1.1 Structure du récepteur CD36.....	4
1.2 Distribution et régulation de l'expression du récepteur CD36.....	8
1.3 Les ligands du récepteur CD36.....	12
1.3.1 Ligands endogènes.....	12
1.3.2 Ligands exogènes: les sécrétines de l'hormone de croissance comme ligands exogènes du CD36.....	12
1.4 Rôle du récepteur CD36 dans le métabolisme lipidique.....	15
1.4.1 Le CD36: un récepteur-clé dans le transport des acides gras.....	15
1.4.2 Le CD36 : un récepteur-clé dans l'internalisation des lipoprotéines oxydées et le développement de l'athérosclérose.....	19
1.4.2.1 L'athérosclérose et ses différentes théories.....	19
1.4.2.2 Les quatre stades de l'athérosclérose.....	21
1.4.2.2.1 La dysfonction endothéliale.....	25
1.4.2.2.2 La strie lipidique : du recrutement des monocytes à la formation des cellules spumeuses.....	27
1.4.2.2.3 La lésion avancée ou complexe et la plaque fibreuse instable.....	33
1.4.2.3 Rôle du récepteur CD36 dans l'athérosclérose.....	35
1.5 Rôle du CD36 dans l'inflammation.....	38
1.6 Rôle du CD36 dans la régulation de l'angiogenèse.....	42
2 Les monocytes/macrophages: rôle dans le développement de l'athérosclérose et l'homéostasie du cholestérol.....	46
2.1 Origine des différentes populations de monocytes/macrophages.....	47
2.1.1 Les monocytes.....	47
2.1.2 Les macrophages.....	48

2.2	Homéostasie du cholestérol : du métabolisme lipidique dans le macrophage à l'excrétion du cholestérol dans les fèces.....	51
2.2.1	Métabolisme des lipoprotéines plasmatiques.....	51
2.2.2	Homéostasie du cholestérol dans le macrophage.....	55
2.2.2.1	Importance des différents mécanismes d'efflux du cholestérol dans le macrophage.....	58
2.2.2.2	Rôle du récepteur SR-BI dans le transport du cholestérol au niveau du macrophage.....	59
2.2.2.3	Rôle des transporteurs ABC dans l'homéostasie du cholestérol au sein du macrophage.....	60
2.2.2.3.1	Le transporteur ABCA1.....	61
2.2.2.3.2	Le transporteur ABCG1.....	65
2.2.3	Transport inverse du cholestérol.....	67
2.2.3.1	Métabolisme du cholestérol au niveau hépatique.....	67
2.2.3.1.1	Le récepteur SR-BI.....	69
2.2.3.1.2	L'enzyme 7 α -hydroxylase.....	70
2.2.3.1.3	Les transporteurs ABCG5/ABCG8.....	70
2.2.3.1.4	Les transporteurs ABCB4 et ABCB11.....	71
2.2.3.2	Métabolisme du cholestérol au niveau intestinal.....	72
2.2.3.2.1	Les récepteurs scavengers : SR-BI et CD36.....	74
2.2.3.2.2	Le transporteur ABCA1.....	74
2.2.3.2.3	Les transporteurs ABCG5/ABCG8.....	75
2.2.3.2.4	Le transporteur NPC1L1.....	76
2.2.3.3	Rôle des récepteurs nucléaires dans l'homéostasie du cholestérol.....	77
2.2.3.3.1	Rôle du LXR dans le métabolisme des lipides.....	78
2.2.3.3.2	Rôle du PPAR dans la pathogenèse de l'athérosclérose et dans le métabolisme du cholestérol.....	82
2.2.3.4	Différentes stratégies pour moduler le transport inverse du cholestérol : une cible thérapeutique pour le traitement de l'athérosclérose.....	86

3	Hypothèses de travail et objectifs	91
	Chapitre 4, 5 et 6: Résultats	94
	Publications	95
4	EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions.....	97
	Résumé.....	99
	Abstract.....	101
	Introduction.....	104
	Materials and methods	106
	Results.....	111
	Discussion.....	115
	References.....	120
	Figure legends.....	127
5	CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPAR γ activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages.....	135
	Résumé.....	137
	Abstract.....	139
	Introduction.....	141
	Methods.....	143
	Results.....	148
	Discussion.....	152
	References.....	157
	Figure legends.....	162
	Supplementary data.....	170
6	EP 80317, a CD36 selective ligand, promotes reverse cholesterol transport in apolipoprotein E-deficient mice.....	178
	Résumé.....	180
	Abstract.....	182
	Introduction.....	184

Materials and methods	185
Results.....	188
Discussion	189
References.....	194
Figure legends.....	200
Supplementary data.....	206
7 Discussion.....	212
7.1 Rôle des ligands sélectifs du récepteur CD36 dans le développement de l'athérosclérose	215
7.2 Régulation du métabolisme du cholestérol dans le macrophage par les ligands du CD36	221
7.3 Cascade de signalisation menant à l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ : effet anti-inflammatoire potentiel des ligands du CD36.....	227
7.4 Le transport inverse du cholestérol : effets des GHRPs sur l'absorption du cholestérol intestinale.....	232
7.5 Le récepteur CD36 comme nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'athérosclérose : avantages et inconvénients	236
8 Perspectives.....	242
9 Conclusion	246
Bibliographie.....	244

Liste des tableaux

Tableau 1. Régulation de l'expression du récepteur CD36.....	9
Tableau 2. Protéines qui jouent un rôle déterminant dans l'efflux du cholestérol.....	57
Tableau 3. Effets de différents composés sur le transport inverse du cholestérol <i>in vivo</i>	90

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique du gène CD36	5
Figure 2. Structure du récepteur CD36	7
Figure 3. Structure des sécrétines de l'hormone de croissance.....	14
Figure 4. Transport des acides gras par le récepteur CD36	16
Figure 5. Différentes étapes du développement de l'athérosclérose	23
Figure 6. Peroxydation des lipides et génération de métabolites comme le malondialdéhyde et le 4-hydroxynonéal.....	26
Figure 7. Mécanismes impliqués dans le recrutement des monocytes circulants dans l'espace sous-endothélial et dans la différenciation des monocytes en macrophages .	28
Figure 8. Différenciation des monocytes en macrophages et formation des cellules spumeuses	31
Figure 9. Schéma des différents phospholipides oxydés formés lors de l'oxydation du 1- palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (PAPC).....	36
Figure 10. Rôle du CD36 dans l'inflammation.....	39
Figure 11. Rôle du CD36 dans la régulation de l'angiogenèse.....	44
Figure 12. Différenciation des monocytes en macrophages	50
Figure 13. Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines	52
Figure 14. Métabolisme des lipoprotéines plasmatiques.	55
Figure 15. Différentes voies d'efflux du cholestérol dans le macrophage.....	59
Figure 16. Efflux du cholestérol et des phospholipides par le transporteur ABCA1 et formation des pré β -HDL : un modèle en trois étapes	65
Figure 17. Les transporteurs ABCA1 et ABCG1 travaillent de concert pour transporter le cholestérol du macrophage vers les différents accepteurs extracellulaires.....	67
Figure 18. Transport inverse du cholestérol.....	68
Figure 19. Schéma du métabolisme du cholestérol au niveau intestinal.....	73
Figure 20. Rôle du LXR dans le métabolisme des lipides et l'inflammation	79

Figure 21. Rôle du PPAR γ dans l'athérosclérose	83
Figure 22. Régulation du transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie et l'intestin	87
Figure 23. Synthèse des effets anti-athérosclérotiques des GHRPs.....	241

Liste des abréviations

15d-PGJ ₂	15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J ₂
aa	acides aminés
AB	acides biliaires
ABC	transporteur à cassette liant l'ATP (<i>ATP binding cassette</i>)
ACAT	<i>Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase</i>
ACC	acétyl-coenzyme A carboxylase
ADN	acide désoxyribonucléique
AG	acide gras
AGE	produit terminal de glycation (<i>advanced glycation end products</i>)
AGNE	acide gras non estérifié
AGLC	acide gras à longue chaîne
AGTLC	acide gras à très longue chaîne
ANX2	annexine 2
AP-1	protéine activatrice 1 (<i>activator protein 1</i>)
apo	apolipoprotéine
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
BSEP	<i>Bile Salt Export Pump</i>
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein</i>
Cav	cavéoline
CBP	protéine de liaison CREB (<i>CREB binding protein</i>)
CD36	<i>cluster</i> de différenciation 36
CD68	macrosialine
CE	ester de cholestérol
CETP	protéine de transfert des esters de cholestérol (<i>cholesteryl ester transfer protein</i>)
Chol	cholestérol

CM	chylomicron
CMLV	cellule musculaire lisse vasculaire
COX	cyclooxygénase
CPT1	carnitine palmitoyltransférase-1
CRP	protéine C réactive (C reactive protein)
CYP	cytochrome P450
CYP7a1	enzyme 7 α -cholestérol hydroxylase
Cys	cystéine
iNOS	oxyde nitrique synthétase inductible (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FABP	protéine liant les acides gras (<i>fatty acid binding protein</i>)
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FAS	synthase des acides gras (<i>fatty acid synthase</i>)
FasL	<i>Fas ligand</i>
FAT	translocase des acides gras (<i>fatty acid translocase</i>)
FATP	protéine de transport des acides gras (<i>fatty acid transport protein</i>)
FOXO1	<i>Forkhead box protein O1</i>
FXR	récepteur farnésoïde X (<i>farnesoid X receptor</i>)
GHRP	sécrétine de l'hormone de croissance (<i>growth hormone-releasing peptide</i>)
GHS-R	récepteur des sécrétagogues de l'hormone de croissance (<i>growth hormone secretagogue receptor</i>)
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
gp	glycoprotéine
HDL	lipoprotéine de haute densité (<i>high density lipoprotein</i>)
HETE	hydroxyeicosatétranoïque
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-CoA
HNE	hydroxynonéal
HNF-4 α	facteur nucléaire des hépatocytes (<i>hepatocyte nuclear factor 4α</i>)
HODE	acide hydroxyoctadécadiénoïque

ICAM	molécule d'adhérence intracellulaire (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
IDL	lipoprotéine de densité intermédiaire (<i>intermediate density lipoprotein</i>)
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IKK	I κ B kinase
IL	interleukine
JAM-A	molécule d'adhérence jonctionnelle A (<i>junctional adhesion molecule</i>)
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	kilodalton
LCAT	lécithine cholestérol acyltransférase (<i>lecithin-cholesterol acyltransferase</i>)
LDL	lipoprotéine de faible densité (<i>low density lipoprotein</i>)
LDLac	lipoprotéine de faible densité acétylée
LDLmm	lipoprotéine de faible densité minimalement oxydée
LDLox	lipoprotéine de faible densité oxydée
LDLR	récepteur LDL
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LIMP-2	<i>lysosomal integral membrane protein-2</i>
LO	lipoxygénase
LOX-1	<i>lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1</i>
LPL	lipoprotéine lipase
LPS	lipopolysaccharide
LRH-1	<i>liver receptor homolog 1</i>
LRP	<i>LDL receptor-related protein-1</i>
LTA	acide lipotéichoïque (<i>lipoteichoic acid</i>)
LXR	<i>liver X receptor</i>
LXRE	élément de réponse du LXR (<i>liver X receptor response element</i>)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	protéine-1 chimiotactique du macrophage (<i>macrophage chemoattractant protein 1</i>)

M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MDA	malondialdéhyde
MDR2	<i>multidrug resistance 2</i>
MEK	<i>mitogen-activated/extracellular signal regulated kinase, MAP kinase kinase</i>
MIF	facteur inhibiteur de la migration des macrophages (<i>macrophage migration inhibiting factor</i>)
MIP	protéine inflammatoire des macrophages (<i>macrophage inflammatory protein</i>)
MMP	métalloprotéase matricielle
MPO	myéloperoxydase
MTP	protéine de transfert des triglycérides microsomale (<i>microsomal triglyceride transfer protein</i>)
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBD	domaine de liaison aux nucléotides (<i>nucleotide-binding domain</i>)
nCEH	cholesteryl ester hydrolase neutre
NCoR	co-répresseur du récepteur nucléaire (<i>nuclear receptor co-repressor</i>)
NF κ B	facteur nucléaire kappa B (<i>nuclear factor kappa B</i>)
NO	oxyde nitrique (<i>nitric oxide</i>)
NPC	<i>Niemann-Pick disease type C</i>
NPC1L1	<i>Niemann-Pick C1 Like 1</i>
PAPC	<i>1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine</i>
PC	phosphatidylcholine
PDGF	facteur de croissance dérivé des plaquettes (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PE	phosphatidyléthanolamine
PECAM-1	molécule d'adhérence aux plaquettes et cellules endothéliales (<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>)
PfEMP-1	<i>Plasmodium falciparum</i> erythrocyte membrane protein 1

PGC-1	<i>peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator 1</i>
PGE ₂	prostaglandine E ₂
PI3-K	kinase-3 phosphoinositide
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PL	phospholipide(s)
PLA ₂ -Lp	phospholipase A ₂ associée aux lipoprotéines
PLC	phospholipase C
PLTP	protéine de transfert des phospholipides (<i>phospholipid transfer protein</i>)
PMA	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate</i>
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PPRE	élément de réponse de PPAR (<i>peroxisome proliferator response element</i>)
PS	phosphatidylsérine
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
Pyk2	tyrosine kinase riche en proline 2 (<i>proline-rich tyrosine kinase 2</i>)
RANTES	<i>regulated on activation normal T-cell expressed and secreted</i>
RAR	récepteur de l'acide rétinoïque (<i>retinoic acid receptor</i>)
RCT	transport inverse du cholestérol (<i>reverse cholesterol transport</i>)
RE	réticulum endoplasmique
ROS	espèce réactive de l'oxygène (<i>reactive oxygen species</i>)
RPE	épithélium rétinien pigmentaire (<i>retinal pigmented epithelium</i>)
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
SCD-1	désaturase-1 du stéaroyl CoA (<i>stearoyl-CoA desaturase</i>)
Ser	sérine
SMRT	médiateur silencieux des rétinoïdes et de l'hormone thyroïdienne
SN	stérol neutre
SR-A	récepteur scavenger de type A
SR-BI et II	récepteur scavenger de type B I et II

SREBP	protéine se liant à l'élément de réponse des stérols (<i>regulated on activation normal T-cell expressed and secreted</i>)
STAT	signal activateur de transcription (<i>signal transducers and activators of transcription</i>)
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
TICE	efflux du cholestérol transintestinal (<i>transintestinal cholesterol efflux</i>)
TG	triglycéride
TGF- β	facteur de croissance transformant β (<i>transforming growth factor β</i>)
TLR	Récepteur de type <i>Toll</i> (<i>Toll-Like Receptor</i>)
TMD	domaine transmembranaire (<i>transmembrane domain</i>)
TNF- α	facteur de nécrose tumorale- α (<i>tumor necrosis factor-α</i>)
TSP-1	thrombospondine-1
TSR	motif répétitif de type 1
Tyr	tyrosine
TZD	thiazolidinedione
VCAM	molécule d'adhérence des cellules vasculaires (<i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VEGF	facteur de croissance endothéliale vasculaire (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFR	récepteur du VEGF
VIH	Virus immunodéficient humain
VLA-4	<i>very late antigen-4</i>
VLDL	lipoprotéine de très faible densité (<i>very low density lipoprotein</i>)

Aux ailes qui me portent dans les moments de doute

Émile Bujold 1926-2010

Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mes directeurs de recherche : Huy Ong et Sylvie Marleau. Je vous remercie Sylvie de m'avoir initiée au monde de la recherche, de m'avoir transmis votre passion et de m'avoir épaulée tout au long de mes études supérieures. Je tiens aussi à remercier le Dr Huy Ong d'avoir bien voulu me donner une chance au sein de son laboratoire. Vous m'avez toujours dit que pour être compétitif dans le monde de la recherche, il faut avoir de bonnes idées... et des idées vous n'en avez pas manquées au cours des dernières années. Merci d'avoir partagé vos connaissances, de m'avoir guidée, et de m'avoir fait confiance pour réaliser mes projets avec une certaine liberté, même si parfois j'ai dû user de stratégie pour faire valoir mes idées.

J'aimerais aussi remercier les membres de mon jury: Marc Servant, Céline Fiset et Yves L. Marcel. Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ma thèse et surtout, merci de votre patience.

Je tiens aussi à remercier tous mes collègues de laboratoire avec qui j'ai passé de bons moments au cours des dernières années: Annie, Sanny, François, Christian, Mansouria, Marianne, Patrick et tous les membres du laboratoire de Sylvie Marleau. Merci à Valérie qui est non seulement une collègue de laboratoire et une voisine de bureau, mais qui est devenue une bonne amie au cours des dernières années. Un gros merci également à Petra, notre assistante de recherche, pour son travail efficace.

Un merci tout spécial à David Rhainds! Ton passage au laboratoire aura fait une grande différence dans mon cheminement universitaire, plus que tu ne peux l'imaginer. Merci pour toutes ces discussions, scientifiques ou non, merci d'avoir partagé ton savoir et de m'avoir poussée à être une meilleure scientifique. Tu m'as permis d'avoir un peu plus confiance en mes compétences de future chercheuse. Merci encore!!!

Je voudrais aussi remercier mes parents pour leur soutien et leurs encouragements. C'est à vous que je dois d'être qui je suis aujourd'hui. Merci à ma soeur Karine qui m'a encouragée et qui a su m'écouter dans les moments difficiles.

Merci aussi à tous mes amis. Votre soutien a été précieux à mes yeux. Merci d'avoir trouvé les bons mots pour m'encourager à persévérer quand j'étais découragée. À tous ceux qui ne croyaient pas qu'un jour j'arrêterais d'étudier: le dépôt de cette thèse le confirme... c'est terminé!!! Je suis prête pour un nouveau départ et de nouveaux défis... mais qui sait, cela impliquera peut-être de prendre des cours et de me remettre le nez dans les livres.

Je ne pourrais oublier les deux hommes de ma vie qui ont contribué grandement à l'aboutissement de ce travail. Je te remercie Éric de tes encouragements, de ta patience, de ton soutien moral et financier, et de m'avoir endurée dans les moments plus difficiles, surtout dans les derniers mois. Merci d'être toujours là, mais plus important encore, merci de m'aimer comme je suis et de toujours avoir cru en moi. Mon petit rayon de soleil, ma gribouille, mon petit loup... Lukas, je te remercie d'être toi, un petit garçon plein de vie avec un regard pétillant et un sourire qui fait craquer les coeurs. Merci d'illuminer même les journées les plus grises. Maman t'aime gros comme... ça!!! Merci à vous deux qui redéfinissez chaque jour ma notion du bonheur.

Pour terminer, j'aimerais prendre ces quelques lignes pour rendre un petit hommage à une personne qui est parti au cours de l'écriture de cette thèse. À toi grand-papa, je te remercie d'avoir toujours été là et de m'avoir transmis tes valeurs. J'aurais aimé que tu sois là...

Un gros merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de cette thèse.

Chapitre 1 et 2: Introduction générale

1 Le récepteur éboueur de type B: le CD36

Le CD36 est un récepteur membranaire intégral qui fait partie de la grande famille des récepteurs éboueurs ou scavengers. Cette famille de récepteurs transmembranaires comprend plusieurs sous-familles de récepteurs qui présentent une grande variété structurelle incluant, entre autres, les récepteurs scavengers de classes A (SR-A), dont SR-AI, SR-AII et MARCO (*macrophage receptor with collagenous structure*) et les récepteurs scavengers de classe B (SR-B), qui incluent, outre notre récepteur d'intérêt CD36, CLA-1 (ou SR-BI chez la souris), LIMP-2 (*lysosomal integral membrane protein-2*) aussi appelé SR-BII, Emp et Croquemort. D'autres récepteurs scavengers sont aussi connus dont LOX-1 (*lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor*) et CD68 (macrosialine). De façon générale, les récepteurs scavengers sont impliqués dans l'internalisation de certains ligands, dans l'adhésion cellulaire ainsi que dans le transfert d'acides gras de part et d'autre de la membrane plasmique. Le CD36 a d'abord été identifié sur la membrane des plaquettes sanguines comme étant la glycoprotéine IV (gpIV) (Tandon *et al.*, 1989a; Tandon *et al.*, 1989b). Quelques années plus tard, des études ont montré que le CD36 était aussi un récepteur pour les lipoprotéines modifiées exprimé par les monocytes/macrophages (Endemann *et al.*, 1993) et un transporteur pour les acides gras au niveau des adipocytes (Abumrad *et al.*, 1993). Le CD36 est aussi connu sous l'appellation FAT/CD36 (translocase d'acide gras), SCARB3, GP88 et gpIIIb. Il est exprimé par une grande variété de cellules, ce qui en fait un récepteur multifonctionnel jouant un rôle au niveau du système cardiovasculaire, le métabolisme des acides gras, l'angiogenèse et la biologie des plaquettes

sanguines, ainsi que dans différentes pathologies telles l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer et le diabète (Febbraio & Silverstein, 2007).

1.1 Structure du récepteur CD36

Le CD36 est localisé sur le chromosome 7q11.2 chez l'humain et sur les chromosomes 4 et 5 chez le rat et la souris, respectivement. La séquence des nucléotides prédit une protéine transmembranaire de 471 acides aminés ayant un poids moléculaire d'environ 53 kDa. Le gène CD36 est constitué de 15 exons, mais seulement une partie de l'exon 3, l'exon 4 à 13 et une partie de l'exon 14 codent pour la protéine CD36 (*Figure 1*) (Collot-Teixeira *et al.*, 2007; Rac *et al.*, 2007). Ce récepteur est constitué d'un large domaine extracellulaire qui possède six cystéines reliées par trois ponts disulfure ainsi que plusieurs sites de N-glycosylation qui lui confère une protection contre la protéolyse. Ces sites glycosylés entraînent une augmentation du poids moléculaire de la protéine à environ 88 plutôt que 53 kDa (Gruarin *et al.*, 2000; Hoosdally *et al.*, 2009). De plus, le domaine extracellulaire présente plusieurs domaines fonctionnels dont une poche hydrophobique située entre les acides aminés 184 et 204 qui lui permet d'interagir avec le feuillet externe de la membrane plasmique (*Figure 2*) (Greenwalt *et al.*, 1992). Le domaine extracellulaire est responsable de la liaison des ligands et contient des sites de liaison distincts pour les protéines contenant un domaine homologue à la thrombospondine-1 (TSP-1) (Pearce *et al.*, 1995) et les lipoprotéines oxydées, entre autres. En particulier, la séquence située entre les acides aminés 155 et 183 a été identifiée comme étant le site responsable de la liaison avec les lipoprotéines de faible densité oxydées (LDL_{ox}) (Puente Navazo *et al.*, 1996), les produits

de glycation avancée (AGE) (Ohgami *et al.*, 2001) et les sécrétines de l'hormone de croissance (GHRPs). La méthionine 169 a été identifiée comme le point de contact de l'hexaréline sur le CD36 (Demers *et al.*, 2004).

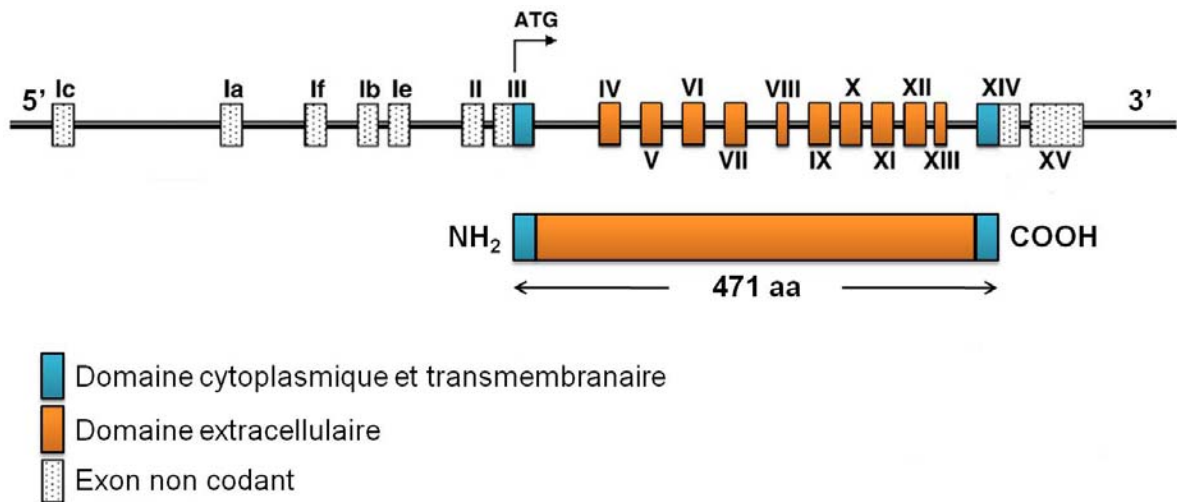


Figure 1. Représentation schématique du gène CD36

Le gène CD36 est constitué de 15 exons. La région non-transcrite en 5' est constituée de l'exon 1a, 1b, 1c, 1e, 1f, 2 et d'une partie de l'exon 3. Le restant de l'exon 3, les exons 4 à 13 et une partie de l'exon 14 codent pour la protéine CD36, tandis que le reste de l'exon 14 et l'exon 15 forment la région non-transcrite en 3' (Figure modifiée de (Collot-Teixeira *et al.*, 2007)).

D'autres domaines de liaison pour les LDLox ont été rapportés, notamment entre les acides aminés 28-93 et 120-155 (Pearce *et al.*, 1998). Il existe aussi deux domaines nommés CLESH (*CD36 LIMP-II Emp sequence homology*) qui sont impliqués dans la liaison et l'internalisation des cellules apoptotiques, et qui agissent de concert avec le complexe intégrine ($\alpha\text{v}\beta\text{3}$)/TSP-1 (Savill *et al.*, 1992; Navazo *et al.*, 1996; Dawson *et al.*, 1997; Simantov *et al.*, 2001). La protéine CD36 comporte aussi deux domaines

transmembranaires et deux petits domaines cytoplasmiques de sept à treize acides aminés, chacun caractérisé par la présence de cystéines palmitoylées aux positions 3, 7, 464 et 466 (*Figure 2*) (Tao *et al.*, 1996). La palmitoylation joue un rôle essentiel dans le positionnement du CD36 au niveau des cavéoles et des radeaux lipidiques (Febbraio & Silverstein, 2007). Les deux domaines cytoplasmiques, N- et C-terminal, sont nécessaires pour que le CD36 soit exprimé à la surface membranaire. Il a été montré que le domaine C-terminal joue un rôle important dans la liaison, l'internalisation et la dégradation des LDLox puisque la délétion du dernier acide aminé ou bien une modification des six derniers acides aminés du domaine cytoplasmique en C-terminal engendre une diminution de l'interaction entre le CD36 et le LDLox (Malaud *et al.*, 2002). De plus, il a été montré que l'activation du *nuclear factor kappa B* (NFκB) en réponse à l'activation du récepteur CD36 par les LDLox nécessite que le domaine cytoplasmique en C-terminal soit intact (Lipsky *et al.*, 1997). Plus récemment, l'importance des résidus Tyr₄₆₃ et Cys₄₆₄ au niveau de l'extrémité C-terminale a aussi été montrée dans la liaison du ligand au récepteur ainsi que dans la signalisation cellulaire (Stuart *et al.*, 2005a). McDermott-Roe *et al.*, ont, quant à eux, montré que contrairement au domaine cytoplasmique en C-terminal, le domaine cytoplasmique en N-terminal n'est pas essentiel à l'internalisation des LDLox par le CD36 (McDermott-Roe *et al.*, 2008).

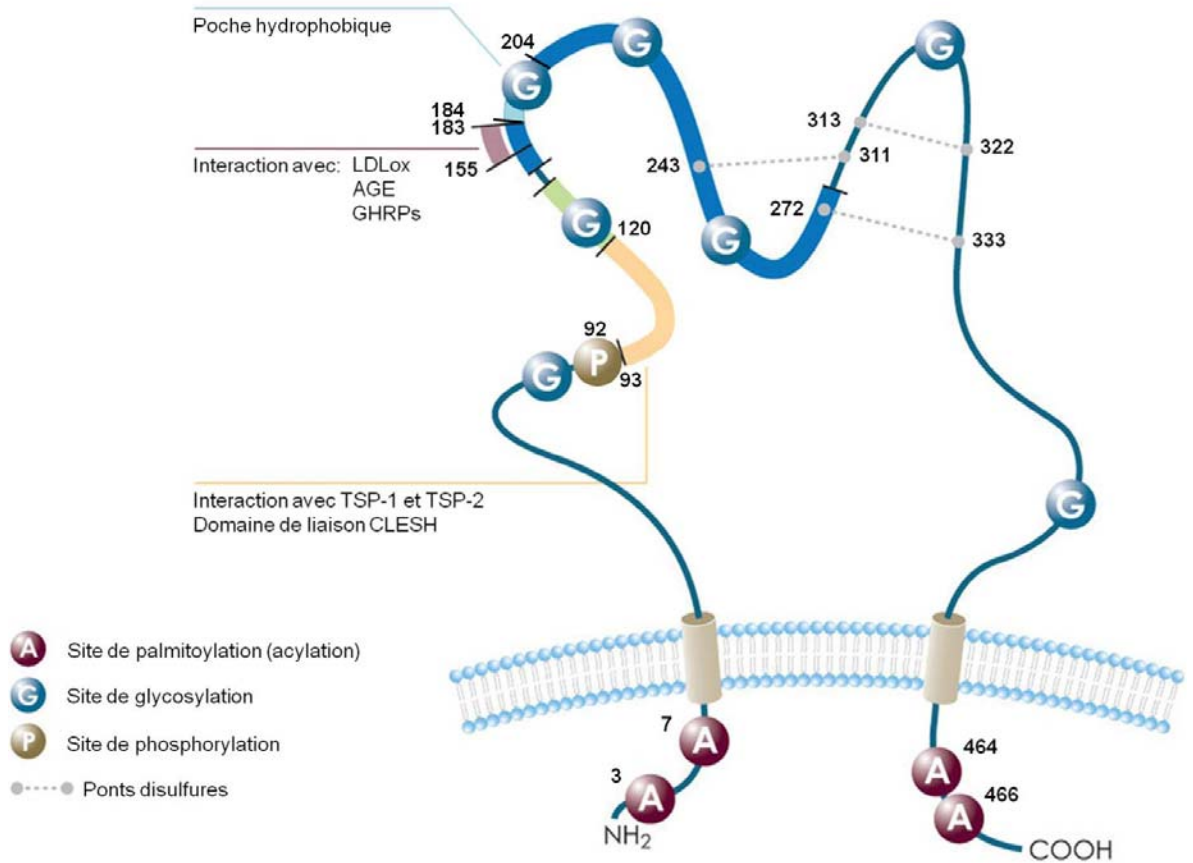


Figure 2. Structure du récepteur CD36

Le CD36 est un récepteur transmembranaire localisé dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique. Son large domaine extracellulaire contient trois ponts disulfures (Cys₂₄₃-Cys₃₁₁, Cys₂₇₂-Cys₃₃₃, et Cys₃₁₃-Cys₃₂₂), de multiples sites de N-glycosylation et différents domaines de liaison. Les deux petites queues cytoplasmiques contiennent des cystéines palmitoylées. La Tyr₄₆₃ et Cys₄₆₄ en C-terminal sont importantes pour la liaison des ligands et la cascade de signalisation intracellulaire (Figure inspirée de (Silverstein & Febbraio, 2009; Collot-Teixeira *et al.*, 2007)).

1.2 Distribution et régulation de l'expression du récepteur CD36

Le CD36 a d'abord été identifié par Bolin et al. sur la membrane des plaquettes (Bolin *et al.*, 1981). Par la suite, Swerlick et al. ont montré que le CD36 est présent au niveau des cellules endothéliales de la microvasculature, contrairement aux cellules endothéliales des gros vaisseaux sanguins (Swerlick *et al.*, 1992). Les monocytes, et plus particulièrement les macrophages expriment aussi le CD36, et cette expression est régulée à la hausse après la différenciation des monocytes en macrophages (Endemann *et al.*, 1993; Huh *et al.*, 1996). Le récepteur CD36, de par son rôle facilitateur de la translocation des acides gras, est aussi exprimé dans les adipocytes, le muscle cardiaque et les muscles squelettiques ainsi que sur la muqueuse intestinale où l'on retrouve différents niveaux d'expression selon la région intestinale. Le CD36 est principalement exprimé dans la partie proximale du petit intestin, incluant le duodénum et le jéjunum (Nassir *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2001a). Le récepteur est aussi exprimé au niveau des kératinocytes, des érythrocytes, des réticulocytes, ainsi qu'au niveau des cellules épithéliales mammaires et rénales, des cellules dendritiques, des cellules de la microglie et de l'épithélium pigmentaire rétinien (Febbraio *et al.*, 2001; Febbraio & Silverstein, 2007). Il a été montré que le CD36 peut aussi être exprimé au niveau des hépatocytes chez un modèle animal soumis à une diète riche en lipides (Koonen *et al.*, 2007; Inoue *et al.*, 2005), ainsi que dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) (Matsumoto *et al.*, 2000). Ainsi, le CD36 est exprimé dans une panoplie de

cellules et de tissus, ce qui peut expliquer, du moins en partie, les effets pléiotropes de ce récepteur.

La régulation de l'expression du récepteur CD36 (*Tableau 1*) a largement été étudiée dans les monocytes et les macrophages et quelques autres types cellulaires. L'expression du CD36 peut être régulée autant au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel que traductionnel et peut être modulée par l'adhérence et la différenciation cellulaire, ainsi que par divers médiateurs solubles ou par des récepteurs nucléaires, dont le principal est le *peroxisome proliferator-activated receptor* γ (PPAR γ) (Chen *et al.*, 2001b; Huh *et al.*, 1995; Huh *et al.*, 1996; Nicholson *et al.*, 2000; Prieto *et al.*, 1994; Tontonoz & Nagy, 1999; Tontonoz *et al.*, 1998).

Tableau 1. Régulation de l'expression du récepteur CD36

Inducteurs	Types cellulaires	Mécanisme d'action	Références
Adhésion	monocytes/macrophages	Agit au niveau transcriptionnel	(Prieto <i>et al.</i> , 1994; Huh <i>et al.</i> , 1995)
Différenciation	monocytes/macrophages	Agit au niveau transcriptionnel	(Huh <i>et al.</i> , 1996)
M-CSF et GM-CSF	monocytes/macrophages	différenciation des monocytes en macrophages	(Yesner <i>et al.</i> , 1996)
PMA	monocytes/macrophages	différenciation des monocytes en macrophages	(Yesner <i>et al.</i> , 1996)
IL-4	monocytes/macrophages	Activation de PKC, activation de la lipoxgénase et production de 15d-PGJ ₂	(Feng <i>et al.</i> , 2000; Yesner <i>et al.</i> , 1996; Huang <i>et al.</i> , 1999)
cholestérol cellulaire	monocytes/macrophages	Agit au niveau transcriptionnel	(Han <i>et al.</i> , 1999)
LDL native	monocytes/macrophages	Agit au niveau transcriptionnel	(Han <i>et al.</i> , 1997)
LDLox (9-HODE et 13-HODE)	monocytes/macrophages	Activation du PPAR γ	(Nagy <i>et al.</i> , 1998; Han <i>et al.</i> , 1997; Feng <i>et al.</i> , 2000)
15-HETE	monocytes/macrophages	Augmentation de l'expression d'IL-4 et PPAR γ	(Huang <i>et al.</i> , 1999)

15d-PGJ ₂	monocytes/macrophages	Ligand naturel du PPAR γ et activation du PPAR γ	(Zuckerman <i>et al.</i> , 2000; Han & Sidell, 2002)
4-Hydroxynonénal (4-HNE)	monocytes/macrophages	Activation de la kinase p38 et de la 5-lipoxygénase	(Yun <i>et al.</i> , 2008; Yun <i>et al.</i> , 2009)
Insuline/glucose	adipocytes coeur/intestin monocytes	Agit au niveau traductionnel Activation de la voie PI3-K Activation de PPAR γ	(Griffin <i>et al.</i> , 2001; Chabowski <i>et al.</i> , 2004; Chen <i>et al.</i> , 2006; Sampson <i>et al.</i> , 2003; Yang <i>et al.</i> , 2007)
9-cis Acide rétinoïque all-trans Acide rétinoïque	monocytes/macrophages	Activation des récepteurs de l'acide rétinoïque RAR/RXR	(Langmann <i>et al.</i> , 2005; Wuttge <i>et al.</i> , 2001)
Thiazolidinediones (TZD)	monocytes/macrophages adipocytes muscles	Ligands synthétiques qui activent le PPAR γ	{4835;5685;5686;5687;5689}
Statines	monocytes/macrophages	Activation de COX-2 et production de 15d-PGJ ₂ Inhibe Rho GTPase	(Yano <i>et al.</i> , 2007; Ye <i>et al.</i> , 2007; Ruiz-Velasco <i>et al.</i> , 2004)
Inhibiteurs de protéases du VIH	monocytes/macrophages	Activation PPAR γ par PKC Inhibition du système ubiquitine-protéasome	(Dressman <i>et al.</i> , 2003; Hui, 2003; Munteanu <i>et al.</i> , 2004; Munteanu <i>et al.</i> , 2005)
Ligands synthétiques de RAR et RXR	monocytes/macrophages	Activation de RAR et RXR, indépendamment du PPAR γ	(Han & Sidell, 2002)
Ligands du FXR	Adipocytes	Activation PPAR γ	(Abdelkarim <i>et al.</i> , 2010)
Aspirine	monocytes/macrophages	diminution de PGE ₂	(Vinals <i>et al.</i> , 2005)
Celecoxib	monocytes/macrophages	Inhibition COX-2, cPLA ₂ menant à une diminution PGE ₂	(Anwar <i>et al.</i> , 2011)
Antagoniste récepteur AT1	Foie	Augmentation du récepteur PPAR α	(Rong <i>et al.</i> , 2010)
Agonistes PXR	Foie	Cible direct et activation du PPAR γ	(Zhou <i>et al.</i> , 2006; Zhou <i>et al.</i> , 2008; Zhou <i>et al.</i> , 2009)
Répresseurs	Types cellulaires	Mécanisme d'action	Références
LPS	monocytes/macrophages	NA	(Yesner <i>et al.</i> , 1996)
Dexaméthasone	monocytes/macrophages	NA	(Yesner <i>et al.</i> , 1996)
IL-10	monocytes/macrophages	Diminution expression PPAR γ	(Rubic & Lorenz, 2006)
TGF β 1 et β 2	monocytes/macrophages	Activation de MAPK qui phosphoryle et inactive PPAR γ	(Han <i>et al.</i> , 2000)

Statines	monocytes/macrophages plaquettes	Diminution de NFκB	(Pietsch <i>et al.</i> , 1996; Fuhrman <i>et al.</i> , 2002a; Han <i>et al.</i> , 2004; Puccetti <i>et al.</i> , 2005; Bruni <i>et al.</i> , 2005; Mandosi <i>et al.</i> , 2010)
α-tocophérol et autres anti-oxydants	monocytes/macrophages CMLV	Agit au niveau transcriptionnel Diminution production enzymatique 9 et 13-HODE Inhibition de Tyk2 Liaison au CD36 engendrant son internalisation	(Devaraj <i>et al.</i> , 2001; Fuhrman <i>et al.</i> , 2002b; Ricciarelli <i>et al.</i> , 2000; Venugopal <i>et al.</i> , 2004; Ozer <i>et al.</i> , 2006; Zingg <i>et al.</i> , 2010; Giesege <i>et al.</i> , 2010)
H ₂ S (Sulfide d'hydrogène)	monocytes/macrophages	Inhibition de ERK1/2	(Zhao <i>et al.</i> , 2011)
PGE ₂	monocytes/macrophages	Indéterminé	(Chuang <i>et al.</i> , 2010)
Dérivés opioïdes	monocytes/macrophages	Indéterminé	(Chiurchiu <i>et al.</i> , 2011)
IL-33	monocytes/macrophages	répression transcriptionnelle ou activation de AP-1 et NFκB	(McLaren <i>et al.</i> , 2010)
Vitamine D	monocytes/macrophages	Diminution phosphorylation JNK, diminution PPARγ	(Riek <i>et al.</i> , 2010; Oh <i>et al.</i> , 2009)
HDL, HDLox	monocytes/macrophages	Activation PPARγ (p38-dépendant)	(Han <i>et al.</i> , 2002; Ren <i>et al.</i> , 2010; Carvalho <i>et al.</i> , 2010)
Ligands du FXR	monocytes/macrophages	Indéterminé	(Mencarelli <i>et al.</i> , 2009; Mencarelli <i>et al.</i> , 2010)
Inhibiteurs de protéases du VIH (chez femelles)	monocytes/macrophages	Oestrogène prévient activation de PKC	(Allred <i>et al.</i> , 2006)

La régulation de l'expression du CD36 passe aussi par la redistribution d'un pool intracellulaire du récepteur vers la membrane plasmique (Huh *et al.*, 1996; Luiken *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2002). Dans le muscle, le CD36, qui est emmagasiné au niveau de vésicules endosomales, est acheminé vers la membrane plasmique en réponse à une contraction ou après une stimulation par l'insuline (Luiken *et al.*, 2003; Jeppesen *et al.*, 2011; Luiken *et al.*, 2002; Van Oort *et al.*, 2008). Il est à noter que chez les sujets souffrant

d'obésité et de résistance à l'insuline, le CD36 est retenu à la surface cellulaire en conséquence d'un dérèglement du recyclage du CD36 entre le compartiment intracellulaire et la membrane plasmique. Cette situation entraîne une accumulation de triacylglycérol dans le muscle conduisant à une utilisation préférentielle des acides gras comme substrat énergétique au détriment du glucose (Bonen *et al.*, 2004; Coort *et al.*, 2004).

1.3 Les ligands du récepteur CD36

1.3.1 Ligands endogènes

Le CD36 est un récepteur qui se lie à une multitude de ligands endogènes. Parmi ces ligands, on retrouve la TSP-1 (Asch *et al.*, 1987), les acides gras à longue chaîne (AGLC) (Abumrad *et al.*, 1993), les LDLox (Endemann *et al.*, 1993), les lipoprotéines de haute densité (HDL), LDL et lipoprotéines de très faible densité (VLDL) natifs (Calvo *et al.*, 1998), le collagène I et IV (Tandon *et al.*, 1989a), les segments externes des photorécepteurs (Ryeom *et al.*, 1996), les phospholipides anioniques (Rigotti *et al.*, 1995), les cellules apoptotiques (Ren *et al.*, 1995) et les érythrocytes infectés avec le *Plasmodium falciparum* (Oquendo *et al.*, 1989).

1.3.2 Ligands exogènes: les sécrétines de l'hormone de croissance comme ligands exogènes du CD36

Les sécrétines de l'hormone de croissance (HC) ou GHRPs ont été synthétisées en 1977 alors que Bowers *et al.* développaient une série de petits peptides synthétiques dérivés de la

méthionine-enképhaline à la recherche de composés ayant la propriété de stimuler la sécrétion de l'HC. Bowers et al. ont montré *in vitro* que la D-Trp2-Met-enképhaline stimule faiblement la sécrétion de l'HC par les cellules hypophysaires, tout en étant dépourvue d'activité opiacée (Bowers *et al.*, 1984). Des études ultérieures ont permis la synthèse d'hexapeptides tel que le GHRP-6 (His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂), un puissant sécrétagogue de l'HC tant chez les modèles expérimentaux que chez l'homme. Le GHRP-6 a servi de prototype pour la synthèse d'autres analogues variant de trois à sept résidus, dont l'heptapeptide GHRP-1 (Ala-His-D-beta-NaI-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂) et l'hexapeptide GHRP-2 (D-Ala-D-beta-NaI-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂). Les effets de ces peptides synthétiques sont médiés par le récepteur de la ghréline, un récepteur à sept passages transmembranaires couplé à une protéine G, appelé récepteur des sécrétagogues de l'HC de type 1a (GHS-R1a) (Bowers, 1998).

En 1994, Deghenghi et al. ont synthétisé un analogue métaboliquement plus stable des GHRPs en substituant, dans la structure du GHRP-6 (*Figure 3*), la Trp par le 2-méthyl-Trp, donnant ainsi naissance à l'hexaréline (His-D-2-méthyl-Trp-Ala-Trp-D-Phe-Lys-NH₂). L'hexaréline est un peptide synthétique qui lie, comme ces prédécesseurs, le récepteur GHS-R1a, mais qui a aussi la capacité de lier le récepteur CD36 (Bodart *et al.*, 1999; Bodart *et al.*, 2002). Les études initiales chez un modèle de cœur isolé ont montré que l'hexaréline induit une vasoconstriction coronaire de façon dépendante de la dose et que cet effet n'est pas observé chez les souris déficientes en CD36 (Bodart *et al.*, 2002). De plus, des études ont montré que l'hexaréline se lie à un domaine de liaison qui chevauche le

domaine de liaison des LDLox sur le récepteur CD36 (Demers *et al.*, 2004) et que l'hexaréline induit des effets anti-athérosclérotiques (Avallone *et al.*, 2005). Le EP 80317 (Haic-D-2-methyl-Trp-D-Lys-Trp-D-Phe-Lys-NH₂), un analogue de l'hexaréline, est un ligand du récepteur CD36 qui, contrairement à l'hexaréline, ne se lie pas au GHRH-1a (Demers *et al.*, 2004). Dans le cadre de cette thèse, nous avons caractérisé les effets anti-athérosclérotiques du EP 80317 chez un modèle de souris déficientes en apolipoprotéine E (apoE) (Chapitre 3).

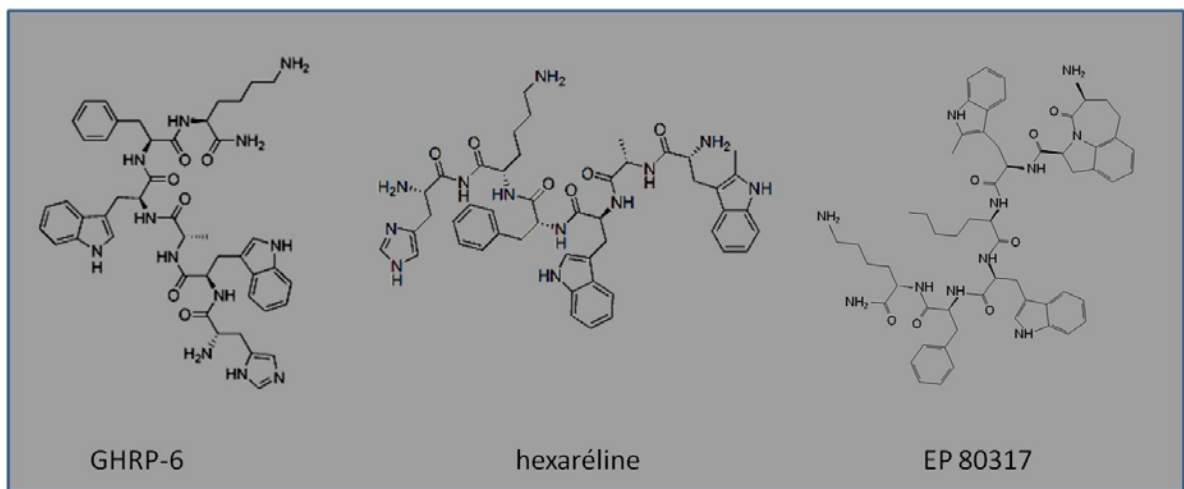


Figure 3. Structure des sécrétines de l'hormone de croissance

1.4 Rôle du récepteur CD36 dans le métabolisme lipidique

1.4.1 Le CD36: un récepteur-clé dans le transport des acides gras

Le transport des acides gras peut se faire par diffusion passive à travers la membrane plasmique, cependant il y a plusieurs évidences qui montrent que les acides gras traversent la membrane par transport facilité grâce à des protéines membranaires comme le FAT/CD36, la protéine de liaison des acides gras (FABP) et la protéine de transfert des acides gras (FATP) (Ehehalt *et al.*, 2006; Su & Abumrad, 2009). Le transporteur FAT/CD36, l'homologue murin du CD36 humain, joue un rôle important dans le transport et le métabolisme des acides gras à longues chaînes dans les adipocytes et les muscles cardiaque et squelettique. Le mécanisme précis du transport des acides gras à travers la membrane plasmique reste à déterminer; cependant différents modèles, dans lesquels le FAT/CD36 joue un rôle-clé, ont été proposés: 1) le FAT/CD36, seul ou de concert avec la FABP membranaire (FABPpm), pourrait concentrer les acides gras à la membrane plasmique favorisant leur diffusion passive ou 2) transporter directement les acides gras à travers la membrane dans le cytosol, où les acides gras vont se lier à une FABP cytosolique (FABPc); 3) le FAT/CD36 pourrait servir de récepteur pour les acides gras et ainsi les acheminer à proximité des transporteurs FATP1 et FATP6 pour être internalisés (Schwenk *et al.*, 2010; Schwenk *et al.*, 2008) (*Figure 4*). Dans ces tissus riches en FAT/CD36, le récepteur est emmagasiné dans des vésicules intracellulaires formées à partir des endosomes de recyclage, et est transloqué à la membrane plasmique en réponse à l'insuline ou à une

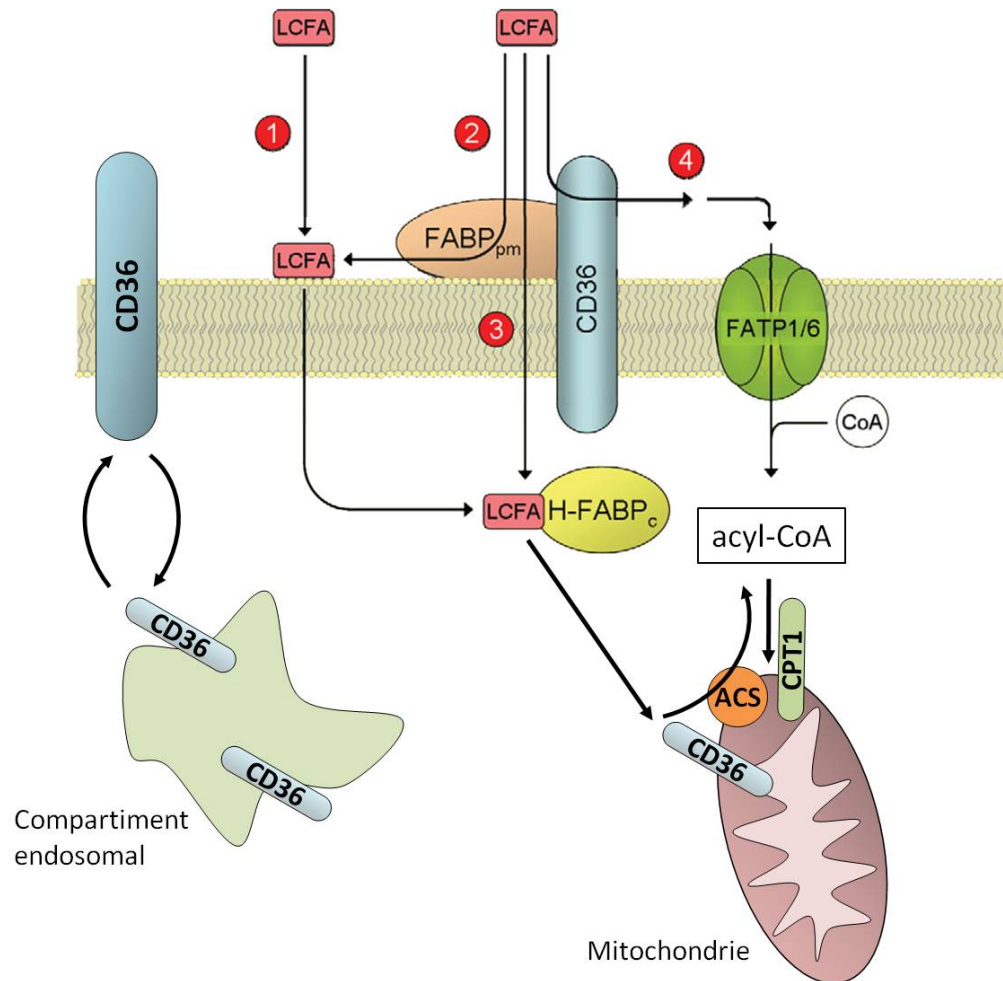


Figure 4. Transport des acides gras par le récepteur CD36

Comme le mécanisme exact du transport transmembranaire des acides gras à longues chaînes (AGLC ou LCFA, en anglais) est encore inconnu, différents modèles ont été proposés. (1) Compte tenu de leur caractère hydrophobe, les LCFA pourraient traverser la membrane cytoplasmique par diffusion passive. Cependant, l'internalisation des LCFA dépend en grande partie du récepteur CD36, mais il n'est pas spécifié si (2) le CD36, seul ou conjointement avec la FABP_{pm}, concentre les LCFA à la surface cellulaire pour favoriser la diffusion passive, ou si (3) le CD36 transporte activement les LCFA à travers la membrane plasmique. (4) Le CD36 pourrait également servir de récepteur pour les LCFA et les acheminer à proximité des transporteurs FATP1 et FATP6 ce qui pourrait faciliter le transport des LCFA. Le CD36 est aussi exprimé au niveau de la mitochondrie où il joue un rôle dans l'oxydation des acides gras, de concert avec la carnitine palmitoyltransférase (CPT-1) (Figure modifiée de (Schwenk *et al.*, 2008).

contraction musculaire, où il intervient alors dans l'internalisation des acides gras (Bonen *et al.*, 2007; Schwenk *et al.*, 2008). Campbell *et al.* ont montré que le FAT/CD36 est aussi exprimé au niveau des mitochondries et joue un rôle dans l'oxydation des acides gras, de concert avec la carnitine palmitoyltransférase I (CPT I) (Campbell *et al.*, 2004). L'apparition des modèles de souris qui surexpriment ou qui sont déficientes en FAT/CD36 a permis de confirmer le rôle crucial de ce transporteur dans le transport des acides gras.

Une surexpression du FAT/CD36 dans le muscle entraîne une augmentation de l'oxydation des acides gras après une contraction et diminue les niveaux de lipides plasmatiques chez la souris (Ibrahimi *et al.*, 1999). À l'opposé, une déficience en FAT/CD36 diminue significativement le captage et le métabolisme des acides gras dans les muscles cardiaque et squelettique ainsi que dans les adipocytes et engendre une élévation des taux d'acides gras libres non estérifiés (AGNE) et des triglycérides plasmatiques, ainsi qu'une résistance à l'insuline au niveau hépatique (Hajri & Abumrad, 2002; Goudriaan *et al.*, 2003). Le CD36 est aussi impliqué dans la perception sensorielle. Chez les rongeurs, le CD36 est exprimé à la membrane apicale des cellules sensorielles situées dans les papilles linguales entraînant une préférence pour les aliments riches en lipides. La prise de nourriture riche en acides gras, comme l'acide linoléique, transmet un signal aux fibres nerveuses conduisant à la perception du goût et à la sécrétion d'acides biliaires, préparant ainsi le système digestif pour l'absorption des acides gras.

De plus, le FAT/CD36 est fortement exprimé dans le petit intestin (Nassir *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2001a). Le FAT/CD36 est principalement localisé au niveau de la membrane apicale des entérocytes, sur les 2/3 supérieurs des villosités. L'expression du FAT/CD36 et sa localisation au niveau intestinal suggère un rôle dans l'absorption des lipides mais cette fonction a longtemps été controversée. Chez les souris déficientes en FAT/CD36, il n'y a pas de modification significative de l'absorption intestinale des acides gras. Cependant, une déficience en FAT/CD36 diminue l'absorption intestinale des acides gras à très longues chaînes (AGTLC) chez les souris sous diète à haute teneur en gras (Drover *et al.*, 2008). De plus, l'ablation du FAT/CD36 engendre une diminution de la sécrétion des chylomicrons au niveau de l'intestin proximal et la production de chylomicrons de plus petites tailles avec moins d'apoB-48, en plus d'entraîner une diminution de la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides due à l'inhibition de la lipase endothéliale (Drover *et al.*, 2005; Goudriaan *et al.*, 2005; Nauli *et al.*, 2006). Ces données indiquent donc que le FAT/CD36 joue un rôle dans la formation et la sécrétion des chylomicrons mais ne montrent pas que le FAT/CD36 peut contribuer à l'absorption des acides gras au niveau intestinal. Récemment, Nassir *et al.* ont montré que le FAT/CD36 est impliqué dans le captage du cholestérol et des acides gras dans l'intestin proximal (voir section 2.2.3.2.1.). Ils ont observé une perturbation de la sécrétion des lipoprotéines par les entérocytes ainsi qu'une diminution de la production des apoB48 et apoA-IV. De plus, une augmentation de la protéine *Niemann Pick C1 like 1* (NPC1L1) est observée chez les souris déficientes en FAT/CD36 suggérant une coopération entre les deux protéines dans l'absorption du cholestérol (Nassir *et al.*, 2007).

1.4.2 Le CD36 : un récepteur-clé dans l'internalisation des lipoprotéines oxydées et le développement de l'athérosclérose

Le CD36 exprimé à la surface des macrophages joue un rôle dans l'internalisation des lipoprotéines modifiées et dans le développement des lésions athérosclérotiques. Des études ont montré que la délétion du gène CD36 chez les souris déficientes en apoE nourries avec une diète enrichie en cholestérol et en lipides entraînent une réduction de 80% des lésions athérosclérotiques associée à une diminution de l'internalisation des LDLox dans les macrophages (Febbraio *et al.*, 1999; Febbraio *et al.*, 2000). Pour bien comprendre les effets anti-athérosclérotiques des ligands du récepteur CD36, il est essentiel de bien comprendre les différentes étapes du développement de l'athérosclérose.

1.4.2.1 L'athérosclérose et ses différentes théories

Les maladies cardiovasculaires sont, de loin, la principale cause de morbidité et de mortalité dans les pays industrialisés. Même si la mortalité due aux maladies cardiovasculaires a diminué d'environ 40% au cours des dernières décennies, Statistique Canada a rapporté en 2008 que ces maladies étaient responsables de près du tiers des décès au Canada (Statistique Canada, CANSIM, <http://www.cansim2.statcan.gc.ca>). Malheureusement, la prévalence des maladies cardiovasculaires est susceptible d'augmenter dans les prochaines années en raison d'un mode de vie de plus en plus sédentaire et du nombre croissant de personnes atteintes d'obésité et du diabète de type 2 (Genest *et al.*, 2009).

Vers la fin des années 50, l'organisation mondiale de la santé (OMS) a défini l'athérosclérose comme étant «une association variable de remaniements de l'intima des artères consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts de calcium, le tout accompagné de modifications de la média» (OMS, 1958, rapport no. 143, Genève). Le processus pathologique de l'athérosclérose est caractérisé par l'accumulation de lipides dans la paroi artérielle qui engendre une cascade de phénomènes complexes menant à la formation des lésions athérosclérotiques (Lusis, 2000). Les lésions de la paroi artérielle se développent plus particulièrement aux sites où le flux sanguin est perturbé et aux endroits où la rhéologie change, surtout au niveau des bifurcations des vaisseaux (Woollard & Geissmann, 2010). Les infarctus du myocarde sont, dans la majorité des cas, une conséquence de l'obstruction d'un vaisseau après la rupture ou l'érosion d'une plaque athéromateuse et la formation subséquente d'un thrombus (Lusis, 2000).

L'athérosclérose est une maladie chronique et multifactorielle qui progresse lentement chez l'homme. Son développement est complexe et peut être aggravé par différents facteurs, entre autres le tabagisme, l'hyperlipidémie, l'hyperglycémie, le manque d'activité physique et certains facteurs génétiques. Parmi les différentes théories de l'athérogenèse, le pathologiste Rudolf Virchow a proposé, dès 1856, la théorie selon laquelle les lipoprotéines plasmatiques sont directement absorbées à travers l'endothélium conduisant au dépôt des esters de cholestérol dans la paroi vasculaire (Virchow, 1856). En 1913, la théorie de l'infiltration lipidique est appuyée par les travaux d'Anischkow et ses collaborateurs

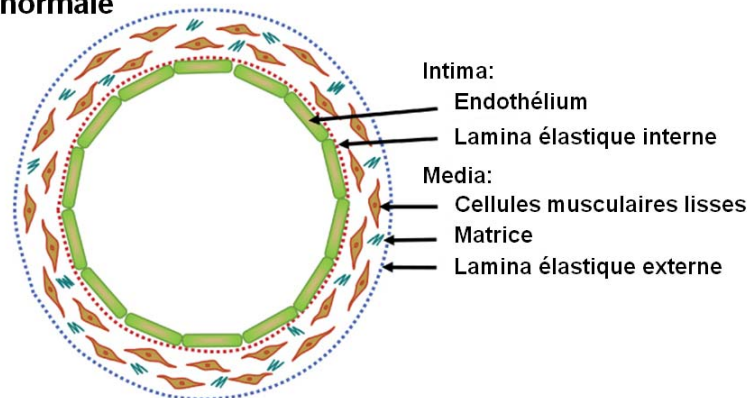
(Anitschkow & Chalатов, 1913), mettant en évidence l'importance du cholestérol dans le développement de l'athérosclérose chez le lapin. Cette théorie privilégie le rôle du cholestérol dans le développement des lésions athérosclérotiques, mais ne peut expliquer en totalité l'athérogenèse. Dans les années 1850, Virchow avait aussi émis l'hypothèse qu'un dommage à l'endothélium pouvait être à l'origine de l'infiltration des lipides. Se basant sur cette hypothèse, Russel Ross a proposé en 1977 la théorie de la «réponse à l'effraction endothéliale» qui explique qu'une lésion endothéliale serait le *primum movens* de l'athérosclérose (Ross *et al.*, 1977). Cependant, cette théorie s'est avérée inexacte puisque l'endothélium conserve son intégrité structurale au cours du développement de la pathologie mais présente un état inflammatoire. C'est ainsi que vers la fin des années 80, différentes études permettent d'affirmer que l'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique (Ross, 1999; Shi *et al.*, 2000) et que l'oxydation des LDL serait à l'origine de cette réaction inflammatoire (Steinberg *et al.*, 1989). Ces différentes théories ont en commun un rôle pathogénique des lipoprotéines, une fois oxydées, dans la formation des cellules spumeuses.

1.4.2.2 Les quatre stades de l'athérosclérose

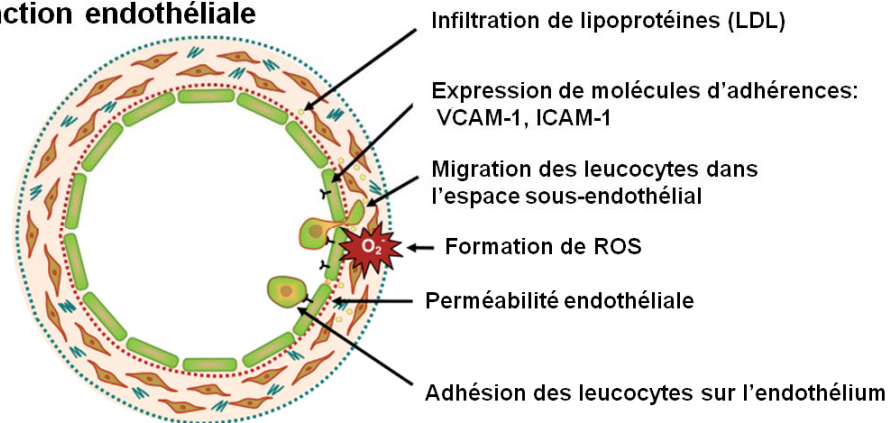
Les macrophages participent à toutes les étapes du développement de l'athérosclérose, de la formation des cellules spumeuses au développement de la plaque athéromateuse et à sa potentielle complexification et rupture. La séquence d'événements couramment retenue pour expliquer l'initiation et le développement des lésions athérosclérotiques implique, outre la rétention intimale des LDL et leur oxydation, le recrutement des monocytes

circulants favorisé par une augmentation de l'expression de molécules d'adhérence (point 1.4.2.2.2). Les monocytes se différencient en macrophages et les LDLox sont internalisés via les récepteurs scavengers, principalement SR-A et CD36. Une accumulation d'esters du cholestérol dans les macrophages entraîne la formation de cellules spumeuses, et leur accumulation se traduit visuellement par la formation des stries lipidiques. La lésion progresse par la prolifération et la migration des CMLV de la média vers l'intima, qui forment une chape fibreuse entourant le noyau lipidique et nécrotique, conduisant à la formation d'une plaque stable. L'activation des métalloprotéinases signe une déstabilisation de la plaque en entraînant un amincissement de la chape fibreuse et en favorisant la formation d'une fissure. Une rupture de la plaque entraîne la libération des constituants de la plaque qui, en contact avec les éléments sanguins, conduisent à l'activation et l'agrégation plaquettaire menant à la formation d'un thrombus (*Figure 5*).

A. Artère normale



B. Dysfonction endothéliale



C. Formation de stries lipidiques

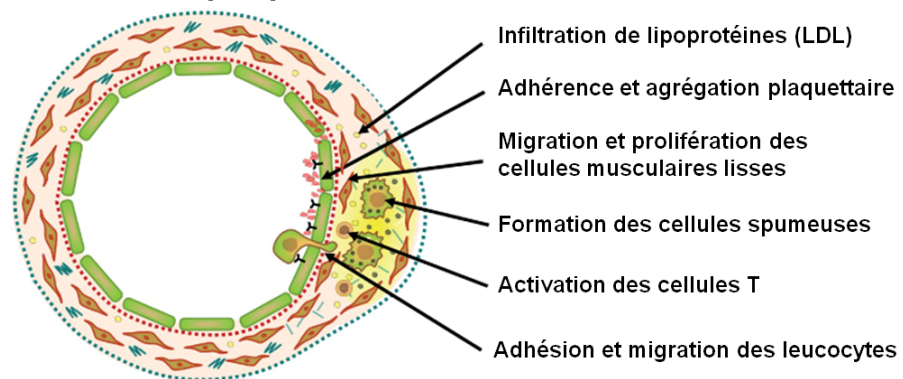
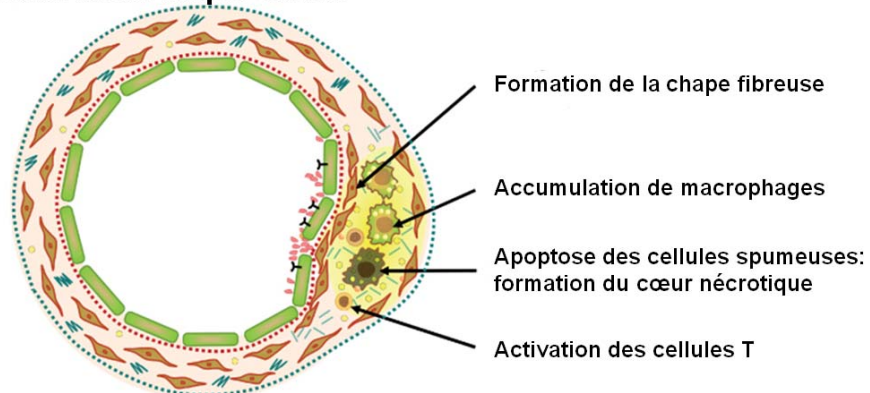


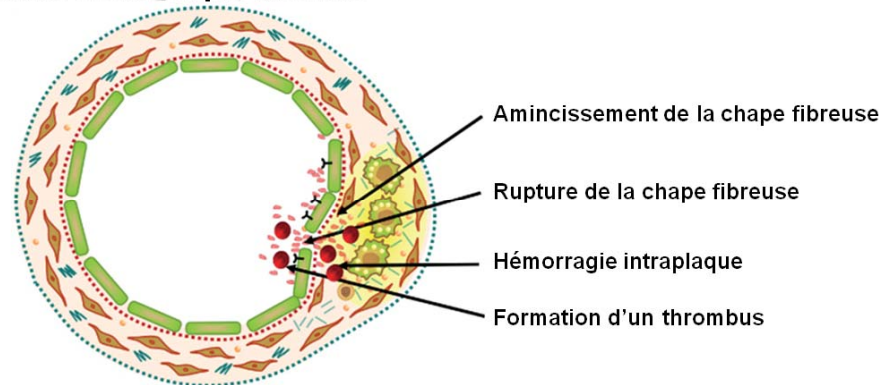
Figure 5. Différentes étapes du développement de l'athérosclérose

(Figure modifiée du livre *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms*. Édité par (Sarah Jane George & Jason Johnson, 2010)

D. Plaque athérosclérotique stable



E. Plaque athérosclérotique instable



F. Rupture de la plaque

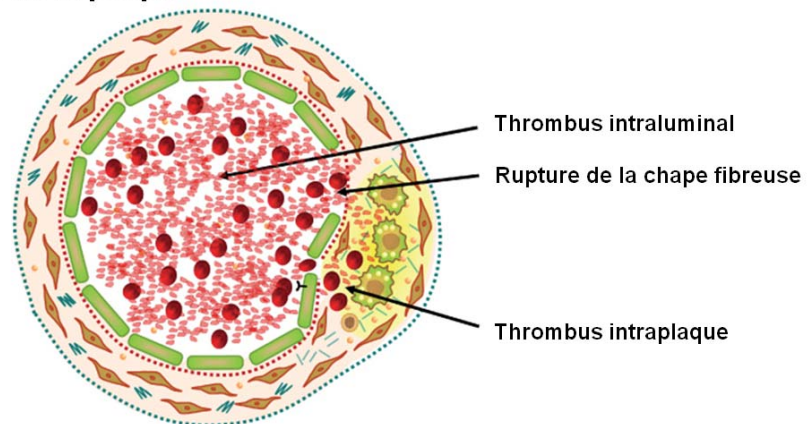


Figure 5 (suite). Différentes étapes du développement de l'athérosclérose

(Figure modifiée du livre *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms*. Édité par (Sarah Jane George & Jason Johnson, 2010).

1.4.2.2.1 La dysfonction endothéliale

L'endothélium est une couche unicellulaire constituée de cellules endothéliales qui tapissent la surface interne des vaisseaux sanguins (Luscher & Barton, 1997). Situé entre la circulation et les CMLV, l'endothélium joue un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire et la circulation sanguine en maintenant un équilibre entre la production d'agents vasodilatateurs comme l'oxyde nitrique (NO) et les prostaglandines, notamment la prostacycline, et la production de vasoconstricteurs comme l'endothéline-1 et l'angiotensine II (Widlansky *et al.*, 2003; Tabit *et al.*, 2010). De plus, au niveau de l'endothélium sain un équilibre est maintenu entre l'inhibition et la stimulation de la prolifération et la migration des CMLV, entre les médiateurs anti-inflammatoires et pro-inflammatoires, de même qu'entre les protéines anti-oxydantes et pro-oxydantes (Davignon & Ganz, 2004; Higashi *et al.*, 2009).

Outre l'hypercholestérolémie, différentes conditions incluant la formation de radicaux libres provenant de la fumée de cigarette, le diabète, l'obésité, le manque d'exercice ainsi que certains biomarqueurs dont des taux élevés de protéine C réactive (CRP), de phospholipase A₂ associée aux lipoprotéines (PLA₂-Lp) et d'homocystéine ont été associés à la dysfonction endothéliale. Cependant, les taux élevés de LDL demeurent le principal biomarqueur d'une dysfonction endothéliale, cette dernière résultant d'un déséquilibre entre la formation de NO et celle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Davignon & Ganz, 2004; Higashi *et al.*, 2009). Le stress oxydatif entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire ce qui facilite l'infiltration des LDL dans l'espace sous-endothélial (Lusis,

2000). Les LDL se lient aux protéoglycanes de la matrice extracellulaire par interaction ionique entre les charges positives de l'apoB100 et les charges négatives portées par les chaînes glycosaminoglycanes des protéoglycanes. La rétention des LDL facilite leur oxydation par les enzymes 12- et 15-LO, la myéloperoxydase (MPO), l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) sécrétées par les cellules endothéliales et les macrophages (Li & Glass, 2002; Babior, 2000). Les nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydases activées contribuent aussi à la formation des ROS. L'oxydation des LDL débute sur la portion lipidique et induit la formation de peroxydes et de composés aldéhydes comme le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (4-HNE) (Itabe, 2009) (*Figure 6*).

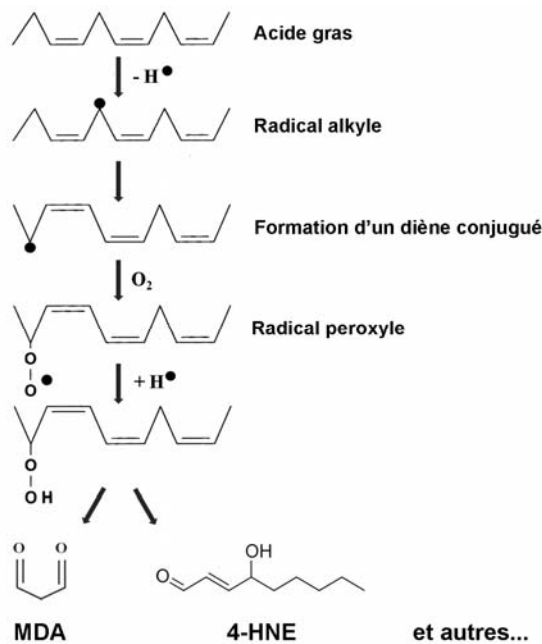


Figure 6. Peroxydation des lipides et génération de métabolites comme le malondialdéhyde et le 4-hydroxynonéal

(Figure traduite de (Young & McEneny, 2001))

Les aldéhydes peuvent se lier aux fragments peptidiques de l'apolipoprotéine B100 (apoB100) ce qui entraîne une augmentation la charge négative à la surface de l'apoB100 et augmente son affinité pour les récepteurs scavengers (Young & McEneny, 2001). Il existe deux grandes catégories de LDLox qui diffèrent structurellement et fonctionnellement. Les LDL oxydées minimalement (LDLmm) sont différents chimiquement des LDL natives mais ont toujours la capacité de lier le LDLR. Les LDLmm activent les cellules endothéliales et entraînent la sécrétion de médiateurs de l'inflammation, particulièrement le MCS-F et le *monocyte chemotactic protein* (MCP-1 ou CCL-2), ce dernier jouant un rôle dans le recrutement des monocytes circulants en agissant comme facteur chimiotactique (voir section 1.3.2.2.2.). Les LDL hautement oxydées (LDLox) se distinguent entre autres par une concentration de MDA plus importante et sont principalement impliquées dans la formation des cellules spumeuses (Stocker & Keaney, Jr., 2004) (voir section 1.3.2.2.2.).

1.4.2.2.2 La strie lipidique : du recrutement des monocytes à la formation des cellules spumeuses

Le recrutement sélectif des monocytes et lymphocytes dans la paroi vasculaire est orchestré par différentes molécules d'adhérence à la surface leucocytaire et endothéliale (*Figure 7*). La phase initiale du recrutement monocyttaire est caractérisée par la capture et le roulement des phagocytes mononucléés à la surface endothéliale par l'action des sélectine-P et -E induites à la surface endothéliale et de la sélectine-P à la surface leucocytaire. Ces sélectines vont se lier à la PSGL-1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), exprimée entre autres par les monocytes et les cellules endothéliales, et engendrer une adhérence lâche et

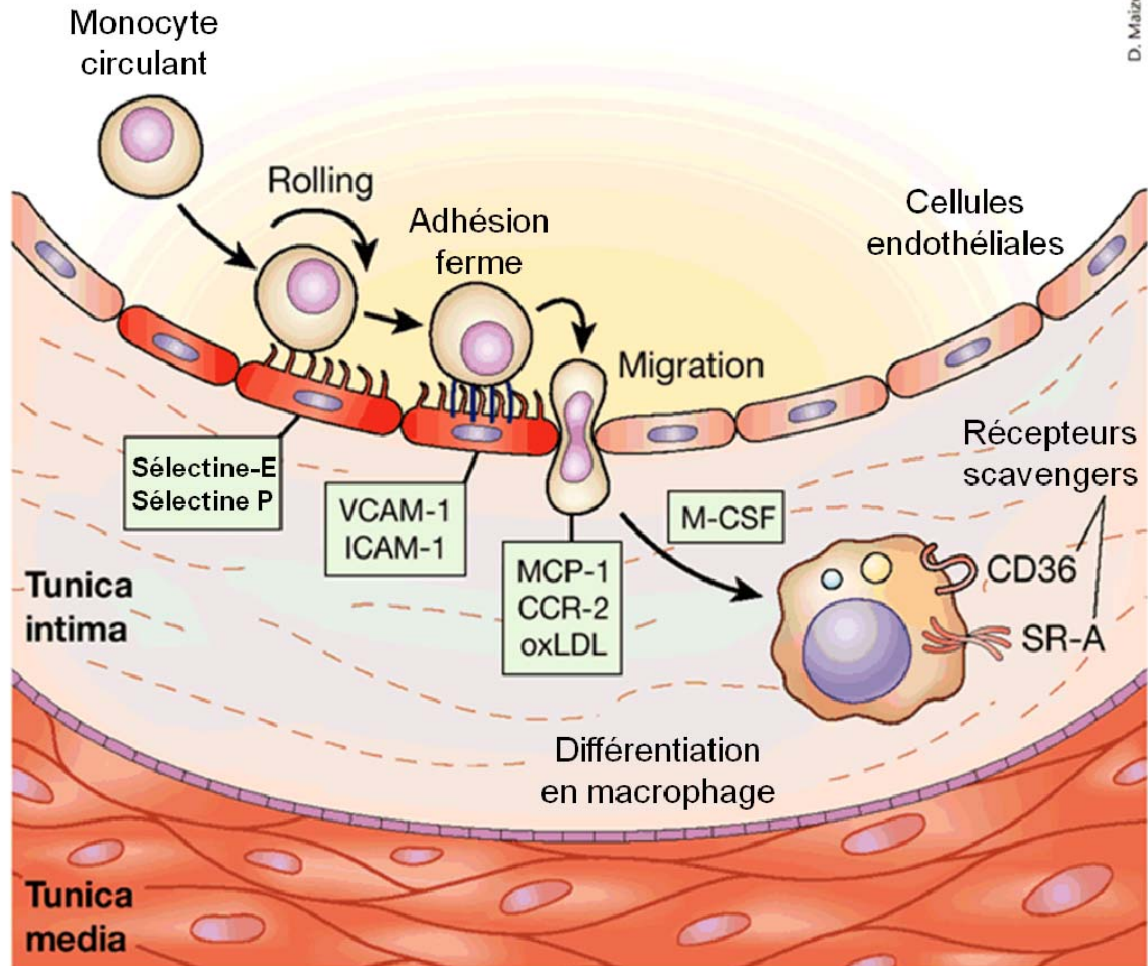


Figure 7. Mécanismes impliqués dans le recrutement des monocytes circulants dans l'espace sous-endothélial et dans la différenciation des monocytes en macrophages

En réponse à des signaux inflammatoires, les monocytes circulants se fixent aux molécules d'adhérence exprimées à la surface des cellules endothéliales. Les sélectines engendrent une adhésion lâche et transitoire tandis que les intégrines sont responsables de l'adhésion ferme, de la diapédèse et de la migration des monocytes dans l'espace sous-endothélial où ils se différencient en macrophages sous l'effet de différents facteurs locaux comme le M-CSF. La différenciation des monocytes en macrophages engendre une augmentation de l'expression des récepteurs *scavengers* à la surface cellulaire comme le SR-A et le CD36 (Figure traduite de (Li & Glass, 2002)).

transitoire (Huo & Xia, 2009). De même, l'intégrine β -1 nommée *very late antigen-4* (VLA-4) participe aussi à cette adhésion lâche en se liant à son ligand endothélial, la molécule d'adhérence intercellulaire de type 1 (VCAM-1) (Alon *et al.*, 1995). Cette adhésion lâche va permettre à différentes chimiokines, sécrétées par les cellules endothéliales activées et retenues à la surface endothéliale par une liaison aux chaînes glycosaminoglycanes des protéoglycanes, de se lier à leurs récepteurs sur les monocytes sanguins et d'induire leur activation. La liaison de MCP-1 et de la chimiokine *regulated on activation normal T-cell expressed and secreted* (RANTES ou CCL5) à leurs récepteurs respectifs, CCR2 et CCR5, va aussi déclencher une cascade de signalisation intracellulaire qui va induire l'activation des intégrines- β 1 et - β 2 à la surface des monocytes par une voie *inside-out* (Weyrich *et al.*, 1995). Les intégrines monocytaires VLA-4 et *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) vont subir un changement conformationnel qui permettra une liaison de haute affinité à leurs ligands de la superfamille des immunoglobulines, VCAM-1 et molécule d'adhérence cellulaire vasculaire de type 1 (ICAM-1) (Yusuf-Makagiansar *et al.*, 2002). Cette liaison active les intégrines par une voie *outside-in* et favorise leur oligomérisation (ou *clustering*). Les *clusters* d'intégrines activent des voies de transduction en s'associant à des protéines adaptatrices qui relient les intégrines au cytosquelette et à des kinases cytoplasmiques comme la *focal adhesion kinase* (FAK) ou la *proline-rich tyrosine kinase 2* (pyk2) qui, contrairement à la FAK, est exprimé dans les monocytes (Watson *et al.*, 2001).

L'autophosphorylation de pyk2 engendre des modifications au niveau du cytosquelette et entraîne une cascade de signalisation menant à l'activation de la voie des MAPK *extracellular signal-regulated kinase* (MAPK/ERK) (Watson *et al.*, 2001; Stuart *et al.*, 2007). Cette mosaïque de protéines de signalisation et du cytosquelette crée une interaction ferme entre l'endothélium et les monocytes. Les modèles animaux ont montré un rôle préférentiel du VCAM-1 endothélial dans la migration des monocytes circulants et la formation des stries lipidiques (Sakai *et al.*, 1997; Nakashima *et al.*, 1998). L'adhésion ferme des monocytes à la surface endothéliale est suivie de leur diapédèse et de leur transmigration dans l'espace sous-endothélial. La transmigration endothéliale implique une relocalisation de la cadhérine-endothéliale vasculaire (cadhérine-VE), qui joue un rôle-clé dans l'intégrité et la perméabilité de l'endothélium, et le passage des monocytes dans l'espace sous-endothélial (Shaw *et al.*, 2001; Aurrand-Lions *et al.*, 2002). De plus, les molécules d'adhérence jonctionnelles de type A (JAM-A), sont redistribuées à la surface apicale des cellules endothéliales suite à une réponse inflammatoire et interagissent avec l'intégrine LFA-1 des monocytes pour permettre leur transmigration (Ostermann *et al.*, 2002).

Après leur migration dans l'intima, la différenciation des monocytes en macrophages est régulée par le MCS-F. La différenciation induit une augmentation de l'expression, à la surface des macrophages, de plusieurs récepteurs *scavengers*, dont notre récepteur d'intérêt, le CD36 (Linton & Fazio, 2001; Boullier *et al.*, 2001; Febbraio *et al.*, 2001) (*Figure 8*).

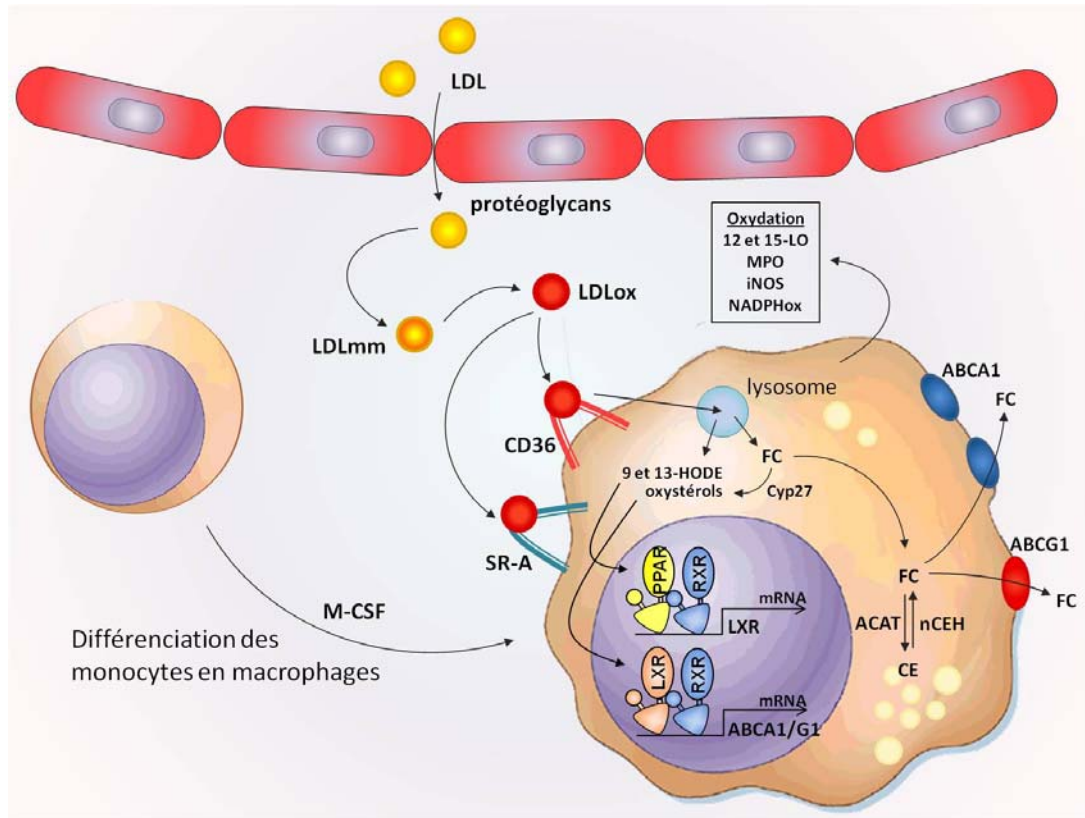


Figure 8. Différenciation des monocytes en macrophages et formation des cellules spumeuses

Les LDL migrent à travers la paroi artérielle et sont emprisonnées dans l'espace sous-endothélial où elles sont susceptibles d'être oxydées. Parmi les enzymes impliquées dans l'oxydation des LDL, on retrouve les LO, MPO, iNOS et la NADPH oxydase. La différenciation des monocytes en macrophages entraîne une augmentation de l'expression des récepteurs scavengers à la surface cellulaire. Les LDLox se lient au récepteur CD36 ou SR-A, sont internalisées par les macrophages et sont dégradées dans les lysosomes ce qui libère du cholestérol libre et des acides gras qui activent les récepteurs nucléaires PPAR γ et LXR α . Le cholestérol libre est estérifié par l'enzyme ACAT et est emmagasiné dans des gouttelettes lipidiques. Une accumulation excessive d'esters de cholestérol mène à la formation des cellules spumeuses. FC : cholestérol libre, CE : esters de cholestérol (Figure inspirée de (Li & Glass, 2002)).

Des études ont mis en évidence trois voies différentes pour l'internalisation du cholestérol dans le macrophage: le récepteur des LDL (LDLR), la macropinocytose ainsi que l'internalisation via les récepteurs *scavengers* (Miller *et al.*, 2010). Le LDLR, localisé dans les puits tapissés de clathrine, reconnaît l'apoB des LDL et le complexe ligand-récepteur est internalisé. Une fois dans le cytosol, la clathrine et le récepteur se détachent de la LDL et sont recyclés à la membrane, tandis que la LDL est dégradée (Brown & Goldstein, 1979; Issandou, 2006; Jeon & Blacklow, 2005). Cependant, des études ont montré que l'internalisation des lipoprotéines natives par le LDLR n'est pas suffisante pour former des cellules spumeuses puisque ce récepteur est soumis à une régulation négative. Une accumulation intracellulaire de LDL entraîne la séquestration du facteur de transcription *Sterol Regulatory Element Binding Protein* (SREBP) nécessaire à la synthèse du LDLR, ce qui diminue l'internalisation des LDL par le macrophage (Brown & Goldstein, 1999; Goldstein & Brown, 2009). De plus, les particules de LDL peuvent être internalisées par macropinocytose et entraîner la formation de cellules spumeuses indépendamment de la présence du LDLR (Kruth *et al.*, 2002). Ce phénomène semble être dépendant des GTPases de la famille des Rho et de la *phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K) (Kruth *et al.*, 2005). Finalement, l'internalisation des lipoprotéines modifiées oxydativement via les récepteurs *scavengers* est la principale source d'esters du cholestérol impliqués dans la formation des cellules spumeuses.

Une fois liées à un récepteur *scavenger*, les LDLox sont internalisées et acheminées vers les endosomes tardifs et les lysosomes où elles sont prises en charge par des lipases acides

(cholesteryl ester hydrolase) et des protéases (cathepsines) qui dégradent les LDLox et libèrent du cholestérol libre, des acides gras et des acides aminés. Le transport intracellulaire peut se faire par voie endosomale ou bien par voie non-vésiculaire, à l'aide de protéines de transport. Le cholestérol libre est soit recyclé à la membrane plasmique à l'aide de protéines de transport de la famille des *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR), soit libéré du compartiment endosomal par la protéine Niemann Pick C 1 (NPC1) et transporté au réticulum endoplasmique (Jessup & Kritharides, 2000; Soccio & Breslow, 2004; Ikonen, 2008). Le réticulum endoplasmique joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol cellulaire en régulant la biosynthèse et l'estérification du cholestérol. L'excédant de cholestérol libre, qui est toxique pour la cellule, est alors estérifié par l'enzyme acétyl-coenzyme A acétyltransférase 1 (ACAT-1) dans les macrophages et est emmagasiné dans des gouttelettes lipidiques (Warner *et al.*, 1995). Les esters de cholestérol contenus dans les gouttelettes lipidiques entrent alors dans un cycle d'hydrolyse et de ré-estérification continu impliquant la cholesteryl ester hydrolase neutre (nCEH) et l'ACAT-1 (Brown *et al.*, 1980). Un débalancement de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire engendre une accumulation excessive d'esters de cholestérol, entraînant la formation des cellules spumeuses et de stries lipidiques (*Figure 8*). Le seul moyen de maintenir un équilibre dans le macrophage est de se départir de l'excès du cholestérol en le transportant vers le compartiment plasmatique (voir section 2.2).

1.4.2.2.3 La lésion avancée ou complexe et la plaque fibreuse instable

Lors de l'évolution de la plaque d'athérosclérose, non seulement les macrophages s'engorgent de lipides mais ils prolifèrent et amplifient la réponse inflammatoire en sécrétant des facteurs de croissance et des cytokines pro-inflammatoires (Packard & Libby, 2008). Les lymphocytes T s'infiltrent aussi dans les lésions et sont responsables de la réponse immunitaire adaptative. Ces leucocytes et les cellules endothéliales activés libèrent des facteurs chimiotactiques et des facteurs de croissance comme le *platelet-derived growth factor* (PDGF) qui induisent la migration des CMLV de la média vers l'intima (Raines & Ferri, 2005). Les CMVL prolifèrent et sécrètent des composés de la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine et glycosaminoglycanes) menant à la formation de la chape fibreuse (*Figure 5D*).

À ce stade du développement de l'athérosclérose, une complication de la plaque athéromateuse peut mener à une hémorragie locale due à la rupture des micro-vaisseaux responsables de l'irrigation de la plaque. Cette hémorragie génère de la thrombine et active les cellules avoisinantes qui sécrètent alors des médiateurs inflammatoires comme les CD40L, RANTES et *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) et amplifie la réponse inflammatoire menant à des complications thrombotiques (Croce & Libby, 2007; Libby & Simon, 2001). Les risques encourus d'une rupture lors de l'évolution de la plaque dépendent entre autres du degré d'inflammation locale et des modifications de la matrice extracellulaire de la chape fibreuse (*Figure 5F*). L'activation des lymphocytes T au niveau des lésions athérosclérotiques entraîne la sécrétion locale d'interféron γ , ce qui inhibe d'une part la prolifération des CMVL et d'autre part leur capacité à synthétiser et à sécréter les

principaux constituants de la matrice extracellulaire de la chape fibreuse. De plus, les lymphocytes contribuent à l'activation des macrophages leur permettant de sécréter des enzymes protéolytiques de type collagénase, gélatinase et élastase qui ont la capacité de dégrader les constituants de la chape fibreuse (Mach *et al.*, 1997; Packard & Libby, 2008). L'amincissement de la chape fibreuse est une des caractéristiques des plaques instables qui sont plus propices à une rupture de la plaque conduisant ainsi à un accident thrombotique aigu (Naghavi *et al.*, 2003).

1.4.2.3 Rôle du récepteur CD36 dans l'athérosclérose

Le CD36 exprimé à la surface des macrophages joue un rôle important dans l'internalisation des LDLox. C'est la fraction lipidique des LDLox qui est à l'origine de leur interaction avec le récepteur CD36, contrairement à leur interaction avec les autres récepteurs *scavengers* qui se fait plutôt via la fraction protéique (Nicholson *et al.*, 1995). On retrouve sur le récepteur CD36 un domaine composé d'un groupement de trois lysines chargées positivement, lysine 164-166 (Kar *et al.*, 2008), qui permet l'interaction avec les LDLox qui sont chargées négativement (Doi *et al.*, 1994). Podrez et al. ont identifié une famille de phospholipides oxydés formés lors de l'oxydation des particules de LDL ou des phospholipides cellulaires, particulièrement la phosphatidylcholine (PC), contenant des acides gras polyinsaturés (PCoxCD36). Ces phospholipides oxydés, contenant un acide gras avec un groupement carbonyle insaturé présentant un groupe γ -hydroxy(ou oxo)- α,β , estérifié en position sn-2, sont responsables de la liaison de haute affinité avec le récepteur CD36 (*Figure 9*) (Podrez *et al.*, 2002a; Podrez *et al.*, 2002b). En plus du PCoxCD36,

d'autres phospholipides oxydés ont récemment été identifiés comme ligands potentiels des récepteurs scavengers de type B (*Figure 9*) (Gao *et al.*, 2010).

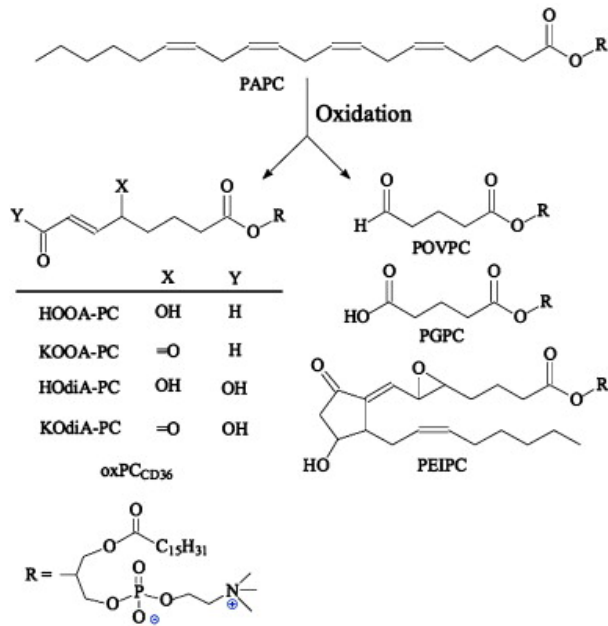


Figure 9. Schéma des différents phospholipides oxydés formés lors de l'oxydation du 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine (PAPC)

(Figure tirée de (Ashraf *et al.*, 2009)).

L'activation du récepteur CD36 peut engendrer d'une part, l'internalisation et la dégradation des LDLox qui entraînent la libération d'oxystérols et de dérivés d'acides gras oxydés comme 9 et 13-HODE, des ligands des récepteurs nucléaires LXR α et PPAR γ , respectivement (Brown *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2000; Janowski *et al.*, 1999; Nagy *et al.*, 1998). L'activation du PPAR γ par les 9- et 13-HODE s'accompagne d'une augmentation de la transcription du récepteur CD36, régulant ainsi à la hausse l'internalisation des

LDLox (Tontonoz *et al.*, 1998). Cependant, l'activation de ce récepteur nucléaire entraîne aussi la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (Tontonoz *et al.*, 1998; Nagy *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 2001; Chinetti *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2004). La signalisation intracellulaire résultant de l'activation du PPAR γ par le LDLox via le récepteur CD36 peut induire l'activation d'une PKC conventionnelle (Feng *et al.*, 2000). De plus, le CD36, en dépit de ses courts domaines intracytoplasmiques, engendre une cascade de signalisation lorsque le récepteur CD36 est activé par ses divers ligands. Cette cascade implique le recrutement, au domaine C-terminal intracytoplasmique du CD36, de tyrosine kinase de la famille des src (fyn, lyn et yes) (Moore *et al.*, 2002; Medeiros *et al.*, 2004; Jimenez *et al.*, 2000; Janabi *et al.*, 2000; Bamberger *et al.*, 2003). Leur activation conduit à l'activation de MAPK spécifiques, c-Jun N-terminal kinase (JNK) 1 et 2 (Rahaman *et al.*, 2006). Cette voie de signalisation est impliquée dans la formation de cellules spumeuses puisque l'inhibition pharmacologique de JNK conduit à une réduction de l'athérosclérose, tout comme l'athéroprotection observée chez les souris déficientes en JNK2 et en src kinase lyn (Sumara *et al.*, 2005; Ricci *et al.*, 2004; Miki *et al.*, 2001). De plus, des études plus récentes ont montré que la liaison du CD36 avec les LDLox peut entraîner l'activation de la kinase p44/42 et de COX-2, et ainsi augmenter la production de 15d-PGJ₂ menant à l'activation du PPAR γ (Taketa *et al.*, 2008).

Bien que ces mécanismes montrent que le récepteur CD36 joue un rôle-clé dans la formation des cellules spumeuses, l'internalisation des LDLox par les macrophages est aussi associée à la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires (section 1.5).

1.5 Rôle du CD36 dans l'inflammation

Le récepteur CD36 lie et internalise différents composés comme les LDLox, les protéines fibrillaires β -amyloïde, les bactéries non-opsonisées, les érythrocytes parasités par *Plasmodium falciparum* et les cellules apoptotiques (Febbraio *et al.*, 2001). Des études ont montré que l'internalisation de ces ligands est associée à une réponse inflammatoire potentiellement attribuable à l'activation du récepteur CD36 (*Figure 10*) (Baranova *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2002; Stuart *et al.*, 2005b; Maxeiner *et al.*, 1998; Janabi *et al.*, 2000).

Dans la pathogénèse de l'athérosclérose, l'internalisation des LDLox et la formation des cellules spumeuses sont diminuées de près de 50% chez les sujets déficients en CD36. De façon intéressante, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires induite par les macrophages incubés avec les LDLox est aussi réduite de 50% (Nozaki *et al.*, 1995; Janabi *et al.*, 2000). À l'appui d'une réponse inflammatoire des macrophages, il a été montré que les cellules isolées chez des patients déficients en CD36 présentent une diminution de la sécrétion de TNF α et d'IL-1 β et présentent moins d'ARNm de gènes de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1 β , IL-6, TNF- α et - β , et interféron (IFN)- γ et - β (Janabi *et al.*, 2000; Martin-Fuentes *et al.*, 2007). De plus, l'absence du récepteur CD36 à la surface des macrophages est aussi associée à une diminution de l'activité du facteur de transcription NF κ B ce qui pourrait expliquer une diminution de la réponse inflammatoire induite par les LDLox (Janabi *et al.*, 2000). En effet, l'activation du NF κ B engendre non seulement la production de cytokines mais aussi celle des ROS (Janabi *et al.*, 2000).

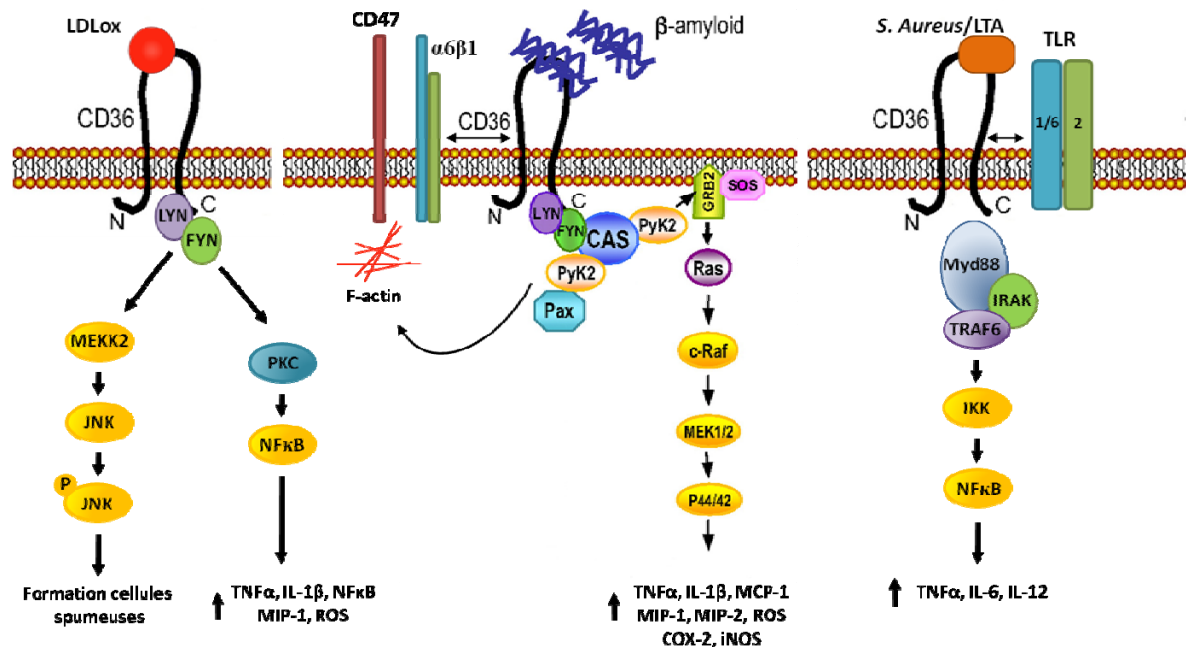


Figure 10. Rôle du CD36 dans l'inflammation

L'activation du récepteur CD36 est associée à une réponse pro-inflammatoire. Les LDLox activent le facteur de transcription NFκB qui augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires. La protéine β-amyloïde active une cascade de signalisation qui passe par l'activation des tyrosine kinases lyn et fyn, de la MEK1/2 et de la p44/p42 MAPK qui régulent à la hausse l'expression des facteurs pro-inflammatoires. Le récepteur CD36 peut aussi être activé par des composantes bactériennes (*S. Aureus/LTA*) de concert avec les TLR conduisant à l'activation de Myd88, IKK et NFκB (Figure inspirée de (Stuart *et al.*, 2007; Moore & Freeman, 2006)).

Récemment, des études ont montré qu'il existe un parallèle entre l'athérogenèse et la progression des maladies rénales chroniques. Dans un modèle murin de fibrose rénale (obstruction urétérale latérale), l'absence du récepteur CD36 entraîne une diminution de l'internalisation des LDLox, de l'activation du NFκB et du stress oxydatif suggérant que le

récepteur joue un rôle-clé dans la réponse inflammatoire menant à la fibrose dans les maladies rénales chroniques (Okamura *et al.*, 2009).

De façon similaire, le récepteur CD36 est aussi impliqué dans la réponse pro-inflammatoire associée à la maladie d'Alzheimer et potentiellement d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson. En effet, la liaison de la protéine fibrillaire β -amyloïde au récepteur CD36 au niveau de la microglie engendre, de concert avec l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ et le CD47, la formation d'un complexe composé de fyn, lyn, des protéines adaptatrices pax et cas ainsi que de pyk2. Cette cascade de signalisation entraîne, entre autres, une réorganisation du cytosquelette (F-actine) et la phosphorylation de la kinase p44/42 menant à une augmentation de l'expression de $\text{TNF}\alpha$, MCP-1, MIP-1, MIP-2, IL-1 β et à la production de ROS, de façon dépendante de l'expression du récepteur CD36 (Coraci *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2002; El Khoury *et al.*, 2003; Bamberger *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2011; Wilkinson *et al.*, 2006). De plus, le CD36 peut interagir avec une autre protéine neurodégénérative, la protéine α -synucléine impliquée dans l'activation des cellules de la microglie associée à la maladie de Parkinson, cependant la délétion du CD36 engendre une diminution de ces effets sans toutefois les enrayer complètement, suggérant que d'autres mécanismes sont impliqués (Su *et al.*, 2008).

Une ischémie cérébrale est associée à une augmentation de l'expression du récepteur CD36, notamment au niveau des macrophages et de la microglie, et cette augmentation est associée à une augmentation de la production de ROS responsables des dommages causés lors de la reperfusion (Cho *et al.*, 2005). À l'opposé, l'absence du récepteur CD36 entraîne

une diminution de la réponse inflammatoire associée à une diminution de la production de ROS suggérant un rôle prédominant du CD36 dans la réponse inflammatoire associée à une ischémie-reperfusion cérébrale (Cho *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Kunz *et al.*, 2008). En plus des intégrines, la réponse inflammatoire induite par le récepteur CD36 a été associée à la formation d'un complexe avec les récepteurs de type *Toll* (TLR). À cet effet, Stewart *et al.* ont montré que la liaison des LDLox et du peptide β -amyloïde au récepteur CD36 entraîne la formation d'un complexe composé du CD36 et de TLR4 et TLR6 (Stewart *et al.*, 2010), en passant par le CD36 et les *src* kinases, plus spécifiquement *lyn*, conduisant à la formation de l'hétérodimère TLR4/TLR6. Les protéines adaptatrices TRIF et MyD88 associées au complexe TLR4/TLR6 propagent ensuite le signal conduisant à l'activation du NF κ B et ultimement à la réponse inflammatoire (Stewart *et al.*, 2010). De plus, le CD36 est un senseur pour les diacylglycérides et l'acide lipotéichoïque (LTA) contenus dans la paroi cellulaire des bactéries Gram-positives, en particulier celle de *Staphylococcus aureus*. Au niveau périphérique, le CD36, suite à la liaison du ligand, s'associe à l'hétérodimère TLR2/6 pour former un complexe qui est recruté dans les radeaux lipidiques à la surface des macrophages entraînant l'activation du NF κ B et la production de cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la défense de l'organisme contre les pathogènes (Hoebe *et al.*, 2005; Triantafilou *et al.*, 2006; Stuart *et al.*, 2005b). Le CD36 semble aussi avoir la capacité de lier les β -glucans des espèces fongiques, conférant ainsi une protection contre les infections à *Cryptococcus neoformans* (Means *et al.*, 2009). Toutefois, un sentier signalétique différent, médié par l'hétérodimère TLR2/1 est généré à la suite d'une ischémie cérébrale. L'association du récepteur CD36 et de l'hétérodimère TLR2/1 semble

être spécifique à la réponse inflammatoire au niveau cérébral puisque c'est plutôt le complexe CD36 et TLR2/6 qui est essentiel à la réponse inflammatoire au niveau périphérique (Abe *et al.*, 2010).

Le CD36 est aussi impliqué dans la pathogénèse du paludisme ou malaria, qui est transmis principalement par le parasite *Plasmodium falciparum*. Les érythrocytes parasités par *Plasmodium falciparum* expriment à leur surface des protéines, les *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane proteins 1 (PfEMP-1), qui permettent la cytoadhésion des érythrocytes parasités à la surface de l'endothélium microvasculaire via le CD36, identifié comme un récepteur de séquestration. La séquestration des érythrocytes infectés prévient leur élimination ce qui pourrait contribuer à la pathologie de la malaria (Ockenhouse *et al.*, 1991; Newbold *et al.*, 1997; Serghides *et al.*, 2003). Cependant, d'autres études ont montré que le CD36 à la surface des macrophages pouvait contribuer à la défense immunitaire contre ce pathogène par l'internalisation des érythrocytes parasités non opsonisés entraînant ainsi leur clairance (McGilvray *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2004). Une étude a montré qu'une déficience en CD36 confère une résistance aux infections bactériennes et protège de l'anémie qu'on retrouve dans la malaria en réduisant l'adhérence des globules rouges infectés à l'endothélium vasculaire (Hawkes *et al.*, 2010; Cholongola *et al.*, 2009).

1.6 Rôle du CD36 dans la régulation de l'angiogenèse

Tel que mentionné précédemment, le CD36 est un récepteur pour la TSP-1 ainsi que pour les molécules qui présentent un motif répétitif de type 1 (TSRs) et leur domaine de liaison

sur le CD36 est nommé le domaine CLESH-1 (Armstrong & Bornstein, 2003; Crombie & Silverstein, 1998). La TSP-1 est un inhibiteur endogène de l'angiogenèse via l'activation du CD36 (*Figure 11*). Outre l'inflammation, le CD36 joue ainsi un rôle potentiellement important dans la croissance tumorale et toutes autres pathologies dans lesquelles on retrouve un processus de néovascularisation (Silverstein & Febbraio, 2009). Le CD36 agit sur l'angiogenèse tumorale en mobilisant les facteurs pro-angiogéniques responsables de la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales, et en générant des facteurs anti-angiogéniques (Dawson *et al.*, 1997; Jimenez *et al.*, 2000). La TSP-1 inhibe le développement des vaisseaux sanguins mais pas celui des vaisseaux lymphatiques, en raison de l'absence du CD36 au niveau de l'endothélium lymphatique. L'inhibition de l'angiogenèse par le complexe TSP-1/CD36 est initiée par le recrutement de fyn, une protéine tyrosine kinase de la famille des *src*, qui d'une part active une cascade de signalisation impliquant les protéine kinases p38 et JNK ainsi que le ligand Fas et la caspase-3 (Jimenez *et al.*, 2000; Volpert *et al.*, 2002) et d'autre part inhibe la phosphorylation d'akt induite par le VEGF (Sun *et al.*, 2009). De plus, une fois liée au CD36, la TSP-1 active le TGF β latent qui inhibe l'activation des métalloprotéinases (en particulier la MMP-9) et entraîne la séquestration du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF) dans la matrice extracellulaire résultant en une inhibition de la migration cellulaire tout en induisant l'apoptose (Yehualaeshet *et al.*, 1999; Jimenez *et al.*, 2000; Rodriguez-Manzaneque *et al.*, 2001; Gabison *et al.*, 2003). Ces éléments, en plus du CD36, sont essentiels pour inhiber l'angiogenèse et induire l'apoptose des cellules endothéliales activées. La production de certains facteurs pro-apoptotiques comme le TNF-

α et le ligand Fas seraient aussi impliqués dans le processus (Volpert *et al.*, 2002; Rege *et al.*, 2009).

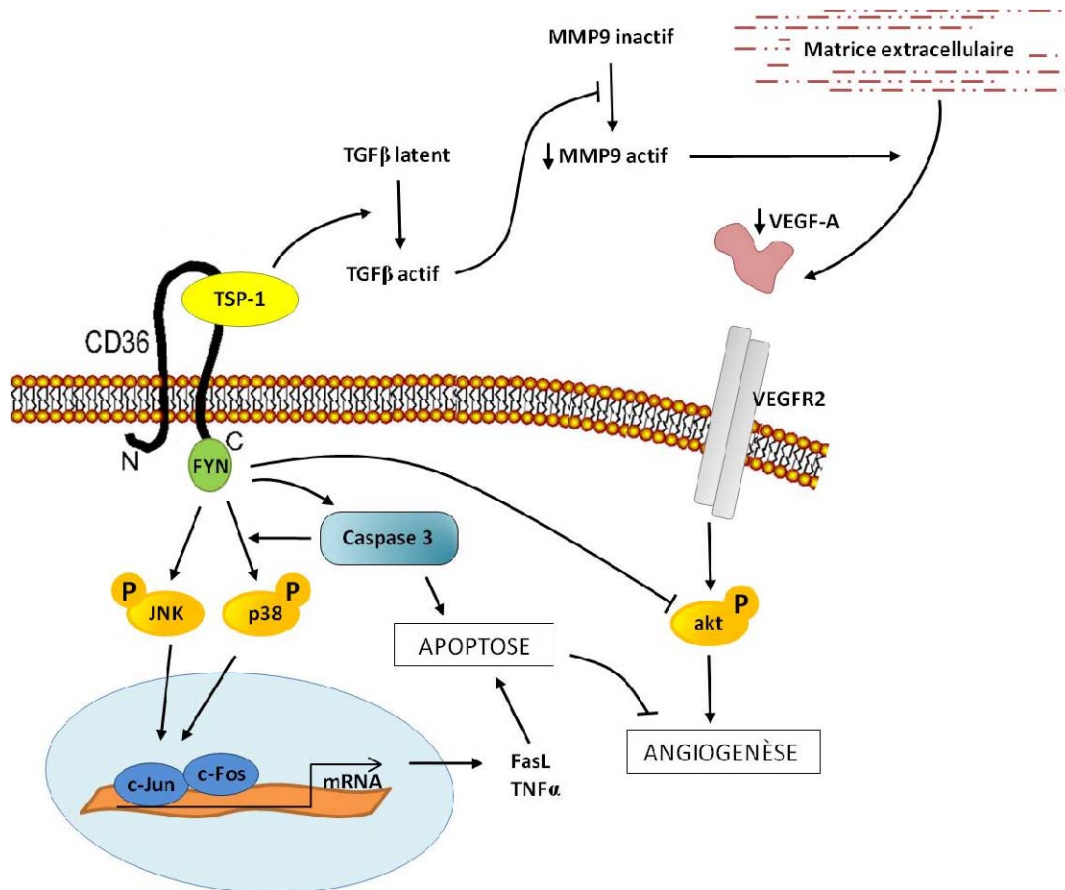


Figure 11. Rôle du CD36 dans la régulation de l'angiogenèse

La liaison de la TSP-1 avec le récepteur CD36 à la surface des cellules endothéliales entraîne une cascade de signalisation qui passe par fyn, la caspase-3 et les MAPK p38 et JNK et engendre une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose. La TSP-1 peut aussi inhiber l'angiogenèse de façon indirecte puisqu'elle a la capacité d'activer le TGFβ et ainsi d'inhiber la MMP-9. L'inhibition de l'activation de la MMP9 entraîne une diminution de la libération du VEGF-A qui est séquestré dans la matrice extracellulaire, ce qui entraîne une diminution de la quantité de VEGF-A qui se lie au récepteur VEGFR2 et donc engendre un effet anti-angiogénique. De plus, l'activation du CD36 et de la kinase fyn par la TSP-1 semble inhiber la phosphorylation d'akt induite par le VEGF-A (Bujold K., 2011).

Récemment, un parallèle a été fait entre l'athérosclérose et la dégénérescence maculaire liée à l'âge. La dégénérescence maculaire est caractérisée, d'une part, par une néovascularisation cornéenne (Mwaikambo *et al.*, 2008b; Mwaikambo *et al.*, 2008a) et d'autre part, par l'accumulation de lipoprotéines contenant l'apoB100 (LDL et VLDL) dans la membrane de Bruch, suivie par l'apoptose des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) (Dunaief *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2005; Malek *et al.*, 2003). Le VEGF joue un rôle-clé dans la néovascularisation cornéenne et un lien entre le CD36 et le VEGF est appuyé par l'observation qu'une délétion du récepteur CD36 induit une augmentation de l'expression de VEGF-A, JNK-1 et c-Jun ainsi qu'une augmentation de la néovascularisation. Il en résulte la formation d'un voile au niveau de la cornée qui est amplifiée chez les souris plus âgées (Mwaikambo *et al.*, 2008b; Mwaikambo *et al.*, 2008a). Au contraire, l'activation du récepteur CD36 entraîne plutôt une diminution de l'expression du VEGF-A et une diminution de la formation de nouveaux vaisseaux, voir même la régression de la néovascularisation (Mwaikambo *et al.*, 2008b; Mwaikambo *et al.*, 2008a).

2 Les monocytes/macrophages: rôle dans le développement de l'athérosclérose et l'homéostasie du cholestérol

Les macrophages ont pour origine les monocytes sanguins nés dans la moelle osseuse. Les macrophages, dont l'étymologie grecque veut dire «gros mangeurs», jouent un rôle dans la phagocytose de débris cellulaires et de pathogènes. Les monocytes et les macrophages participent à l'immunité innée ainsi qu'à l'immunité adaptative en jouant un rôle crucial dans la phagocytose et la digestion intracellulaire de microorganismes, la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et la présentation d'antigènes du non soi par le complexe majeur d'histocompatibilité dans les tissus lymphoïdes périphériques où se déroulent les réponses immunitaires spécifiques. Bien qu'essentielle aux mécanismes de défense de l'hôte, l'activation des macrophages, lorsque chronique, contribue à la pathogénèse de maladies inflammatoires dont l'athérosclérose. En effet, les macrophages constituent la population leucocytaire prédominante dans les lésions athérosclérotiques et sont impliqués à tous les stades du développement de l'athérosclérose.

2.1 Origine des différentes populations de monocytes/macrophages

2.1.1 Les monocytes

Les monocytes matures voyagent dans la circulation sanguine de 1 à 3 jours avant de s'infiltrer dans les différents tissus où ils vont se différencier en macrophages. Les monocytes d'origine humaine expriment à leur surface le récepteur aux lipopolysaccharides bactériens, le CD14. Ces cellules peuvent être divisées en deux sous-populations selon l'expression concomitante de l'antigène CD16, un récepteur de faible affinité pour les immunoglobulines G (IgG) (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 1988; Ziegler-Heitbrock, 2007; Passlick *et al.*, 1989). La sous-population de monocytes CD14⁺/CD16⁻ représente 80-90% des monocytes circulants.

Chez le modèle murin, on identifie aussi deux sous-populations de monocytes ayant des similitudes phénotypiques avec les monocytes humains mais présentant des différences structurelles et fonctionnelles majeures (Passlick *et al.*, 1989; Woollard & Geissmann, 2010). Les monocytes murins «classiques», identifiés par les antigènes de surface Gr1⁺/Ly6C^{high} CCR2⁺ CX₃CR1^{low}, expriment fortement le récepteur du MCP-1 (CCR2) et la molécule d'adhérence sélectine-L mais très peu le récepteur de la fractalkine, CX₃CR1 (Woollard & Geissmann, 2010; Geissmann *et al.*, 2003). Ces monocytes murins, contrairement aux monocytes équivalents humains, sont des monocytes « inflammatoires » qui sont recrutés aux foyers inflammatoires. Dans le contexte de l'athérosclérose,

l'hypercholestérolémie est associée à une monocytose, un processus qui est caractérisé par le recrutement des monocytes $\text{Gr1}^+/\text{Ly6C}^{\text{high}}$ qui mène à la formation des cellules spumeuses (Swirski *et al.*, 2007; Tacke *et al.*, 2007; Yona & Jung, 2010). Des études ont montré que le recrutement de ces monocytes dépend non seulement du récepteur CCR2 mais aussi de $\text{CX}_3\text{CR1}$ (Combadiere *et al.*, 2008; Saederup *et al.*, 2008). La deuxième population de monocytes murins, les monocytes dits «non-classiques», expriment quant à eux des niveaux élevés de $\text{CX}_3\text{CR1}$ et d'intégrine $\beta 2$, particulièrement le LFA-1, mais de très faibles niveaux de CCR2. Les monocytes $\text{Gr1}^+/\text{Ly6C}^{\text{low}} \text{CCR2}^- \text{CX}_3\text{CR1}^{\text{high}}$ parcourent continuellement la paroi endothéliale des petits vaisseaux sanguins dans les tissus sains, sans toutefois traverser l'endothélium, d'où leur nom de monocytes «patrouilleurs». Cependant, ces cellules vont migrer rapidement au site inflammatoire, avant même les $\text{Gr1}^+/\text{Ly6C}^{\text{high}} \text{CCR2}^+ \text{CX}_3\text{CR1}^{\text{low}}$, et vont induire une réponse inflammatoire rapide et transitoire (Auffray *et al.*, 2007; Geissmann *et al.*, 2008; Yona & Jung, 2010). Ils vont ensuite se différencier en macrophages de type M2, dont le phénotype sera décrit à la section suivante, et contribuer à la réparation tissulaire, contrairement aux monocytes pro-inflammatoires qui arrivent plus tardivement au foyer infectieux et se différencient plutôt en cellules dendritiques (Auffray *et al.*, 2007; Geissmann *et al.*, 2008; Woollard & Geissmann, 2010).

2.1.2 Les macrophages

Les macrophages, reconnus pour leur grande hétérogénéité et leur plasticité, ont pour fonction principale de maintenir l'homéostasie tissulaire en permettant la clairance de

différents agents pathogènes, cellules apoptotiques et produits toxiques dérivés du métabolisme, telles les LDL modifiées (Gordon & Taylor, 2005). On distingue deux catégories de macrophages: les macrophages recrutés, provenant des monocytes circulants qui migrent en réponse à des stimuli au site inflammatoire, et les macrophages qui résident dans des tissus spécifiques et qui développent des fonctions spécialisées en fonction de leur environnement. Gordon et Taylor ont noté l'existence de deux grandes populations de macrophages, les macrophages activés par la voie classique (M1) et ceux activés par la voie alternative (M2). Les macrophages M1 sont polarisés après leur activation par les cytokines sécrétées par les lymphocytes T auxiliaires 1 (Th1, pour *T helper 1*) comme le M-CSF, TNF- α et IL-1 β et vont produire à leur tour des cytokines pro-inflammatoires ainsi que des ROS et du NO. Les macrophages M1 jouent un rôle important pendant la phase précoce de la réponse inflammatoire et sont impliqués dans la destruction tissulaire, la mort des parasites intracellulaires et la résistance tumorale. D'un autre côté, les macrophages M2 sont plutôt produits en réponse à des cytokines Th2 anti-inflammatoires comme l'IL-4, IL-13, IL-21 ainsi qu'aux glucocorticoïdes. Leur fonction exacte dépend de leur environnement mais ces cellules semblent être impliquées dans l'immunité adaptative, l'internalisation de débris cellulaires, l'angiogenèse, le remodelage et la réparation tissulaire (*Figure 12*). De plus, les macrophages ont la capacité de se transformer rapidement et réversiblement d'une polarisation M1 à M2, et vice versa (Porcheray *et al.*, 2005).

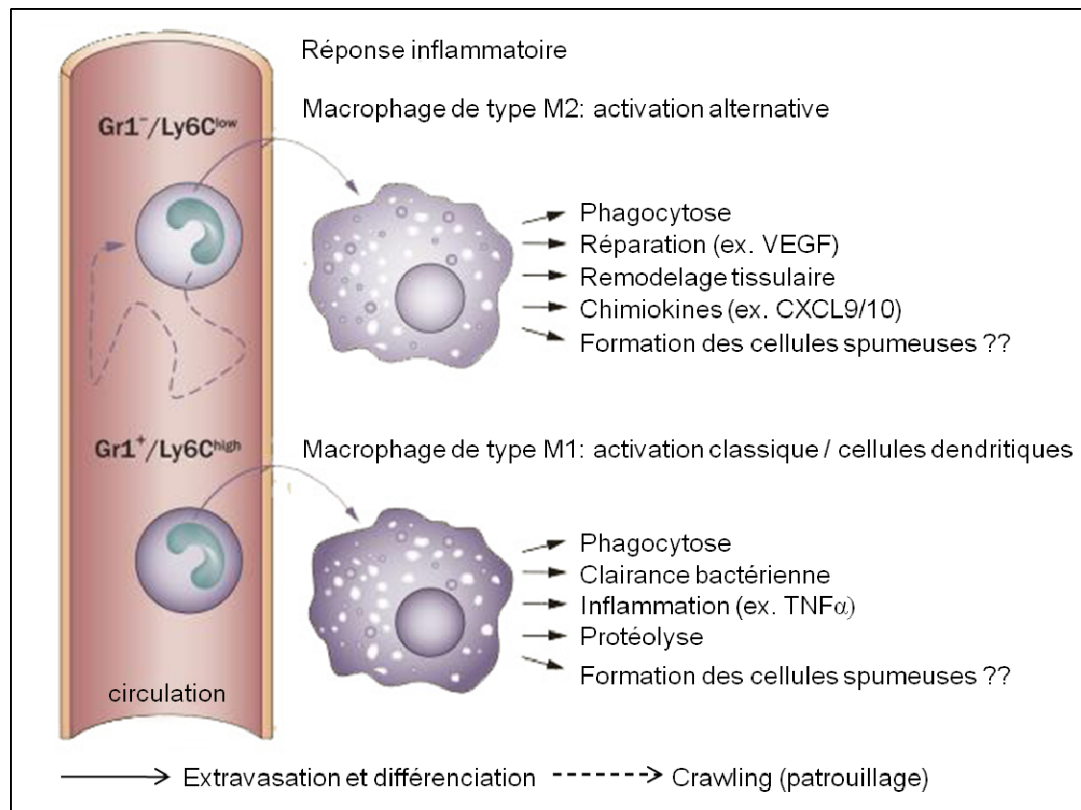


Figure 12. Différenciation des monocytes en macrophages

Il existe deux sous-populations de monocytes bien distinctes chez la souris. Les monocytes $Gr1^{-}/Ly6C^{low}$ patrouillent la paroi des vaisseaux sanguins, mais migrent rapidement dans les tissus en réponse à une infection et se différencient en macrophages de type M2 (voie alternative). Les monocytes $Gr1^{+}/Ly6C^{high}$ se différencient plutôt en macrophages de type M1 (voie classique) (Figure tirée de (Woollard & Geissmann, 2010)).

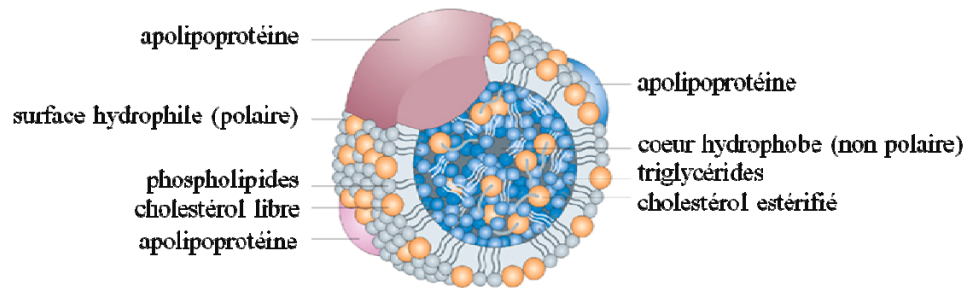
La seconde catégorie de macrophages, composée de macrophages résidents, devient hautement spécialisée selon leur microenvironnement. Cette population comprend les cellules dendritiques, les cellules de Kupffer, les cellules de Langerhans, les ostéoclastes, la microglie ainsi que les macrophages alvéolaires.

2.2 Homéostasie du cholestérol : du métabolisme lipidique dans le macrophage à l'excrétion du cholestérol dans les fèces

Le cholestérol est une composante essentielle de toutes les membranes et le maintien de concentrations optimales est essentiel à la bonne fonction et à la viabilité cellulaire. Un excès de cholestérol est toxique pour la cellule et les tissus extra-hépatiques sont plutôt limités dans leur capacité à métaboliser le cholestérol. Le foie est donc le principal organe capable de métaboliser le cholestérol excédentaire mais pour ce faire, le cholestérol cellulaire doit être retourné au foie. Cependant, les lipides sont insolubles dans la phase aqueuse et doivent donc être transportés dans la circulation sanguine couplés à des protéines.

2.2.1 Métabolisme des lipoprotéines plasmatiques

Les lipoprotéines sont des particules complexes formées de lipides et de protéines qui sont dans un état dynamique constant. Les lipoprotéines transportent principalement les triglycérides et le cholestérol provenant soit de l'alimentation, soit de la synthèse *de novo* dans l'organisme. Les triglycérides et les esters de cholestérol forment un cœur hydrophobe entouré de protéines (apolipoprotéines), de phospholipides et de cholestérol libre, orientant leur partie hydrophile à la surface des particules, ce qui les rend solubles dans le plasma sanguin (*Figure 13*).



Type de lipoprotéine	Densité (g/ml)	Taille (nm)	Proportion CE/TG	Principales apolipoprotéines (apo)
Chylomicrons	0.93	75 - 1200	1/19	B48, E, C
VLDL	0.93 – 1.006	30 – 80	1/3,3	B100, E, C
IDL	1.006 – 1.019	27 – 35	1/3,5	B100, E
LDL	1.019 – 1.063	18 – 27	1/0,23	B100
HDL₂	1.063 – 1.125	9 – 12	1/0,22	A1, AII, C
HDL₃	1.125 – 1.210	7 – 9	1/0,19	A1, AII, C
préβ HDL	1.210 – 1.250	< 7 (disques)	nd	A1
Lp (a)	1.040 – 1.115	25		B100, (a)

CE: cholestérol estérifié, TG: triglycérides, nd: non-déterminé

Figure 13. Caractéristiques physiques et chimiques des lipoprotéines plasmatiques humaines

Les lipoprotéines sont formées d'un cœur hydrophobe (triglycérides (TG) et esters de cholestérol (CE)) entourées d'une monocouche de phospholipides contenant du cholestérol libre et des apolipoprotéines (Figure modifiée de (Wasan *et al.*, 2008)).

Les chylomicrons sont synthétisés au niveau des entérocytes, dans l'épithélium intestinal, sous forme de chylomicrons natifs qui sont relâchés dans la circulation lymphatique, puis sanguine (Figure 14). Ils sont synthétisés à partir des triglycérides provenant de l'alimentation, qui s'associent avec du cholestérol et des phospholipides ainsi qu'avec l'apolipoprotéine B-48 (apoB-48). Dans la circulation, la lipoprotéine lipase plasmatique (LPL), fixée à la surface des cellules endothéliales, hydrolyse les triglycérides des

chylomicrons et libère des acides gras; ces derniers se lient à l'albumine pour être acheminés vers les cellules adipeuses et les cellules musculaires. Lors de la réduction de leur contenu en triglycérides, les chylomicrons se dissocient de la lipase et retournent dans la circulation sous forme de résidus de chylomicrons où ils sont rapidement internalisés par le récepteur *LDL receptor-related protein* (LRP) au niveau du foie, et digérés dans les lysosomes pour libérer du cholestérol libre (Kindel *et al.*, 2010; Black, 2007). Ce cholestérol est utilisé pour la synthèse des membranes, ou emmagasiné sous forme de gouttelette ou utilisé dans la synthèse des VLDL.

Les particules de VLDL sont synthétisées au niveau du foie, par un processus catalysé par la protéine de transfert microsomale (MTP) qui transfère des lipides vers une molécule d'apoB-100 (*Figure 14*). Les VLDL sont sécrétées dans la circulation sanguine et soumises, tout comme les chylomicrons, à l'action de la LPL qui hydrolyse les triglycérides des VLDL libérant des acides gras et du glycérol. Certains résidus de VLDL vont être rapidement épurés de la circulation, entre autres par le LRP, tandis que d'autres vont échanger une particule de triglycéride contre une molécule d'ester de cholestérol en provenance des HDL via la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) et vont être délipidées plus progressivement, conduisant à la formation des lipoprotéines intermédiaires (IDL). Ces IDL sont éliminées très rapidement de la circulation via LDLR, qui est un récepteur qui reconnaît les apoB et E, ou sont hydrolysées par la LPL hépatique conduisant ainsi à la formation de particules plus denses enrichies en esters de cholestérol, les LDL. Ces dernières, dont le site d'élimination majeur est le foie, sont principalement

impliquées dans les pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose (voir section 1.4.2.2.2.) et sont surnommées «mauvais cholestérol» par le grand public (Shelness & Sellers, 2001).

Les HDL sont sécrétées au niveau du foie sous forme de petites particules désorganisées contenant peu de lipides mais riches en apolipoprotéine A-I (apoA-I) (*Figure 14*). Les HDL peuvent aussi provenir de l'hydrolyse des chylomicrons et des VLDL plasmatiques qui libèrent des apolipoprotéines. Dans la circulation, les HDL naissantes (préβ-HDL), de petites particules discoïdales, s'enrichissent en cholestérol et deviennent des particules de HDL₃ matures et sphériques sous l'action de la *lecithin : cholesterol acyltransferase* (LCAT), qui convertit le cholestérol libre en ester de cholestérol. Les HDL₃ peuvent, à leur tour, s'enrichir en cholestérol et une nouvelle action de la LCAT permet la formation des HDL₂, encore plus riches en esters de cholestérol. Il est à noter que les HDL₂ peuvent se retransformer en HDL₃ sous l'influence de la CETP et de la lipase hépatique (Watts *et al.*, 2008; Davidson & Toth, 2007; Linsel-Nitschke & Tall, 2005). Les HDL jouent un rôle prépondérant dans le transport inverse du cholestérol (voir section 2.2).

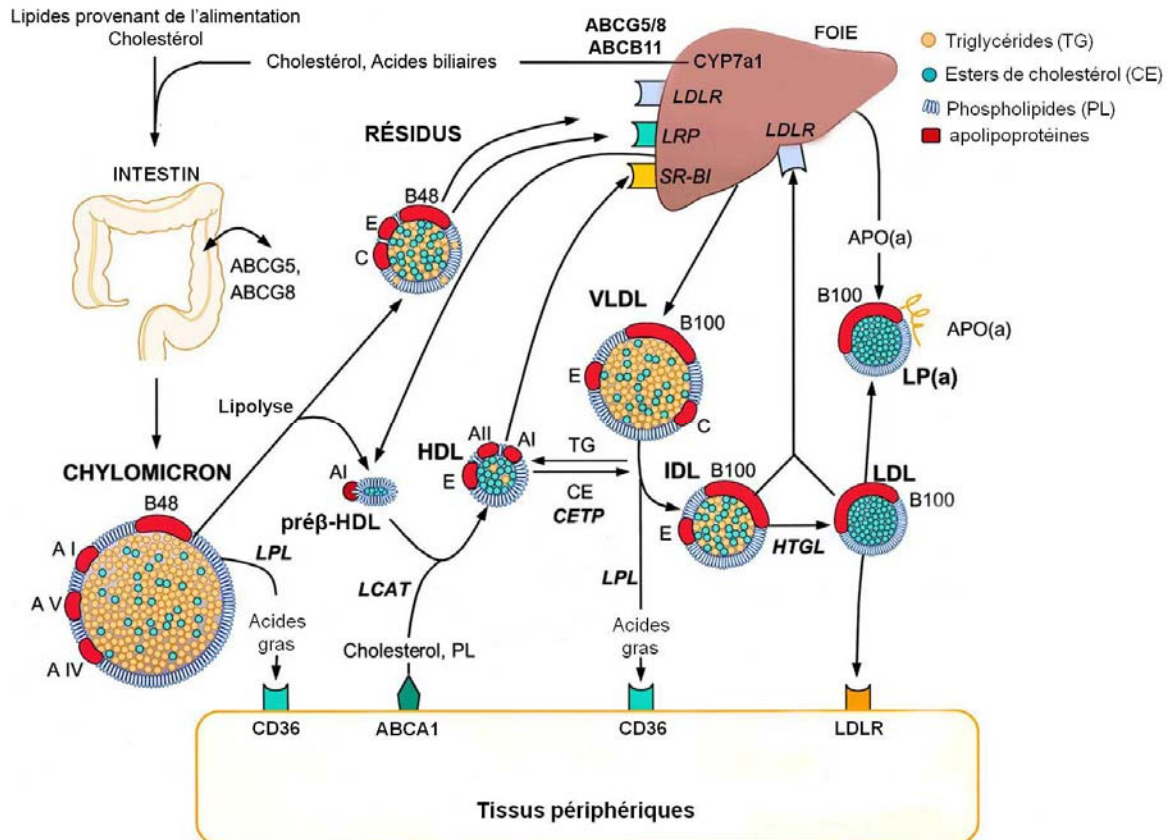


Figure 14. Métabolisme des lipoprotéines plasmatiques.

Les lipoprotéines riches en triglycérides sont sécrétées par l'intestin (chylomicrons) et le foie (VLDL). Ces dernières subissent une lipolyse dans la circulation ce qui entraîne la libération d'acides gras qui sont acheminés vers les tissus périphériques. Les résidus de chylomicrons sont pris en charge par le foie via le LDLR ou le LRP. Les résidus de VLDL sont en partie acheminés vers le foie ou sont métabolisés en IDL puis en LDL. Les HDL sont quant à elles formées dans la circulation à partir des apoA-I pauvres en lipides sécrétées par le foie et l'intestin (Figure traduite de (Lusis *et al.*, 2004)).

2.2.2 Homéostasie du cholestérol dans le macrophage

En 1968, Glomset a été le premier à décrire le transport inverse du cholestérol (Glomset, 1968), un processus physiologique par lequel le cholestérol excédentaire contenu dans les

tissus périphériques est transporté par les HDL vers le foie pour être éliminé de l'organisme par voie biliaire sous forme native ou transformé en acides biliaires. Dans les macrophages, l'homéostasie est régulée en transformant le cholestérol libre en esters de cholestérol par l'enzyme ACAT ou en transportant l'excédent du cholestérol à l'extérieur de la cellule (efflux du cholestérol). Ainsi, l'efflux est la première étape du transport inverse et dépend de la concentration intracellulaire de cholestérol, de l'expression des différentes protéines cellulaires et de la présence des accepteurs du cholestérol extracellulaires. Parmi ces protéines, on retrouve des transporteurs, des récepteurs nucléaires et même des enzymes impliquées dans la synthèse du cholestérol, et toutes jouent un rôle déterminant dans l'efflux du cholestérol (*Tableau 2*). Tel que mentionné ci-haut, un excès de cholestérol dans les macrophages conduit à la formation de cellules spumeuses et de stries lipidiques, étape précoce du développement de l'athérosclérose. Le transport inverse du cholestérol joue donc un rôle important dans la prévention du développement des maladies cardiovasculaires et plus particulièrement dans l'athérosclérose.

Tableau 2. Protéines qui jouent un rôle déterminant dans l'efflux du cholestérol

Protéines	Isoformes	Fonctions/Cibles
Cavéolines (Cav)	Cav-1, Cav-2, Cav-3	Transport du cholestérol intracellulaire
Transporteurs ABC (ABC)	ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8	Transport transmembranaire du cholestérol
Récepteurs <i>scavengers</i> (SR)	SR-A1, SR-A2, SR-B1, CD36, LOX-1	Transport transmembranaire du cholestérol; Récepteurs LDL/HDL
Apolipoprotéines (apo)	apo-AI, apo-AII, apo-AIV, apo-B, apo-CI, CII, CIII, CIV, apo-E	Apo-AI: transport du cholestérol Apo-E: transport du cholestérol et activation de la LCAT Apo-C: régulation de l'activité de la LCAT, CETP et LPL
<i>Sterol regulatory element binding protein</i> (SREBP)	SREBP-1a, SREBP-1c, SREBP-2	Régulation de l'expression de Cav-1, LDL-R, ABCA1, SB-BI, <i>HMG-CoA reductase</i> , <i>fatty acid synthase</i>
<i>Liver X receptor</i> (LXR)	LXR α , LXR β	Régulation de l'expression de SREBP, ABCA1, ABCG1, ABCG4, ABCG5, ABCG8, SR-BI
<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> (PPAR)	PPAR α , PPAR β , PPAR δ , PPAR γ 1, PPAR γ 2, PPAR γ 3	Régulation de l'expression de Cav-1, ABCA1, ABCG1, SR-BI, apoE, apo-AI, apo-AII
<i>Phospholipid transfer protein</i> (PLTP)		Échange de phospholipides entre les lipoprotéines Transformation des CM, VLDL et LDL en HDL, puis des HDL ₃ en HDL ₂ et pre β -HDL
<i>Cholesteryl ester transfer protein</i> (CETP)		Échange de lipides entre les HDL et les autres lipoprotéines
<i>Niemann-Pick disease type C</i> (NPC)	NPC-1, NPC-2	Mouvement du cholestérol libre et des lipides dans la cellule
<i>Acyl-CoA:Cholesterol acyltransferase</i> (ACAT)	ACAT1, ACAT2	Estérification du cholestérol libre
<i>Lecithin:Cholesterol acyltransferase</i> (LCAT)		Estérification du cholestérol libre
Lipases	Lipopotéine lipase Lipase endothéliale Lipase hépatique	Hydrolyse les triglycérides Transfert du cholestérol, des phospholipides et apolipoprotéines entre les lipoprotéines
<i>Cholesterol-metabolizing cytochrome P450</i> (CYP)	CYP27a1 CYP7a1 CYP46a1	Oxydation du cholestérol Maintien de l'homéostasie du cholestérol

(Tableau traduite de (Luo *et al.*, 2010))

2.2.2.1 Importance des différents mécanismes d'efflux du cholestérol dans le macrophage

Plusieurs protéines peuvent moduler le processus d'efflux du cholestérol; cependant, les principales voies d'exportation du cholestérol sont médiées par les transporteurs *ATP-binding cassette* A1 (ABCA1) et G1 (ABCG1). Toutefois, le cholestérol peut aussi être transporté par les particules de HDL matures après efflux via le récepteur SR-BI ou même par diffusion passive (*Figure 15*). La diffusion passive est quantitativement peu importante par rapport aux autres mécanismes d'efflux. Elle est caractérisée par la diffusion de cholestérol libre de la membrane plasmique vers le milieu extracellulaire selon le gradient de concentration, et par l'intégration subséquente du cholestérol à la surface de différents accepteurs comme les HDL et LDL, l'albumine ou par des vésicules unilamellaires de phospholipides (Cavelier *et al.*, 2006; Rothblat & Phillips, 1986; Yancey *et al.*, 2003).

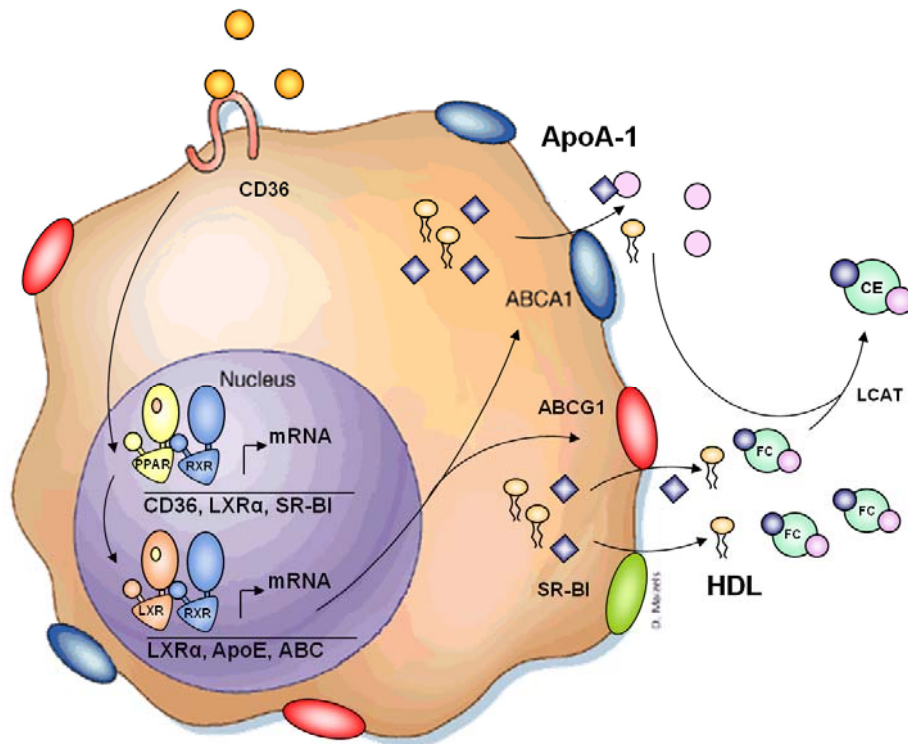


Figure 15. Différentes voies d'efflux du cholestérol dans le macrophage

Le cholestérol est principalement exporté à l'extérieur du macrophage par les transporteurs ABCA1 et ABCG1. Cependant, le cholestérol peut aussi être transporté par le SR-BI ainsi que par diffusion passive, selon un gradient de concentration (figure modifiée de (Li & Glass, 2002)).

2.2.2.2 Rôle du récepteur SR-BI dans le transport du cholestérol au niveau du macrophage

Le récepteur SR-BI joue aussi un rôle dans le transport du cholestérol. En plus de provoquer la sortie du cholestérol libre, le SR-BI facilite aussi son entrée. Ce transporteur est donc impliqué dans un échange bidirectionnel du cholestérol entre le milieu intracellulaire et les particules de HDL circulantes. Dans ce mécanisme de transport, le

mouvement du cholestérol dépend d'une part de la direction du gradient de concentration (de *et al.*, 2001; Yancey *et al.*, 2003), et d'autre part de la composition et du contenu en phospholipides (plus particulièrement en PC) des particules de HDL (Yancey *et al.*, 2000). Cependant, l'implication du SR-BI dans l'efflux du cholestérol au niveau des macrophages et son rôle protecteur dans l'athérosclérose demeurent incertains. Bien que des études *in vitro* ont montré que le SR-BI engendre l'efflux du cholestérol dans les macrophages (Rothblat *et al.*, 1999), des études *in vivo* chez les souris déficientes en SR-BI n'ont montré aucune influence sur le transport inverse du cholestérol (Wang *et al.*, 2007). Cependant, d'autres études effectuées sur les souris déficientes en LDLR (Covey *et al.*, 2003) et en apoE (Zhang *et al.*, 2003), ont montré que la transplantation de cellules provenant de la moelle osseuse de souris déficientes en SR-BI engendrait une augmentation du développement de l'athérosclérose. Ces résultats sont en accord avec un rôle protecteur du SR-BI dans le développement de l'athérosclérose, mais ces effets sont probablement dus à une gestion des lipides au niveau hépatique, le SR-BI agissant à ce niveau comme récepteur des HDL, plutôt qu'à son rôle dans l'efflux du cholestérol des macrophages.

2.2.2.3 Rôle des transporteurs ABC dans l'homéostasie du cholestérol au niveau du macrophage

Les transporteurs ABC font partie d'une grande famille composée des transporteurs ABC A à G, qui sont impliqués dans l'efflux transmembranaire de différents substrats amphiphiliques comme les glycolipides, les phospholipides, les stérols et les xénobiotiques. Les protéines ABC participent à plusieurs processus biologiques dont le transport des

xénobiotiques, mais ce qui nous intéresse plus particulièrement dans le cadre de ce travail est leur rôle dans le transport membranaire des lipides (Dean *et al.*, 2001; Aye *et al.*, 2009; Voloshyna & Reiss, 2011). Les transporteurs ABC sont le plus souvent exprimés à la surface membranaire mais on peut aussi en retrouver à la membrane de certains compartiments intracellulaires comme le Golgi, les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Aye *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2000). Les transporteurs ABC partagent une structure commune composée de deux domaines transmembranaires (TMD) qui forment un canal à travers la membrane et de deux domaines de liaison à l'ATP cytosoliques, aussi appelés domaine de liaison aux nucléotides (NBD). Ils existent soit sous la forme d'un transporteur entier constitué de deux TMD avec six passages transmembranaires chacun, soit sous la forme d'un demi-transporteur avec seulement un TMD de six passages transmembranaires qui est actif uniquement sous la forme d'un homodimère ou d'un hétérodimère (Voloshyna & Reiss, 2011). Les TMD sont responsables de la liaison des substrats tandis que les domaines de liaison aux nucléotides sont responsables de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP. Les transporteurs ABC sont impliqués, entre autres, dans le transport unidirectionnel des lipides vers différents accepteurs extracellulaires et ils utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter les différents composés à travers la membrane plasmique (Dean *et al.*, 2001; Aye *et al.*, 2009; Voloshyna & Reiss, 2011; Schmitz & Kaminski, 2001).

2.2.2.3.1 Le transporteur ABCA1

Le transporteur ABCA1 est impliqué dans l'efflux du cholestérol des macrophages et dans la formation des particules de HDL. En 1999, la découverte de mutations au niveau du gène ABCA1 a permis d'identifier le gène responsable de la maladie de Tangier, associée à un déficit en HDL ainsi qu'à une accumulation de cholestérol dans les macrophages résultant en un développement précoce de l'athérosclérose (Brooks-Wilson *et al.*, 1999; Bodzioch *et al.*, 1999; Rust *et al.*, 1999; Lawn *et al.*, 1999). Cette découverte a mis en évidence le rôle de la protéine ABCA1 dans le transport du cholestérol et des lipides. Il est bien connu que l'ABCA1 transfère le cholestérol libre et les phospholipides, notamment la PC, la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylsérine (PS) aux apoA-I pauvres en lipides (Francis *et al.*, 1995; Rigot *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2002; Alder-Baerens *et al.*, 2005). Cependant, le mécanisme de translocation des lipides à travers la membrane plasmique par les transporteurs ABC, en particulier ABCA1, reste à clarifier. Plusieurs études ont montré qu'il pouvait y avoir une interaction directe entre l'apoA-I et le transporteur ABCA1 à la surface membranaire conduisant à la lipodation de l'apoA-I et à la formation des particules de HDL naissantes (préβ-HDL) et que cette interaction ne serait pas possible sans le domaine C-terminal de l'apoA-I (Burgess *et al.*, 1999). Or, Vedhachalam *et al.* ont montré pour la première fois l'existence de deux sites de liaison bien distincts de l'apoA-I à la surface des macrophages (Vedhachalam *et al.*, 2007). L'étude montre que l'interaction directe entre l'apoA-I et le transporteur ABCA1 ne représente que 10 % des particules liées à la membrane mais que cette interaction contribue à la formation d'un second site de haute affinité (domaine lipidique) responsable de la liaison des autres particules d'apoA-I (Vedhachalam *et al.*, 2007). Ces résultats ont mené à

l'élaboration d'un modèle d'efflux des lipides en trois étapes et à la formation subséquente des pré β -HDL (Vedhachalam *et al.*, 2007) (*Figure 16*). Un autre mécanisme a aussi été proposé, selon lequel les apoA-I sont internalisées par endocytose puis transportées dans les endosomes où elles se lient aux phospholipides et au cholestérol contenu dans les pools intracellulaires avant d'être sécrétées à nouveau dans la circulation (Neufeld *et al.*, 2004; Hassan *et al.*, 2007). Cependant, des études ont montré que l'internalisation des apoA-I ne contribue que très faiblement (moins de 2%) à l'efflux du cholestérol engendré par le transporteur ABCA1 (Denis *et al.*, 2008; Faulkner *et al.*, 2008).

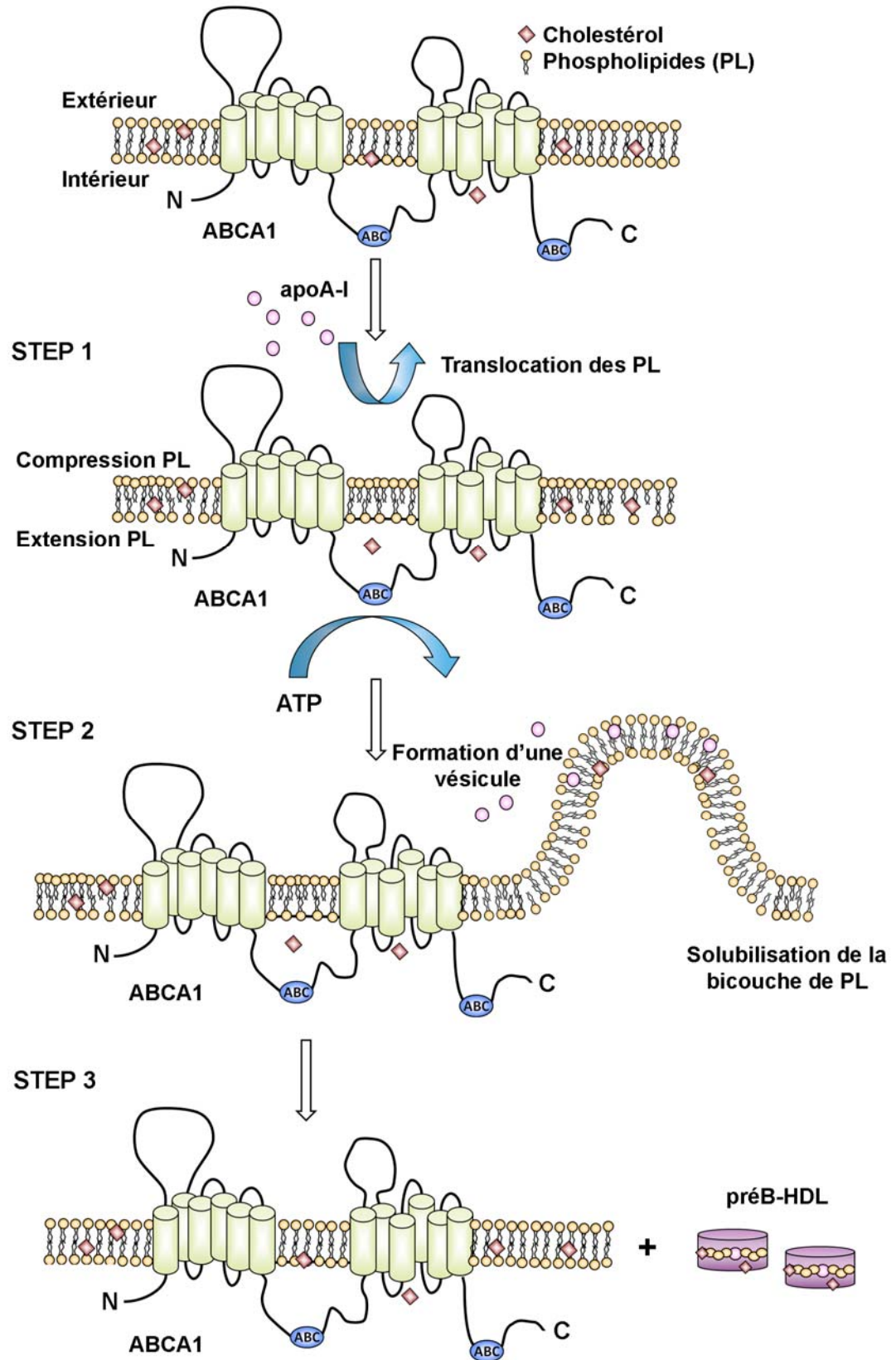


Figure 16. Efflux du cholestérol et des phospholipides par le transporteur ABCA1 et formation des pré β -HDL : un modèle en trois étapes

La première étape est caractérisée par la liaison de quelques particules d'apoA-I avec le transporteur ABCA1 à la membrane plasmique. Cette liaison est responsable d'une augmentation de l'activité d'ABCA1 conduisant à une translocation accrue des phospholipides membranaires vers le feuillet exofacial de la membrane plasmique. Les phospholipides au niveau du feuillet externe de la membrane sont alors compressés tandis que ceux du feuillet cytoplasmique sont plutôt détendus. Dû à la compression des phospholipides, une vésicule se forme à même la membrane plasmique procurant ainsi un domaine lipidique avec une haute affinité de liaison pour les apoA-I. Plusieurs apoA-I se retrouvent à la surface de cette vésicule et interagissent avec les lipides de la membrane plasmique. L'interaction des apoA-I avec les phospholipides et le cholestérol membranaire entraîne la solubilisation spontanée des lipides dans la vésicule et la formation des pré β -HDL contenant jusqu'à quatre molécules d'apoA-I (Figure inspirée de (Vedhachalam *et al.*, 2007)).

2.2.2.3.2 Le transporteur ABCG1

La famille des transporteurs ABCG sont des demi-transporteurs qui nécessitent une homodimérisation ou une hétérodimérisation avec un autre membre de la famille ABCG pour former un complexe actif. Le transporteur ABCG1 est exprimé dans la plupart des tissus et, tout comme ABCA1, il joue un rôle-clé dans le transport du cholestérol et des phospholipides au niveau des macrophages (Schmitz *et al.*, 2001; Aye *et al.*, 2009). On peut le retrouver à l'état d'homodimère ou bien hétérodimérisé avec le transporteur ABCG4. Contrairement au transporteur ABCA1, ABCG1 transfère plutôt les lipides vers les particules de HDL, plus particulièrement les pré β -HDL, et ce mécanisme ne semble pas nécessiter une interaction directe avec le transporteur. L'expression des transporteurs impliqués dans l'efflux du cholestérol résulte toujours d'une réorganisation des lipides à la

membrane plasmique, mais le mécanisme d'efflux par le transporteur ABCG1 n'est pas encore très clair (Sankaranarayanan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2004). Une régulation à la baisse du gène ABCG1 inhibe l'efflux de cholestérol des macrophages vers les particules de HDL matures mais n'a aucun effet sur l'efflux dépendant de l'apoA-I (Vaughan & Oram, 2005; Wang *et al.*, 2004).

Des études ont montré que la lipidation de l'apoA-I par le transporteur ABCA1 au niveau des macrophages peut générer des particules de HDL naissantes (pré β -HDL) servant d'accepteurs du cholestérol pour le transporteur ABCG1. Ces résultats montrent que les transporteurs ABCA1 et ABCG1 peuvent agir de concert pour éliminer l'excès de cholestérol dans le macrophage et former des particules de HDL enrichies de lipides (Gelissen *et al.*, 2006; Vaughan & Oram, 2006; Lorenzi *et al.*, 2008) (*Figure 17*). Plus récemment, Lorenzi *et al.* ont montré que seulement une faible lipidation de l'apoA-I par l'ABCA1 est nécessaire pour produire un accepteur pour le transporteur ABCG1, mais que cet accepteur ne peut interagir avec le récepteur SR-BI (Lorenzi *et al.*, 2008). L'étude montre que le degré de lipidation de l'apoA-I et le contenu en phospholipides influencent grandement l'interaction des particules de HDL avec ABCG1 et SR-BI. Le transporteur ABCA1 génère des particules de HDL qui interagissent avec ABCG1, mais il reste à déterminer si ABCG1 produit des particules qui, à leur tour, interagissent avec le SR-BI (Lorenzi *et al.*, 2008).

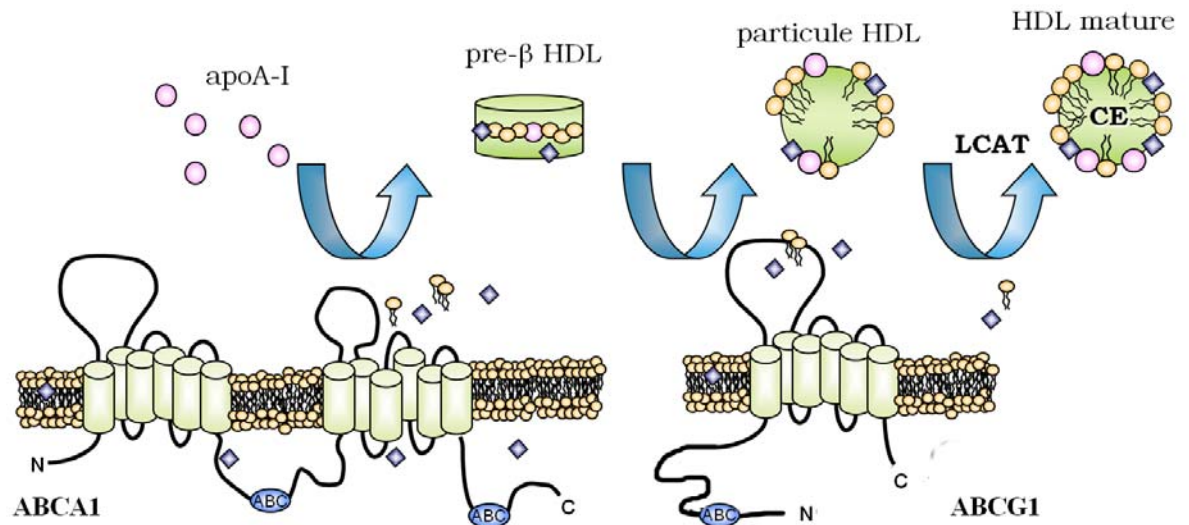


Figure 17. Les transporteurs ABCA1 et ABCG1 travaillent de concert pour transporter le cholestérol du macrophage vers les différents accepteurs extracellulaires

L'apoA-I pauvre en lipides interagit avec le transporteur ABCA1 exprimé à la surface des tissus périphériques. Cette réaction permet le transfert des phospholipides et du cholestérol ce qui entraîne la formation d'une particule naissante de HDL sous forme de disque. Cette pré-β HDL acquiert du cholestérol entre autres via le transporteur ABCG1 et l'activation de la LCAT par l'apoA-I entraîne l'estérification du cholestérol libre et mène à la formation d'une particule de HDL sphérique avec un noyau d'esters du cholestérol (Bujold K., 2011).

2.2.3 Transport inverse du cholestérol

2.2.3.1 Métabolisme du cholestérol au niveau hépatique

Comme le foie est le principal organe capable de métaboliser et d'éliminer le cholestérol excédentaire, le cholestérol provenant des macrophages doit être retourné au foie pour être éliminé sous sa forme native ou transformé sous forme d'acides biliaires (Toussaint *et al.*, 2003) (*Figure 18*). Les HDLs ont pour fonction de transporter ce cholestérol estérifié

jusqu'au foie, où il sera pris en charge par le récepteur SR-BI. Ce rôle dans le transport inverse du cholestérol, ou voie de retour, explique en partie les effets cardioprotecteurs des HDLs.

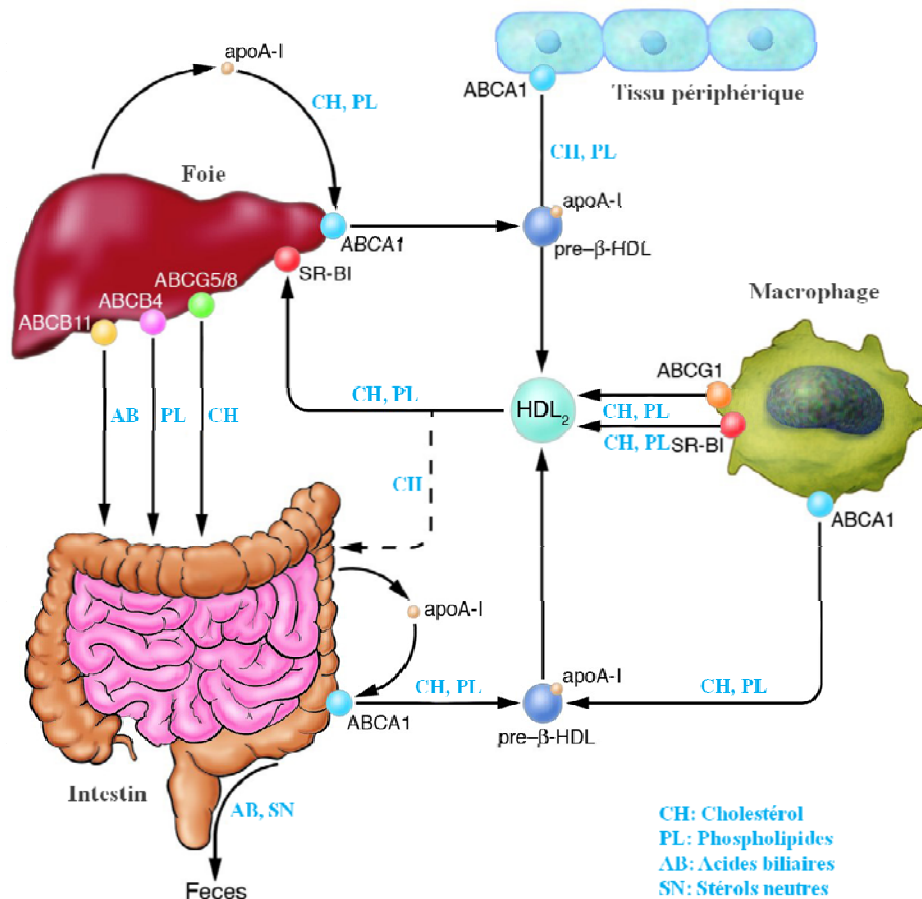


Figure 18. Transport inverse du cholestérol

Schéma synthèse des principales voies impliquées dans le transport inverse du cholestérol. L'apoA-I est sécrétée par le foie et l'intestin et acquiert du cholestérol et des phospholipides via le transporteur ABCA1 ce qui entraîne la formation des pré-β-HDL suivie des HDL₂. Les particules de HDL₂ acquièrent à leur tour du cholestérol et des phospholipides via ABCG1, et possiblement SR-BI. Les HDL transportent le cholestérol vers le récepteur SR-BI au niveau du foie. Le cholestérol est sécrété dans la bile sous sa forme libre ou sous forme d'acides biliaires puis est transporté vers l'intestin où il est réabsorbé ou excrété dans les fèces (Figure modifiée de (van der Velde & Groen, 2005)).

2.2.3.1.1 Le récepteur SR-BI

Le cholestérol est transporté par les particules de HDL, des macrophages jusqu'au foie. Le récepteur SR-BI se lie directement au HDL et capte sélectivement les esters de cholestérol contenu dans ces lipoprotéines, contrairement à la portion protéique des HDL qui est recyclée dans le compartiment sanguin (Acton *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1999; Hoekstra *et al.*, 2010). Le SR-BI, situé dans les cavéoles, est responsable de l'internalisation de la majorité des esters de cholestérol dans le compartiment hépatique (plus de 85%) (Rhainds *et al.*, 2003; Hoekstra *et al.*, 2010). Une fois dans le tissu hépatique, les esters de cholestérol sont hydrolysés, libérant du cholestérol libre qui est recyclé et utilisé soit dans la synthèse de nouvelles lipoprotéines, soit dans la formation des hormones stéroïdiennes ou bien éliminé dans la bile. Des études ont montré qu'une déficience en SR-BI est associée à une diminution de la capture des esters de cholestérol au niveau du foie, favorisant la formation de particules de HDL plus volumineuses enrichies d'esters de cholestérol (Out *et al.*, 2004; Rigotti *et al.*, 1997; Varban *et al.*, 1998). Au contraire, les souris surexprimant le récepteur SR-BI montrent une diminution des taux de HDL plasmatiques et une augmentation du cholestérol hépatique et biliaire (Kozarsky *et al.*, 1997; Ueda *et al.*, 1999). Ces études montrent que le SR-BI au niveau hépatique joue un rôle important dans le métabolisme des lipoprotéines, principalement les HDL, et dans le transport inverse du cholestérol.

2.2.3.1.2 L'enzyme 7 α -hydroxylase

La synthèse des acides biliaires au niveau hépatique est l'une des principales voies d'élimination du cholestérol excédentaire. La voie classique est orchestrée par l'enzyme 7 α -hydroxylase (CYP7a1), localisée dans le réticulum endoplasmique lisse des hépatocytes. La CYP7a1, active sous forme phosphorylée, constitue l'étape limitante qui transforme dans un premier temps le cholestérol en 7 α -hydroxycholestérol (Chiang, 2009a; Monte *et al.*, 2009). Une série d'enzymes, entre autres la CYP27a1 et la CYP8b1, participent ensuite à la synthèse des acides biliaires primaires, l'acide cholique et chénodésoxycholique. L'activité et l'expression de la CYP7a1 sont régulées par une boucle de rétroaction négative engendrée par les acides biliaires. L'activation du récepteur nucléaire *farnesoid x receptor* (FXR) par les acides biliaires hydrophobes inhibe l'activité des facteurs de transcription *liver receptor homolog-1* (LRH-1) et *hepatocyte nuclear factor-4 α* (HNF-4 α), ce qui inhibe la transcription de la CYP7a1 et par le fait même la synthèse des acides biliaires (Monte *et al.*, 2009; Chiang, 2009b). Le cholestérol peut aussi moduler la biosynthèse des acides biliaires en activant, sous forme d'oxystérol, le LXR contenu dans les hépatocytes. Cependant, des études ont montré que le LXR peut induire l'expression de la CYP7a1 chez le rongeur mais pas chez l'humain, dû à l'absence d'un LXRE dans le promoteur du gène humain (Lehmann *et al.*, 1997; Chiang *et al.*, 2001; Goodwin *et al.*, 2003).

2.2.3.1.3 Les transporteurs ABCG5/ABCG8

Les transporteurs ABCG5 et ABCG8 sont des demi-transporteurs, actifs sous forme d'hétérodimère, que l'on retrouve à la surface apicale des hépatocytes (membrane canaliculaire) et qui sont impliqués dans le transport du cholestérol et des phytostérols dans la bile. Une déficience en ABCG5/ABCG8 entraîne une sitostérolémie, soit une accumulation de cholestérol et de phytostérol plasmatique et tissulaire due à une diminution de leur excrétion biliaire et à une augmentation de leur absorption intestinale, tandis qu'une surexpression des transporteurs ABCG5 et ABCG8 entraîne une augmentation de la sécrétion des stérols dans la bile, une diminution des taux de cholestérol plasmatiques et une augmentation du transport inverse du cholestérol (Wu *et al.*, 2004). Ces transporteurs jouent donc un rôle important dans la sécrétion du cholestérol au niveau hépatique (Yu *et al.*, 2002a). Cependant, le modèle de souris transgénique avec une surexpression des transporteurs ABCG5/ABCG8 uniquement hépatique montre aussi une augmentation de la sécrétion des stérols dans la bile, sans toutefois réduire le développement des lésions athérosclérotiques (Wu *et al.*, 2004). Ces observations suggèrent que les transporteurs ABCG5/ABCG8 hépatiques ne sont pas suffisants pour diminuer les risques d'athérosclérose et que les transporteurs intestinaux sont essentiels au processus d'élimination du cholestérol.

2.2.3.1.4 Les transporteurs ABCB4 et ABCB11

Les transporteurs ABCB4 (*multidrug resistance P-glycoprotein 2*; MDR2) et ABCB11 (*bile salt export pump*; BSEP) sont impliqués dans le transport des phospholipides et des acides biliaires, respectivement (*Figure 18*). Le transporteur ABCB4 est responsable de la

translocation de la PC du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane canaliculaire (Dijkers & Tietge, 2010). En plus de l'absence de sécrétion de phospholipides chez les souris déficientes en ABCB4, la délétion du transporteur ABCB4 engendre une inhibition complète de la sécrétion du cholestérol dans la bile suggérant un rôle crucial d'ABCB4 dans ce processus (Smit *et al.*, 1993; Oude Elferink *et al.*, 1995; Oude Elferink *et al.*, 1996). Le transporteur ABCB11 est, quant à lui, crucial pour le transport des acides biliaires à travers les hépatocytes. Ce transporteur permet de maintenir à des niveaux peu élevés les concentrations intracellulaires d'acides biliaires qui pourraient être toxiques pour les cellules (Stieger, 2009). La surexpression du transporteur ABCB11 entraîne une augmentation de la sécrétion des acides biliaires chez les souris transgéniques (Wang *et al.*, 2010). Cependant, la délétion du gène ABCB11 inhibe seulement partiellement la sécrétion des acides biliaires, suggérant que d'autres transporteurs peuvent jouer un rôle compensatoire comme les transporteurs ABCB1a et ABCB1b (Wang *et al.*, 2003b).

2.2.3.2 Métabolisme du cholestérol au niveau intestinal

L'excrétion du cholestérol par la voie hépatobiliaire a longtemps été considérée comme la seule voie pouvant éliminer l'excédent de cholestérol de notre organisme. Cependant, depuis quelques années on reconnaît le rôle primordial de l'intestin dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol et la régulation des taux de cholestérol plasmatique. L'absorption du cholestérol au niveau intestinal a longtemps été considérée comme un processus passif. Toutefois, après l'hydrolyse des esters de cholestérol alimentaires et leur

solubilisation dans des micelles mixtes, le cholestérol est capté par différents transporteurs localisés à la membrane apicale des entérocytes comme le SR-BI, le CD36, le complexe annexine 2-cavéoline 1 (ANX2-CAV1) ainsi que le NPC1L1 (Garenc *et al.*, 2010) (Figure 19).

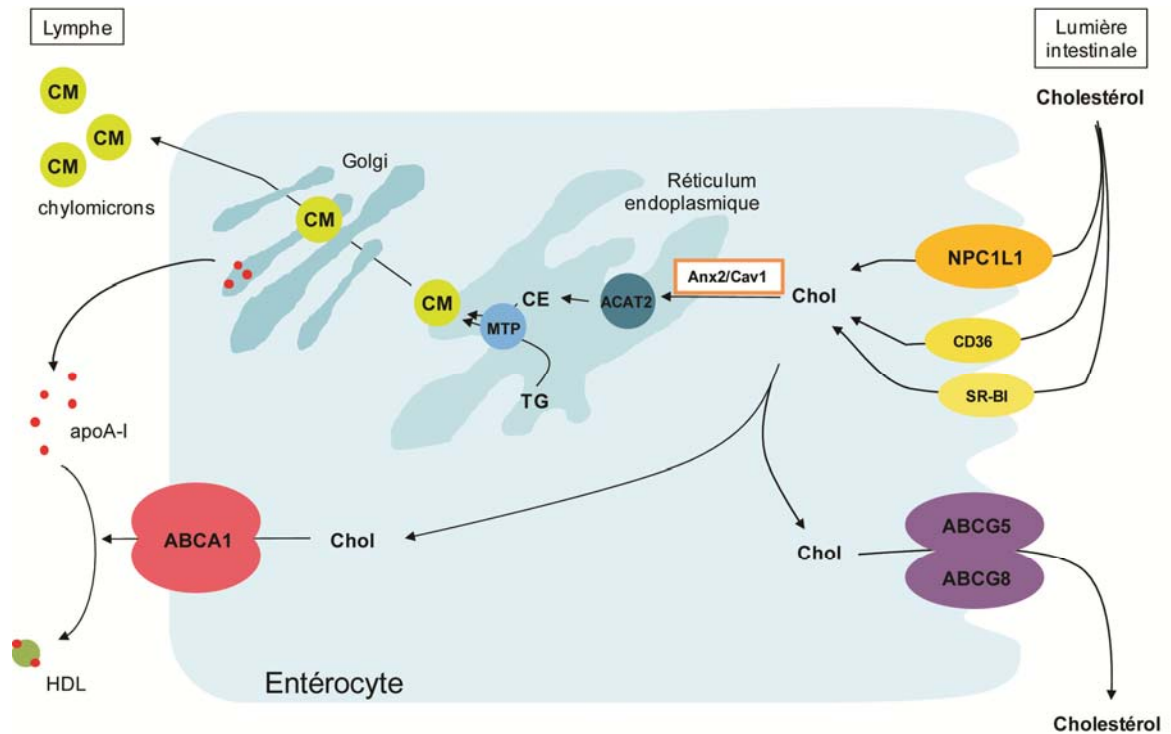


Figure 19. Schéma du métabolisme du cholestérol au niveau intestinal

Le cholestérol provenant de l'alimentation ou de la bile est internalisé par des transporteurs tels que le NPC1L1, SR-BI et le CD36, tous exprimés à la surface des entérocytes. L'excédent de cholestérol est resécrété dans la lumière intestinale via les transporteurs ABCG5/ABCG8 pour être éliminé dans les fèces. Du côté de la membrane basolatérale, le transporteur ABCA1 transporte le cholestérol vers les particules d'apoA-I, favorisant la formation des particules de HDL. Le cholestérol libre est estérifié par l'enzyme ACAT2 et les esters de cholestérol sont incorporés dans les chylomicrons à l'aide de la MTP pour être sécrétés dans la circulation via le système lymphatique. Chol : cholestérol, CE : esters de cholestérol, TG : triglycérides et CM : chylomicrons (Figure inspirée de (Plosch *et al.*, 2005; Ravid *et al.*, 2008)).

2.2.3.2.1 Les récepteurs scavengers : SR-BI et CD36

Les récepteurs *scavengers* de type B sont exprimés à la membrane à bordure en brosse des entérocytes, à la surface apicale (Levy *et al.*, 2007; Ravid *et al.*, 2008). Le récepteur SR-BI est localisé principalement dans la partie proximale du petit intestin (Cai *et al.*, 2001; Lobo *et al.*, 2001; van *et al.*, 2005), tandis que la distribution du récepteur CD36 au niveau intestinal est ambiguë. Certaines études montrent que le récepteur CD36 est exprimé tout au long du petit intestin, avec une expression maximale dans le jéjunum (van *et al.*, 2005; Lobo *et al.*, 2001; Poirier *et al.*, 1996). Cependant, Nassir *et al.* ont montré que le CD36 est principalement exprimé dans le premier tiers proximal (duodénum et début du jéjunum), et que son expression diminue tout au long de l'intestin jusqu'à ce qu'il ne soit presque plus détectable, dans la partie la plus distale (Nassir *et al.*, 2007). Il a été montré que les récepteurs CD36 et SR-BI participent à l'internalisation du cholestérol libre dans les entérocytes. Cependant, le CD36 contribue à 40% de l'internalisation du cholestérol tandis que le SR-BI contribue à seulement 25%, suggérant qu'un ou plusieurs autres transporteurs jouent un rôle dans la capture des stérols (Werder *et al.*, 2001). De plus, une étude a montré que l'absence des récepteurs CD36 et SR-BI n'affecte pas l'absorption intestinale nette du cholestérol malgré leur rôle dans le transport du cholestérol (Nguyen *et al.*, 2009). Leur rôle dans l'absorption intestinale reste controversé.

2.2.3.2.2 Le transporteur ABCA1

Le transporteur ABCA1 est aussi exprimé dans l'intestin. Des études avaient tout d'abord suggéré qu'ABCA1 était localisé à la surface apicale des entérocytes (Repa *et al.*, 2000b), mais des études plus récentes ont permis de mettre en évidence la présence du transporteur à la membrane basolatérale (Mulligan *et al.*, 2003; Ohama *et al.*, 2002). Le transporteur ABCA1 exporte le cholestérol des entérocytes vers les particules d'apoA-I plasmatiques (Levy *et al.*, 2007). D'une part, la délétion intestinale d'ABCA1 a montré l'importance de ce transporteur dans la biogenèse des particules de HDL. Les études ont montré une diminution de 30% des niveaux plasmatiques de HDL ainsi qu'une diminution de l'absorption du cholestérol (Brunham *et al.*, 2006). D'autre part, plusieurs études ont montré que la surexpression d'ABCA1 inhibent l'absorption du cholestérol suggérant que le transporteur joue un rôle dans l'absorption intestinale en modulant la formation des HDL, cependant cette théorie reste controversée (Drobnik *et al.*, 2001; Mulligan *et al.*, 2003; Groen *et al.*, 2001; Levy *et al.*, 2007; Iqbal & Hussain, 2009).

2.2.3.2.3 Les transporteurs ABCG5/ABCG8

En plus de stimuler la sécrétion du cholestérol au niveau hépatique, les transporteurs ABCG5 et ABCG8 limitent l'absorption intestinale en favorisant l'efflux du cholestérol, c'est-à-dire en exportant le cholestérol des entérocytes vers la lumière intestinale pour être éliminé (Lee *et al.*, 2001; Hui *et al.*, 2008). Tout comme les transporteurs au niveau du foie, la mobilisation à la surface apicale d'ABCG5 et ABCG8, principalement exprimés dans l'intestin au niveau du jéjunum, nécessite leur hétérodimérisation pour former un complexe actif (Yu *et al.*, 2002b). La surexpression ou l'induction pharmacologique

d'ABCG5/ABCG8 a montré une diminution de l'absorption intestinale, tout en augmentant l'excrétion du cholestérol dans les fèces (Yu *et al.*, 2002b; Yu *et al.*, 2003). Au contraire, une délétion ou une mutation des transporteurs ABCG5 et ABCG8 entraîne une augmentation de l'absorption intestinale du cholestérol (sitostérolémie), prédisposant au développement de l'athérosclérose (Yu *et al.*, 2002a; Lee *et al.*, 2001; Berge *et al.*, 2000). Ces études ont montré le rôle important de ces transporteurs dans le métabolisme du cholestérol au niveau intestinal (*Figure 19*).

2.2.3.2.4 Le transporteur NPC1L1

En 2004, Altmann *et al.* ont identifié un transporteur transmembranaire impliqué dans l'absorption du cholestérol, le transporteur NPC1L1 (Altmann *et al.*, 2004). Le NPC1L1 est principalement localisé dans des compartiments vésiculaires intracellulaires. Lorsque les concentrations intracellulaires de cholestérol sont faibles, le transporteur subit une translocation à la membrane plasmique apicale des entérocytes au niveau du jéjunum (Altmann *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2006; Davis, Jr. & Altmann, 2009). Des études chez les souris déficientes en NPC1L1 ont montré une réduction de plus de 70% de l'absorption intestinale du cholestérol, confirmant que le NPC1L1 joue un rôle important dans ce processus (Altmann *et al.*, 2004; Hui *et al.*, 2008) (*Figure 16*). Le NPC1L1 participe à l'absorption du cholestérol en facilitant le transport intracellulaire du cholestérol de la membrane plasmique au réticulum endoplasmique, où le cholestérol est estérifié par l'enzyme ACAT2 puis assemblé dans les chylomicrons sous l'action de la protéine microsomale de transfert des triglycérides (MTP) pour être sécrété dans la circulation

lymphatique (Field *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2011). L'inhibition de l'activité du transporteur NPC1L1 par l'ezetimibe entraîne une diminution du transport du cholestérol vers le compartiment intracellulaire, une diminution de l'estérfication du cholestérol et de son assemblage dans les chylomicrons (Hui *et al.*, 2008).

2.2.3.3 Rôle des récepteurs nucléaires dans l'homéostasie du cholestérol

La superfamille des récepteurs nucléaires regroupent des facteurs de transcription qui sont activés principalement par de petits ligands lipophiles comme les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes ou bien par des acides gras et leurs dérivés ainsi que les oxystérols. Ce sont des facteurs de transcription qui, une fois liés à leur ligand, se fixent à l'ADN spécifique des gènes qu'ils régulent pour en modifier l'activité transcriptionnelle (Francis *et al.*, 2003). Plusieurs récepteurs nucléaires sont impliqués dans la pathologie de l'athérosclérose, cependant nous allons mettre l'emphase sur le LXR et le PPAR qui sont tous deux exprimés dans les macrophages et qui régulent l'expression des gènes impliqués dans le transport des lipides.

Les récepteurs LXR et PPAR s'hétérodimérisent avec le *retinoic X receptor* (RXR). En l'absence de ligand, l'hétérodimère est associé à un complexe de co-répresseurs (par exemple NcoR, SMRT), lié ou non à l'ADN (Francis *et al.*, 2003; Feige & Auwerx, 2007). Suite à la liaison d'un ligand, les récepteurs subissent un changement conformationnel qui mène à la dissociation des co-répresseurs, l'association des co-activateurs (par exemple

PGC-1, p300/CBP) et à l'hétérodimérisation du récepteur. L'activation des récepteurs nucléaires régule alors la transcription des gènes cibles (Francis *et al.*, 2003).

2.2.3.3.1 Rôle du LXR dans le métabolisme des lipides

Le LXR α (*nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3*; NR1H3) et le LXR β (NR1H2) sont des récepteurs nucléaires qui jouent un rôle prépondérant dans l'homéostasie du cholestérol. Le LXR α est fortement exprimé au niveau du foie mais est aussi dans les macrophages tandis que le LXR β est plutôt distribué de façon ubiquitaire; ces récepteurs sont activés par les dérivés oxydés du cholestérol, les oxystérols (Repa & Mangelsdorf, 2002; Janowski *et al.*, 1996). Comme mentionné ci-haut, lorsque le ligand se lie au LXR, le récepteur s'hétérodimérise avec le RXR et forme un complexe actif qui se fixe à un élément de réponse, le LXRE, pour induire la transcription de différents gènes. Le LXR est reconnu pour avoir des effets pléiotropiques sur la régulation des gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol et des acides gras, dans l'inflammation ainsi que dans l'immunité innée (Repa & Mangelsdorf, 2002; Zelcer & Tontonoz, 2006) (*Figure 20*).

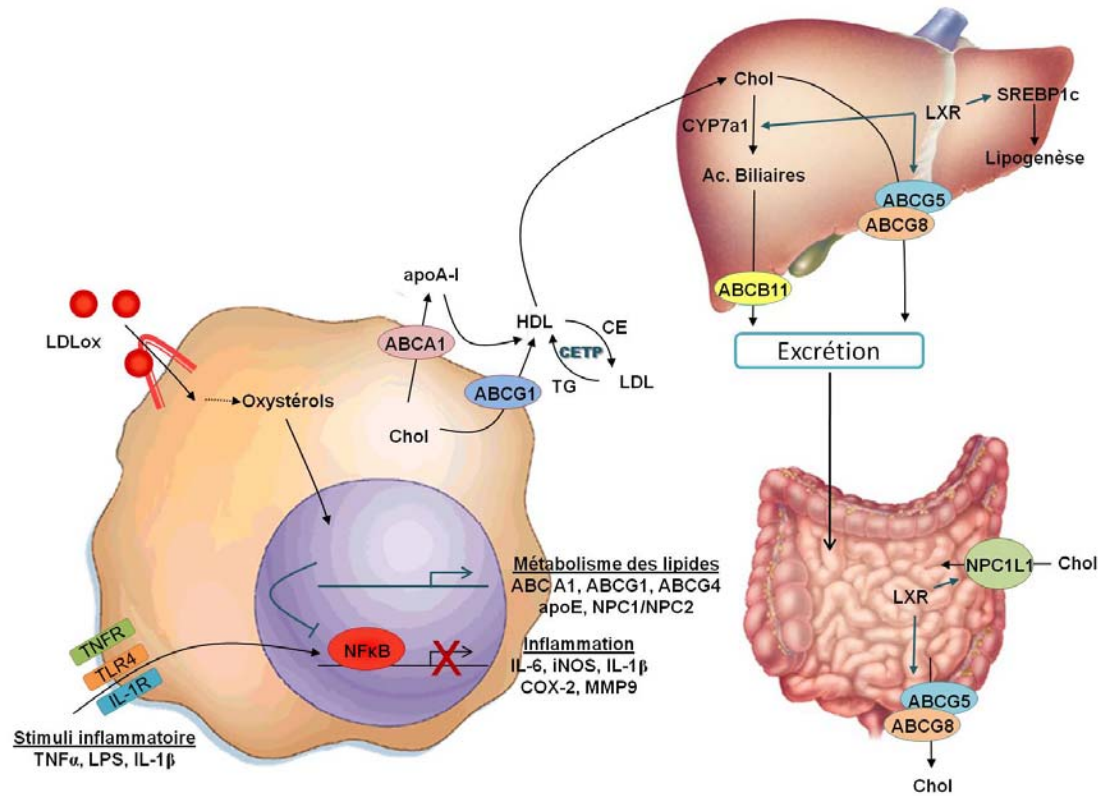


Figure 20. Rôle du LXR dans le métabolisme des lipides et l'inflammation

LXR régule l'expression des gènes impliqués dans l'efflux du cholestérol au niveau des macrophages, dans le métabolisme des lipides hépatique et intestinal et dans la lipogenèse. De plus, LXR inhibe l'expression des médiateurs inflammatoires induits par le LPS ou les cytokines pro-inflammatoires. Chol : cholestérol, CE : esters de cholestérol, TG : triglycérides, **X** : bloque la transcription (Figure inspirée de (Tontonoz & Mangelsdorf, 2003; Castrillo & Tontonoz, 2004)).

Dans les macrophages, le rôle du LXR est de maintenir l'homéostasie du cholestérol en régulant l'expression des gènes impliqués dans l'efflux du cholestérol, comme les transporteurs ABCA1, ABCG1 et ABCG4 de même que l'apoE, permettant ainsi de minimiser l'accumulation de cholestérol intracellulaire (Venkateswaran *et al.*, 2000b;

Venkateswaran *et al.*, 2000a; Laffitte *et al.*, 2001; Mak *et al.*, 2002). De plus, le LXR favorise une redistribution du cholestérol du compartiment endosomal vers la membrane plasmique en augmentant l'expression des transporteurs *Niemann-Pick C1* (NPC1) et C2 (NPC2) (Rigamonti *et al.*, 2005; Beltowski, 2008). La délétion du récepteur LXR α est associée à une diminution de l'efflux du cholestérol des macrophages due à l'absence de régulation des transporteurs ABC (Repa *et al.*, 2000b; Laffitte *et al.*, 2001). Ces études montrent que le LXR α /RXR est indispensable pour le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans le macrophage. En plus de promouvoir l'efflux du cholestérol, l'activation du LXR par des ligands synthétiques, comme le T0901317 et le GW3965, induit le transport inverse du cholestérol en régulant à la hausse l'expression de l'enzyme CYP7a1, impliquée dans la biosynthèse des acides biliaires (Chiang *et al.*, 2001), ainsi que l'expression des gènes ABCG5 et ABCG8 impliqués dans le transport du cholestérol du compartiment hépatique vers l'intestin puis dans les fèces (Kalaany & Mangelsdorf, 2006; Zanotti *et al.*, 2008; Naik *et al.*, 2006; Calpe-Berdiel *et al.*, 2008). De plus, le LXR entraîne une diminution de l'absorption du cholestérol au niveau intestinal en modulant l'expression du transporteur NPC1L1 (Duval *et al.*, 2006). Ces effets sur le métabolisme et le transport des lipides sont en partie responsables des effets anti-athérosclérotiques observés chez les souris traitées avec des ligands synthétiques du LXR (Joseph *et al.*, 2002b; Terasaka *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2008; Ou *et al.*, 2008; Verschuren *et al.*, 2009; Kratzer *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2010; van der Hoorn *et al.*, 2011; Peng *et al.*, 2011).

L'activation du LXR module aussi l'expression de deux protéines impliquées dans le « remodelage » des lipoprotéines plasmatiques, la protéine CETP et la protéine de transfert des phospholipides (PLTP) (Beltowski, 2008). La CETP est responsable du transfert des esters de cholestérol des particules de HDL vers les VLDL et les LDL, en échange de triglycérides (Klerkx *et al.*, 2006). Quant à la PLTP, elle est plutôt impliquée dans le transport de phospholipides des VLDL et des résidus de chylomicrons vers les particules de HDL et d'apoA-I, et même entre les différentes sous-fractions de HDL favorisant la formation des préβ-HDL (Stein & Stein, 2005). Les ligands du LXR augmentent l'expression de la CETP ce qui entraîne une augmentation des taux de LDL circulants (Groot *et al.*, 2005). De plus, l'activation du LXR augmente l'expression de la PLTP, ce qui entraîne une augmentation des phospholipides dans les particules de HDL, mais contribue aussi aux effets hypertriglycéridémiques des ligands du LXR puisque la PLTP participe à la formation des VLDL (Laffitte *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 2002).

Le LXR joue aussi un rôle dans la lipogenèse. L'activation du LXR favorise la synthèse des acides gras en régulant l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse comme SREBP1c, *fatty acid synthase* (FAS), *stearoyl-CoA desaturase* (SCD-1) et *acyl-CoA carboxylase* (ACC) (Chen *et al.*, 2004; Joseph *et al.*, 2002b; Li & Glass, 2004; Repa *et al.*, 2000a; Beltowski, 2008; Cha & Repa, 2007), ce qui résulte en une accumulation accrue de triglycérides dans le foie menant à une stéatose hépatique et une hausse des taux de VLDL et de triglycérides plasmatiques (Schultz *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2004; Joseph *et al.*, 2002b; Terasaka *et al.*, 2003; Grefhorst *et al.*, 2002).

Outre ces effets sur le métabolisme lipidique, l'activation du récepteur nucléaire LXR inhibe la cascade inflammatoire engendrée par différents stimuli (LPS, TNF α et IL-1 β) en diminuant l'expression des gènes pro-inflammatoires comme le iNOS, COX-2, IL-6, MCP-1 et MMP-9 (Joseph *et al.*, 2003; Calkin & Tontonoz, 2010; Castrillo *et al.*, 2003). Ces effets anti-inflammatoires seraient attribuables à une inhibition (transrépression) du facteur de transcription NF κ B (Castrillo *et al.*, 2003; Ghisletti *et al.*, 2009).

2.2.3.3.2 Rôle du PPAR dans la pathogenèse de l'athérosclérose et dans le métabolisme du cholestérol

Il existe trois différentes isoformes pour le récepteur PPAR (Francis *et al.*, 2003): le PPAR α (*nuclear receptor subfamily 1, group C, member 1*; NR1C1) (Wang *et al.*, 2011), le PPAR β/δ (NR1C2) (Schmidt *et al.*, 1992) et le PPAR γ (NR1C3) (Fajas *et al.*, 1997). Le PPAR γ 1 est fortement exprimé dans le tissu adipeux, le colon et les macrophages, surtout dans les macrophages gorgés de gouttelettes lipidiques au niveau des lésions athérosclérotiques (Francis *et al.*, 2003; Ricote *et al.*, 1998a; Tontonoz *et al.*, 1998). Le PPAR γ 2 est, quant à lui, exprimé exclusivement dans le tissu adipeux blanc et est impliqué dans la différenciation des adipocytes (Fajas *et al.*, 1998). Les PPAR sont des récepteurs nucléaires impliqués, entre autres, dans la différenciation cellulaire, le métabolisme des lipides et des hydrates de carbone, l'oxydation des acides gras, la sensibilité à l'insuline ainsi que l'inflammation. Dans le cadre de cette thèse, nous allons mettre l'emphase sur le PPAR γ et son rôle dans la régulation du métabolisme lipidique dans les macrophages et dans le développement de l'athérosclérose (*Figure 21*). Les acides gras polyinsaturés

(acides linoléique et arachidonique) et leurs dérivés, comme le 15d-PGJ₂ et les acides 9- et 13-HODE provenant de la dégradation des LDLox, sont les ligands naturels du PPAR γ (Kliwer *et al.*, 1997; Nagy *et al.*, 1998). Tout comme le récepteur LXR, le PPAR γ se lie à l'élément de réponse (PPRE) des gènes cibles, sous forme d'hétérodimère avec le RXR (Francis *et al.*, 2003).

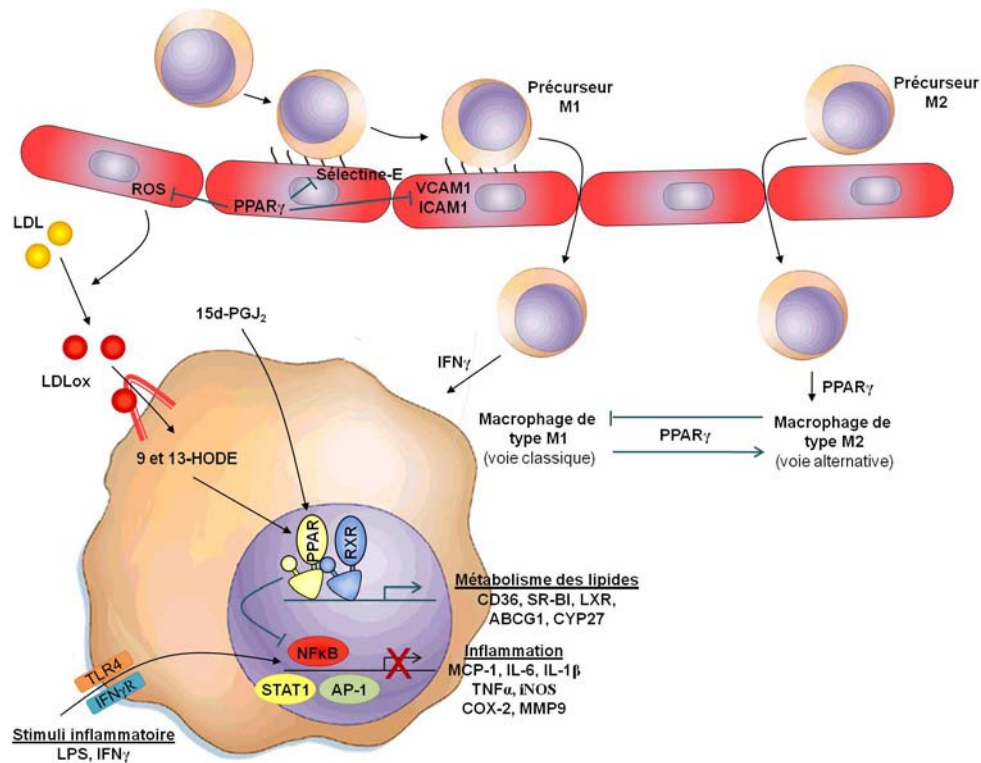


Figure 21. Rôle du PPAR γ dans l'athérosclérose

PPAR γ joue un rôle clé dans le métabolisme des lipides au niveau des macrophages et régule, via l'activation du récepteur LXR, les gènes impliqués dans l'efflux du cholestérol. L'activation du PPAR γ inhibe l'activité du NF κ B dans les macrophages et les cellules endothéliales ce qui diminue d'une part la réponse inflammatoire et d'autre part, la migration des monocytes dans l'espace sous-endothélial due à une diminution de l'expression des molécules d'adhérence à la surface des cellules endothéliales. De plus, PPAR γ favoriserait la polarisation des macrophages en macrophages de type M2. **X**: bloque la transcription (Figure inspirée de (Duan *et al.*, 2009)).

Dans les macrophages, l'activation du PPAR γ entraîne une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique comme le CD36 (Nagy *et al.*, 1998; Tontonoz *et al.*, 1998) et le récepteur SR-BI (Chinetti *et al.*, 2000). L'augmentation du récepteur CD36 favorise cependant l'internalisation des LDLox menant à la formation des cellules spumeuses. Or, le traitement avec des ligands du PPAR γ montre plutôt des effets anti-athérosclérotiques (Li *et al.*, 2000). Ces effets s'expliquent, entre autres, par l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le transport inverse du cholestérol comme les transporteurs ABCA1 et ABCG1, possiblement en activant la voie du récepteur LXR (Chawla *et al.*, 2001a; Chinetti *et al.*, 2001). Cependant, une étude a montré que le transporteur ABCG1 est régulé par les agonistes du PPAR γ même chez les souris déficientes en LXR, suggérant que l'activation de l'ABCG1 peut être régulée par des voies dépendante et indépendante du LXR (Li & Glass, 2004). De plus, l'activation du PPAR γ régule à la hausse l'expression de l'enzyme CYP27 impliquée dans la synthèse du 27-hydroxycholestérol, un ligand du LXR (Szanto *et al.*, 2004). Les ligands synthétiques du PPAR γ (thiazolidinediones) et du LXR (T0901317 et GW3965) diminuent le développement de l'athérosclérose en stimulant l'efflux du cholestérol dans les macrophages (Li *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001b; Terasaka *et al.*, 2003; Joseph *et al.*, 2002b). Des études ont montré d'une part que l'activation de LXR α dans un modèle de souris déficientes en PPAR γ entraîne une augmentation de l'expression d'ABCA1 et ABCG1, indiquant que le PPAR γ est un intermédiaire dans ce processus. D'autre part, cette même étude a montré que les deux récepteurs nucléaires coopèrent entre eux pour réguler l'expression d'ABCA1 ainsi que l'efflux du cholestérol (Chawla *et al.*,

2001a). De plus, une délétion du gène PPAR γ dans le macrophage résulte en une diminution de l'expression d'ABCA1, ABCG1 ainsi qu'en une diminution de l'efflux du cholestérol, suggérant que le PPAR γ module l'efflux du cholestérol que ce soit directement ou indirectement (Akiyama *et al.*, 2002).

En plus d'induire l'efflux du cholestérol, le PPAR γ module l'expression des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, un processus intimement lié à l'athérosclérose. L'activation du PPAR γ inhibe non seulement l'expression de certaines cytokines comme le MCP-1 et l'IL-6 dans les macrophages et les cellules endothéliales, mais elle inhibe aussi l'expression endothéliale de certaines molécules d'adhérences comme VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1 et la sélectine-E (van Bilsen & van Nieuwenhoven, 2010; Hamblin *et al.*, 2009). Puisque ces molécules d'adhérence et ces cytokines sont nécessaires à la migration des monocytes, les effets engendrés par les ligands du PPAR γ entraînent une diminution de la migration des monocytes dans l'espace sous-endothélial (Pasceri *et al.*, 2000; Pasceri *et al.*, 2001). De plus, l'activation du PPAR γ entraîne la différenciation des monocytes en macrophages activés par la voie alternative, les macrophages de type M2, en réduisant l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-6 et l'IL-1 β (Bouhlef *et al.*, 2007; Bouhlef *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 1998). Les ligands du PPAR γ atténuent la réponse inflammatoire en inhibant les facteurs de transcription impliqués dans le processus d'inflammation comme NF κ B, protéine activatrice 1 (AP-1) et STAT-1 (Hamblin *et al.*, 2009). D'une part, le PPAR γ , une fois activé, interagit directement avec la sous-unité p65 du NF κ B ainsi qu'avec la sous-unité c-Jun de AP-1, prévenant la liaison de ces deux

facteurs de transcription à leur élément de réponse respectif (van Bilsen & van Nieuwenhoven, 2010). D'autre part, la liaison des ligands engendre une modification post-traductionnelle au niveau du récepteur PPAR γ (SUMOylation) permettant la formation d'un complexe stable avec les co-répresseurs NCor/SMRT et l'histone désacétylase 3 (HDAC3) (Pascual *et al.*, 2005; Stuart *et al.*, 2005b; van Bilsen & van Nieuwenhoven, 2010). Ces mécanismes confèrent au récepteur PPAR γ des propriétés anti-inflammatoires, diminuant l'expression des cytokines pro-inflammatoires mais aussi l'expression de gènes comme iNOS et COX-2 (Pascual *et al.*, 2005; Inoue *et al.*, 2000; Maggi, Jr. *et al.*, 2000).

2.2.3.4 Différentes stratégies pour moduler le transport inverse du cholestérol : une cible thérapeutique pour le traitement de l'athérosclérose

La relation entre le transport inverse du cholestérol et le développement de l'athérosclérose a d'abord été suggérée par Ross et Glomset (Ross & Glomset, 1973), qui ont émis l'hypothèse que le développement des lésions athérosclérotiques survient quand il y a un déséquilibre dans l'homéostasie du cholestérol dans la paroi artérielle suite à une dysfonction endothéliale. Plusieurs études ont montré qu'il existe une relation inverse entre les concentrations plasmatiques et la fonctionnalité (qualité) des particules de HDL et les maladies cardiovasculaires, particulièrement l'athérosclérose (Tall *et al.*, 2008; Rothblat & Phillips, 2010). Les effets anti-athérosclérotiques des HDL proviennent, en partie, de leur capacité d'induire le transport inverse du cholestérol. Comme l'efflux du cholestérol est l'étape initiale du transport inverse, la première stratégie est de stimuler l'efflux du cholestérol dans les macrophages en modulant l'expression des transporteurs ABC (Khera

et al., 2011). De plus, l'augmentation du taux plasmatique des HDL ainsi que leur efficacité/fonctionnalité est une autre stratégie favorisant le transport du cholestérol des macrophages vers les particules de HDL puis vers le foie. Enfin, une augmentation du métabolisme hépatique et de l'excrétion intestinale favorise le transport du cholestérol jusqu'à l'excrétion dans les fèces (*Figure 22*).

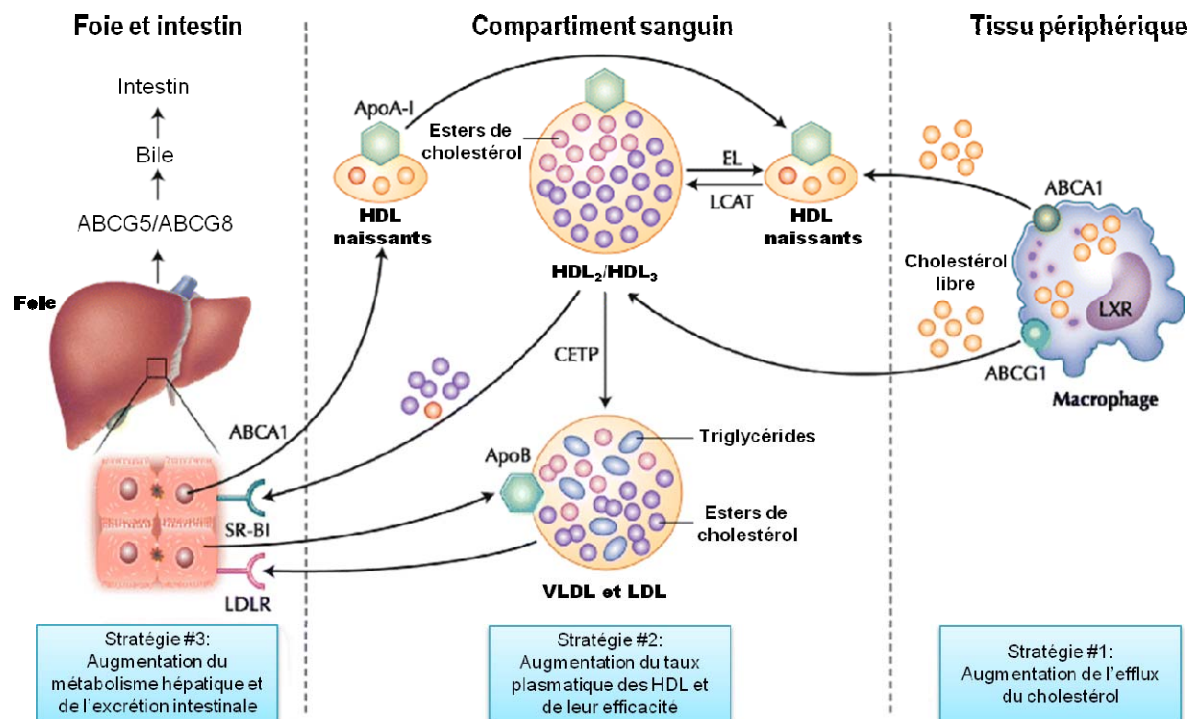


Figure 22. Régulation du transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie et l'intestin

Différentes stratégies sont utilisées pour moduler le transport inverse du cholestérol : l'augmentation de l'efflux du cholestérol dans les macrophages, l'augmentation du taux plasmatique des HDL ainsi que leur efficacité et l'augmentation du métabolisme hépatique et de l'excrétion intestinale (*Figure modifiée de (Khera et al., 2011)*).

Une méthode pour mesurer quantitativement le transport inverse du cholestérol chez la souris a été développée dans le laboratoire du professeur Rader à l'Université de Pennsylvanie (Zhang *et al.*, 2003). Le principe consiste à injecter des macrophages, préalablement radiomarqués avec du cholestérol tritié, dans la cavité péritonéale des souris. Par la suite, des échantillons de sang sont prélevés en fonction du temps, ainsi que les organes et les fèces lors du sacrifice de manière à suivre le traceur radioactif, qui voyage des cellules injectées vers la circulation puis vers la circulation, le foie puis excrété dans la bile et dans les fèces.

D'une part, des études effectuées avec les agonistes synthétiques du LXR ont permis de montrer que l'activation du récepteur LXR induit une augmentation du transport inverse *in vivo* en augmentant l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1 dans le macrophage, favorisant l'efflux du cholestérol (Naik *et al.*, 2006; Zanotti *et al.*, 2008; Calpe-Berdiel *et al.*, 2008). D'autre part, le développement de composés pouvant augmenter les concentrations plasmatiques de HDL et leur capacité à exporter le cholestérol vers le foie a aussi permis de montrer une augmentation du transport inverse du cholestérol *in vivo*. Les agonistes du PPAR α , comme les fibrates et le LY518764, induisent une augmentation de la concentration des HDL et apoA-I, ainsi que la grosseur des HDL et l'activité de la PLTP (Rotllan *et al.*, 2011; Millar *et al.*, 2009; Nissen *et al.*, 2007a). Les inhibiteurs de la CETP sont aussi une bonne alternative pour augmenter la concentration de HDL plasmatique, puisqu'on prévient le transfert des esters de cholestérol des HDL vers les LDL/VLDL. Cependant, une étude clinique avec les inhibiteurs de la CETP s'est révélée être un échec

en phase clinique 3, le traitement étant associé à une augmentation de la mortalité et des événements cardiovasculaires possiblement lié à un effet hors cible causant une augmentation de la pression artérielle (Barter *et al.*, 2007; Khera *et al.*, 2011). La troisième stratégie pour moduler le transport inverse du cholestérol consiste à moduler le métabolisme du cholestérol au niveau hépatique et intestinal. Différents composés, tels que l'huile de poisson, les statines et les fibrates, induisent une augmentation de l'expression des transporteurs ABCG5/ABCG8, entraînant une augmentation de l'excrétion hépatique du cholestérol et/ou une diminution de l'absorption intestinale (Nishimoto *et al.*, 2009; Kamisako & Ogawa, 2004; Roglans *et al.*, 2004). Les effets sur la diminution de l'absorption du cholestérol peuvent aussi être secondaires à une inhibition du transporteur NPC1L1 tel que montrée avec l'ezetimibe et les agonistes du PPAR δ (Sehayek & Hazen, 2008; Briand *et al.*, 2009). De plus, les ligands du récepteur LXR entraînent non seulement une augmentation de l'efflux du cholestérol par les macrophages, mais ils augmentent l'expression des transporteurs ABCG5/ABCG8, favorisant l'excrétion intestinale du cholestérol (van der Veen *et al.*, 2009). Le tableau 3 résume les différents composés utilisés pour étudier le transport inverse *in vivo* chez l'humain.

Tableau 3. Effets de différents composés sur le transport inverse du cholestérol *in vivo*

Stratégie thérapeutique	Effet sur taux de HDL plasmatique	Effet sur RCT <i>in vivo</i>	Effet sur athérosclérose	Mécanismes	Limitations
Stratégie #1 : Augmentation de l'efflux du cholestérol					
Agonistes LXR	Variable	↑	↓	↑ efflux via ABCA1 et ABCG1 pourrait ↑ excrétion intestinale	stéatose hépatique (agoniste non-sélectif)
Stratégie #2 : Augmentation du taux plasmatique des HDL et de leur efficacité					
Agonistes PPAR α	Variable	↑	?	↑ de la production/turnover apoA-I ↑ efflux	effets non-spécifiques risques chez l'humain
Infusion apoA-I/HDL reconstitué	↑	?	↓	Induit le transport inverse Stabilité de la plaque	administration i.v. efficacité limitée chez l'humain
Peptide mimétique apoA-I	Aucun	↑	↓	<i>idem</i> précédent administration orale	biodisponibilité modeste efficacité limitée chez l'humain
Inhibition CETP	↑	Variable	?	prévient le transfert des CE vers les lipoprotéines riches en TG ↑taux HDL	effet sur RCT incertain échec étude clinique phase 3
Inhibition lipase endothéliale	↑	?	?	↓ hydrolyse PL des HDL ↓ catabolisme des HDL	effet sur RCT incertain nécessite petite molécule inhibitrice
Stratégie #3 : Augmentation du métabolisme hépatique et de l'excrétion intestinale					
Ezetimibe	Aucun	↑	↓	inhibe NPC1L1 ↓ absorption intestinale	données limitées sur les essais cliniques chez l'humain
Agonistes PPAR δ	↑	↑	?	↓ absorption intestinale pourrait améliorer clairance des TG	on ne connaît pas les mécanismes qui ↑ taux HDL données limitées chez l'humain
Huile de poisson	↑	↑	↓	↓ absorption intestinale ↑ excrétion hépatique de cholestérol via ABCG5/ABCG8	incertitude si les effets bénéfiques sont liés aux effets sur RCT

(Tableau traduite de (Khera *et al.*, 2011))

3 Hypothèses de travail et objectifs

Les macrophages jouent un rôle crucial dans la formation des cellules spumeuses notamment dans le développement de l'athérosclérose et l'implication du récepteur CD36 dans cette pathologie a été clairement établie. Des études effectuées dans le laboratoire du Dr. Ong ont permis de montrer que les sécrétines de l'hormone de croissance sont des ligands du récepteur CD36 (Bodart *et al.*, 2002) qui possèdent un site de liaison qui chevauche celui des LDLox (Demers *et al.*, 2004). Cependant, aucune étude n'avait montré les effets potentiels de la liaison des GHRPs au CD36 sur la progression des lésions athérosclérotiques et le métabolisme lipidique au niveau des macrophages. Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse ont pour objectif principal d'évaluer le potentiel anti-athérosclérotique du EP 80317, en tant que ligand sélectif du récepteur CD36, et de documenter ses effets sur le métabolisme des lipides au niveau des macrophages.

La première hypothèse de travail est que les GHRPs, en tant que ligands sélectifs du CD36, pourraient diminuer le développement de l'athérosclérose en modulant le métabolisme des lipides au niveau des macrophages. Le premier objectif était de déterminer les effets d'un traitement chronique avec le EP 80317 sur le développement de l'athérosclérose chez un modèle de souris déficientes en apoE. Cette étude nous a conduits à évaluer les effets du EP 80317 sur les protéines impliquées dans le métabolisme lipidique au niveau des macrophages et dans le transport des LDLox (article 1, chapitre 4).

Considérant l'importance des macrophages dans le développement de l'athérosclérose, notre deuxième hypothèse de travail était que l'activation du récepteur CD36 par le EP 80317 pourrait entraîner une cascade de signalisation menant à l'activation de la voie

PPAR γ -LXR α -transporteurs ABC dans les macrophages. Les objectifs ont été : 1) d'étudier l'effet du EP 80317 sur l'efflux du cholestérol et des phospholipides dans les macrophages *in vitro* et *ex vivo* ainsi que les mécanismes impliqués dans cette régulation, notamment la régulation de l'expression des facteurs de transcription et des transporteurs ABC. 2) d'élucider la cascade de signalisation induite par l'activation du CD36 par le EP 80317 en amont de l'activation du PPAR γ et de la régulation à la hausse des transporteurs ABC impliqués dans l'efflux des lipides (article 2, chapitre 5).

Comme l'efflux du cholestérol est la première étape du transport inverse et que nos études avaient montré une augmentation de l'efflux après un traitement prolongé avec le EP 80317, notre hypothèse de travail pour cette troisième étude est que les ligands du CD36 pourraient activer le transport inverse du cholestérol en modulant son métabolisme au niveau hépatique et intestinal. Cette étude vise notamment à étudier les effets d'un traitement avec le EP 80317 sur le transport du cholestérol des macrophages tissulaires vers le foie, de même que sur l'excrétion du cholestérol dans les fèces et à investiguer les gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol au niveau hépatique et dans l'excrétion et/ou l'absorption du cholestérol au niveau intestinal. Cette étude a permis d'expliquer, du moins en partie, le mécanisme des effets hypocholestérolémiantes du EP 80317 (article 3, chapitre 6).

Chapitre 4, 5 et 6: Résultats

Publications

Publications à titre de premier auteur

EP 80317, a CD36 selective ligand, promotes reverse cholesterol transport in apolipoprotein E-deficient mice. **Bujold K**, Rhains D, Febbraio M, Marleau S and Ong H. Manuscript en voie de soumission

CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPARgamma activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages. **Bujold K**, Rhains D, Jossart C, Febbraio M, Marleau S, Ong H. *Cardiovasc Res.* (2009), 83(3): 457-64.

EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. Marleau S*, Harb D*, **Bujold K***, Avallone R, Iken K, Wang Y, Demers A, Sirois MG, Febbraio M, Silverstein RL, Tremblay A, Ong H. *FASEB J.* (2005), 19(13): 1869-71.

*S.M., D.H. and K.B. contributed equally to this work

Publications à titre de coauteur (non-inclus dans la thèse)

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

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

A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor up-regulates sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. Avallone R, Demers A, Rodrigue-Way A, **Bujold K**, Harb D, Anghel S, Wahli W, Marleau S, Ong H, Tremblay A. *Mol Endocrinol.* (2006), 20(12): 3165-78.

**4 EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor,
protects apolipoprotein E-deficient mice from
developing atherosclerotic lesions**

Article publié dans FASEB J. 19(13): 1869-71 (2005)

EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions

Sylvie Marleau,* Diala Harb,* **Kim Bujold**,* Roberta Avallone,* Khadija Iken,* Yanfei Wang,* Annie Demers,* Martin G. Sirois,[†] Maria Febbraio,[§] Roy L. Silverstein,[§] André Tremblay,[‡] and Huy Ong*[†]

*Faculty of Pharmacy, Departments of [†] Pharmacology, [‡] Obstetrics & Gynecology and Biochemistry, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Québec, Canada; [†] Montreal Heart Institute, Montréal, Québec, Canada; [§] Department of Cell Biology, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio; and [‡] Ste-Justine Hospital Research Center, Québec, Canada

Sylvie Marleau, Diala Harb, and Kim Bujold contributed equally to this work.

Corresponding author: Dr. Huy Ong, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Pavillon Jean-Coutu, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7.

Key words: atherosclerosis • lipid metabolism • lipoproteins • macrophages • growth hormone-releasing peptide

RÉSUMÉ

Le CD36 est un récepteur scavenger de type B exprimé à la surface des macrophages qui joue un rôle majeur dans la formation des stries lipidiques après l'internalisation de lipoprotéines oxydées (LDLox) dans la paroi vasculaire. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le EP 80317, un ligand sélectif du CD36 dérivé des sécrétines de l'hormone de croissance, pourrait exercer des effets anti-athérosclérotiques chez un modèle de souris déficientes en apolipoprotéine E (apoE^{-/-}) nourries avec une diète riche en lipides et en cholestérol. Une injection sous-cutanée a été effectuée quotidiennement avec le EP 80317 (300 µg/kg) ou le NaCl 0.9% à partir de la 6, 10, 12 ou 14^{ème} semaine d'âge, jusqu'à la 18^{ème} semaine, moment du sacrifice. Un traitement chronique (12 semaines) avec le EP 80317 a entraîné une réduction de la taille des lésions athérosclérotiques de 51% chez les souris apoE^{-/-}, comparées aux souris traitées par le véhicule. De plus, le traitement avec le EP 80317 est associé à une diminution de 30% du cholestérol total plasmatique, suggérant que le EP 80317 pourrait moduler le métabolisme intestinal et/ou hépatique. Les effets du EP 80317 sur le développement des lésions athérosclérotiques sont autant préventifs que curatifs et les résultats montrent que ces effets sont réversibles après l'arrêt du traitement. Au niveau des macrophages, le EP 80317 entraîne une diminution de l'internalisation des LDLox et une augmentation des gènes de la cascade PPAR γ -LXR α -transporteurs ABC impliqués dans l'efflux du cholestérol, appuyant un rôle du CD36 dans la régulation du transport des lipides en périphérie. Les études avec un modèle déficient en CD36 (apoE^{-/-}/CD36^{-/-}) ont montré que les effets du EP 80317 sont dépendants du récepteur CD36

puisque le peptide n'entraîne pas d'effet anti-athérosclérotique ou hypocholestérolémique chez les souris déficientes en CD36. De plus, le traitement à long terme de ces souris avec le EP 80317 n'a pas modulé l'expression des gènes de la cascade PPAR γ -LXR α -transporteurs ABC. Nos résultats suggèrent que le EP 80317, comme ligand sélectif du CD36, pourrait être le prototype d'une nouvelle classe d'agent anti-athérosclérotique.

ABSTRACT

CD36, a type B scavenger receptor expressed on macrophages, appears to play a major role in fatty streak formation through scavenging oxidatively modified lipoproteins in the arterial wall. We tested the hypothesis that EP 80317, a novel CD36 ligand derived from the growth hormone (GH)-releasing peptide family but devoided of any GH releasing activity, exerts anti-atherosclerotic effects in apolipoprotein E-deficient (apoE^{-/-}) mice fed an atherogenic diet from 6 wk of age. Daily subcutaneous injections of EP 80317 (300 µg/kg) or vehicle were initiated at 6, 10, 12, or 14 wk until death at 18 wk. En face analyses of the entire aortic tree revealed a striking reduction (up to 51%) of lesion areas in EP 80317-treated apoE^{-/-} mice compared with controls. Chronic treatment with EP 80317 (12 wk) is also associated with a 30% decrease in total plasma cholesterol, suggesting potential effects of this drug on cholesterol metabolism at the intestine/hepatic levels. EP 80317 exerts both preventive and curative effects on atherosclerotic lesion progression that were shown to be reversible after cessation of treatment. At the macrophage level, EP 80317 reduced oxidized low density lipoproteins internalization and up-regulated genes involved in cholesterol efflux, including peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), liver x receptor α (LXR α), and the ATP binding cassette (ABC) transporters ABCA1 and ABCG1, supporting a role in regulating peripheral cholesterol trafficking. Importantly, the effects of EP 80317 were shown to be CD36 dependent, inasmuch as no anti-atherosclerotic or hypocholesterolemic effects were observed in apoE/CD36 double-deficient mice. In addition, long-term treatment of apoE/CD36 double-deficient mice with EP 80317 did not

modulate the expression of genes of the PPAR γ -LXR α -ABC transporters pathway. Our results suggest that EP 80317, as a CD36 ligand, might be a prototype for a novel class of anti-atherosclerotic agents.

Contribution

Sylvie Marleau:

- Conceptualisation et supervision du projet
- Analyse des résultats
- Écriture de l'article

Diala Harb:

- Participation aux études in vivo (traitements et isolation des aortes; études curatives)
- Analyse morphométrique des aortes
- Uptake des DiI-oxLDL par les macrophages
- Participation à l'écriture de l'article.

Kim Bujold:

- Participation aux expériences in vivo; entretien des colonies de souris, traitement quotidien et sacrifice des souris.
- Participation à l'isolation des aortes et dosages lipidiques
- Mise au point de la technique de FACS
- Participation aux expériences de RT-PCR et western blot
- Participation à l'écriture de l'article

Roberta Avallone:

- Participation aux expériences de RT-PCR

Khadija Iken:

- Oxydation des LDLs et dosage des TBARS

Yanfei Wang:

- Participation aux études ex vivo (formation cellules spumeuses)

Martin G. Sirois:

- Analyse immunohistochimie
- Révision du papier

Maria Febbraio:

- Formation isolation aortes
- Coloration ORO et analyse morphométrique
- Dons des lignées de souris
- Discussion

Roy L. Silverstein et André Tremblay:

- Discussion et commentaires sur l'article

Huy Ong:

- Conceptualisation et supervision du travail
- Participation à l'écriture de l'article

INTRODUCTION

Atherosclerosis, a progressive disease characterized by the accumulation of lipids and fibrous elements in large arteries, remains the primary cause of morbidity and mortality associated with cerebral and coronary artery diseases in industrialized countries (1). A critical step in lesion initiation is the formation of cholesterol-laden foam cells secondary to the uptake of oxidized low density lipoproteins (oxLDL) by macrophages in the subendothelial space of the artery wall (2).

Oxidized fatty acids and oxysterols, generated as a result of oxLDL uptake by macrophages, act as ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and liver x receptor α (LXR α) nuclear receptors that regulate the expression of genes critical to the metabolism of lipoprotein and cholesterol, as well as hepatic cholesterol catabolism and intestinal sterol absorption (3–5). A key molecular membrane protein regulated via the PPAR γ signaling pathway that may be potentially attractive as a therapeutic target for atherosclerosis is CD36, a type B scavenger receptor (SR) largely involved in the uptake of oxidatively modified LDL (6). However, besides oxLDL, CD36 binds various ligands, including anionic phospholipids, apoptotic cells, effete photoreceptors, fibril β -amyloid deposits, and *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes, which are most likely associated with its scavenging function (7). Additional ligands such as fatty acids and thrombospondins were also described, with implications for fatty acid, glucose and lipoprotein metabolism, as well as for proapoptotic, anti-angiogenic effects on microvascular endothelium in response to thrombospondin-1 (TSP-1).

Interestingly, PPAR γ agonists such as thiazolidinediones appear to exert overall beneficial anti-atherosclerotic effects through activation of the PPAR γ -LXR α -ATP binding cassette (ABC) transporters pathway, despite an up-regulation of CD36 expression on macrophages (8–10). Indeed, up-regulation of LXR target genes such as ABCA1 and ABCG1 has been associated with prevention of excessive cholesterol storage and foam cell formation secondary to an increase in efflux to extracellular acceptors, mainly apoAI and high density lipoprotein (HDL), for reverse transport to the liver (11–15).

In the present study, we took advantage of our recent observation that growth hormone-releasing peptides (GHRPs) serve as ligands for CD36 (16) to investigate their effect on atherosclerosis progression in a well-characterized genetic murine model of atherosclerosis. GHRPs consist of small synthetic peptides derived from enkephalin that have been initially developed as growth hormone (GH) secretagogues (17, 18) and shown to also exert GH-independent cardiotropic (19, 20) and cardioprotective activities, improving postischemic cardiac dysfunction in animal models (21–27). The identification of CD36 as a GHRP binding site in the heart suggested a role for CD36 in the cardioprotective effects afforded by GHRPs (28).

EP 80317, a synthetic hexapeptide GHRP analog that is devoid of somatotroph activity as a consequence of the presence of a Lys in position 3 (17), has been selected as a potential antiatherogenic drug prototype. Our results show that a prolonged (4–12 wk) treatment with EP 80317 in apoE-deficient (apoE^{-/-}) mice fed a high fat, high cholesterol (HFHC)

diet elicits a significant reduction in aortic lesion areas that was associated with a favorable plasma lipid profile. These pharmacological effects were shown to be CD36-dependent and reversible upon cessation of the treatment. We also show the ability of EP 80317 to interfere with oxLDL internalization and to modulate the expression of the PPAR γ -LXR α -ABC transporters (ABCA1 and ABCG1) signaling pathways in macrophages, suggesting a role in the regulation of cholesterol efflux from macrophages. These observations may explain, at least in part, the protection against atherosclerosis afforded by this GHRP.

MATERIALS AND METHODS

Mice and diets

The apoE^{-/-} mice, CD36-deficient (CD36^{-/-}) mice, and apoE/CD36 double-deficient (apoE^{-/-}/CD36^{-/-}) mice were obtained as described previously (6). Six-week-old male mice were fed a HFHC diet (D12108, cholate-free AIN-76A semipurified diet, Research Diets Inc., New Brunswick, NJ) containing 40% wt/wt fat and 1.25% wt/wt cholesterol and water ad libitum. Pharmacological treatment with EP 80317 (300 μ g/kg) or vehicle (0.9% NaCl) was administered by daily subcutaneous injections starting at 6 wk of age ($n=6$ mice per group). In additional experiments, EP 80317 treatment was initiated 4, 6, or 8 wk after initiation of the atherogenic diet ($n=5$ mice per group). All experimental procedures were done in accordance with the Institutional Animal Ethics Committee and the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of experimental animals.

Morphometric analysis of aortic lesions and histology

Aortas were opened longitudinally from the heart to the iliac arteries, and the lesions were stained with oil red-O, as described previously (6). En face aortic lesion areas were digitized by videomicroscopy and analyzed using Adobe Photoshop software and expressed as the percentage of the total aortic surface area covered by lesions. For histological staining, aortas were cut into three equal segments and fixed in 10% formalin PBS-buffered solution and processed for standard histological procedures and embedded in paraffin. Representative sections of 6 μm were obtained by microtome along the length of the specimen. Sections were deparaffinized in xylene and ethanol baths and stained with Verhoeff's elastic solutions to delineate external and internal elastic laminae and endoluminal atherosclerotic lesions.

Plasma lipids analysis

Total plasma cholesterol was assayed using the kit Infinity TM (Thermo Electron Corporation, Louisville, CO). Triglycerides and HDL cholesterol were measured using commercially available kits (Sigma, St. Louis, MO).

Lipoprotein oxidation

LDL from human plasma (Intracel, Frederick, MD) was dialyzed against PBS before oxidation with 5 μM CuSO_4 for 2 h. The extent of LDL oxidation was assessed as described previously (29, 30). The amount of thiobarbituric acid reactive substances

(TBARS) was between 6 and 10 nmol MDA/mg protein, corresponding to minimally oxidized preparations (31).

DiI-labeled oxLDL internalization in macrophages

Analysis of 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI)-oxidized LDL (Intracel, Frederick, MD) uptake was performed as described by Whitman et al. (32) with minor modifications. Briefly, DiI-oxLDL (5 µg/ml) cell binding (4°C) and association (37°C) were measured by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis after 2 h of incubation in DMEM containing 10% lipoprotein-deficient fetal bovine serum (Intracel, Frederick, MD). DiIoxLDL internalization was calculated by subtracting the mean fluorescence intensity at 4°C from that at 37°C. Values are expressed as the percentage change in mean fluorescence intensity over macrophages harvested from 0.9% NaCl-treated mice.

RT-PCR and Western blot of CD36, SRA, PPAR γ , LXR α , ABCA1, and ABCG1 in peritoneal macrophages

Total cellular RNA was isolated from peritoneal macrophages of apoE^{-/-} and apoE^{-/-}/CD36^{-/-} mice treated with the drug in vivo. RNeasy mini-kit was used according to the manufacturer's instructions (Qiagen), and total RNA (400 ng) was reverse transcribed in a total volume of 20 µl with oligo(dT) primers at 42°C for 50 min using SuperScript II RT (Invitrogen). PCR amplification was then performed in a volume of 50 µl with 1–2 µl

of reverse transcription reaction and 0.4 μ M of each specific primer using Taq polymerase. Cycling conditions were usually for 25–35 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 45 s, and 72°C for 30 s. The murine primer sequences and the expected product size were as follows:

- PPAR α ; sense primer: 5'-GCAAACCTTGGACTTGAACGACC-3'
 antisense primer: 5'-ATGTCACAGAACGGCTTCCTCAGG-3' (170 bp)
- PPAR γ ; sense primer: 5'-TGACAGGAAAGACAACGGACAA-3'
 antisense primer: 5'-ATTCAAATCAAGGTTAATGAAA-3' (227 bp)
- LXR α ; sense primer: 5'-TGAAGCGGCAAGAAGAGGAACA-3'
 antisense primer: 5'-GATGGCAATGAGCAGAGCAAAC-3' (551 bp)
- ABCA1; sense primer: 5'-CCAGTAACTACAGTGGCGGCAA-3'
 antisense primer: 5'-TCTTCTATGTGGAGTCGCTTTT-3' (490 bp)
- ABCG1; sense primer: 5'-GCAATGACGGAGCCCAAGTCC-3'
 antisense primer: 5'-GAGTGTGGACTTCCCAGCTCC-3' (320 bp)
- CD36; sense primer: 5'-GATGACGTGGCAAAGAACAG-3'
 antisense primer: 5'-AAAGGAGGCTGCGTCTGTG-3' (543 bp)
- SR-A; sense primer: 5'-CCTTGATTTTCGTCAGTCCAGGAAC-3'
 antisense primer: 5'-GTTGCTTTGCTGTAGATTCACGG-3' (144 bp).

All values were normalized against GAPDH;

sense primer: 5'-CCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG3'

antisense primer: 5'-TGGGAGTTGCTGTTGAAGTCGC-3'(129 bp).

The CD36 primers used for RT-PCR were downstream of the targeted site in exon 3 (33). PCR products were separated on 2% agarose gel, and the relative signal intensity was measured with an image analyzer (Alpha Imager, Alpha Innotech, San Leandro, CA).

For Western blot analysis, total macrophage cell lysates (40–80 µg) were subjected to SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). After being blocked in 20 mmol/l Tris-HCl (pH 7.6) containing 150 mmol/l NaCl, 0.1% Tween 20, and 5% (wt/vol) nonfat dry milk, membranes were probed with specific polyclonal antibodies against PPAR γ (SC-7196, Santa Cruz, Santa Cruz, CA), LXR α (SC-13068), ABCG1 (SC-11150), and ABCA1 (#07-358, Upstate Biotechnology, Waltham, MA), respectively. CD36 was probed with an affinity purified polyclonal IgG generated in house (16). Actin was probed with monoclonal IgG (A 5316) from Sigma. Signals were visualized with horseradish peroxidase-conjugated secondary goat anti-rabbit antibodies from KPL (Guilford, UK) or Pierce (Rockford, IL) and enhanced chemiluminescence kit (Pierce, Rockford, IL). Protein bands were quantified by densitometry using the AlphaEaseFCTM software (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA). Rat brain, dog spleen, and wild-type mouse heart membranes were used as positive controls for ABCA1, ABCG1, and CD36, respectively, whereas MCF7 cell membranes and rat liver (nuclear fraction) membranes were used as positive controls for PPAR γ and LXR α , respectively.

Macrophage membranes from CD36-deficient mice were used as negative controls for CD36 and HEK-293 cell membranes for PPAR γ , LXR α , ABCA1, and ABCG1, respectively.

Statistical analysis

Data are means \pm SE. Comparisons between groups were performed using a one-way ANOVA followed by pair-wise multiple comparisons using the Student-Newman-Keuls method. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

EP 80317 prevents atherosclerosis development in apoE^{-/-} mice fed a HFHC diet

To investigate whether EP 80317 exerts anti-atherosclerotic effects, we initiated studies in apoE^{-/-} mice fed a HFHC diet from 6 wk of age and treated daily with subcutaneous injections of the drug for a period of 12 wk. Figure 1A shows the entire longitudinal aorta exhibiting positive oil red-O lesions staining under light microscopy. The mean lesion areas in the treated group were reduced by 51% as compared with the 0.9% NaCl-treated group ($P < 0.01$; Fig. 1B). Figure 1C shows lesions and cholesterol deposition protruding into the lumen at lesion-prone sites in 0.9% NaCl-treated mice. In contrast, a significant reduction (up to 61%) in plaque surface area was observed in EP 80317-treated apoE^{-/-} mice (Fig.

1C). To determine whether EP 80317 improved lipid profile, we measured plasma lipid levels in each group (Fig. 1D). The apoE^{-/-} mice fed a HFHC diet for 12 wk showed elevated total plasma cholesterol levels, 28.4 ± 1.3 vs. 12.7 ± 0.8 mmol/l in apoE^{-/-} mice fed normal chow (data not shown). After 12 wk of treatment, the atherogenic diet-induced elevation in total plasma cholesterol levels was reduced by 30% in EP 80317-treated mice as compared with 0.9% NaCl-treated mice (Fig. 1D). Neither HDL cholesterol nor triglyceride levels were significantly modulated. The body weights and food intake did not differ significantly between the vehicle and treated groups during the last week of the study period, as shown in Fig. 1E. There were no noticeable lesions in the parenchyma of different organs including the liver, pancreas, and spleen of treated mice (data not shown).

Anti-atherosclerotic properties of EP 80317 are CD36 dependent

To elucidate the role of CD36 in mediating the effect of CD36, apoE^{-/-}/CD36^{-/-} mice were fed a HFHC diet from 6 wk of age and treated with 0.9% NaCl or EP 80317 as described above. The percentage of aortic lesion areas were 80% lower in apoE/CD36 double-deficient mice than in apoE^{-/-} mice (Fig. 2B and 1B), as reported previously (6). EP 80317 did not inhibit lesion development or change in plasma lipids in these mice (Fig. 2C). In addition, EP 80317 did not modulate the expression of genes, including SRA, LXR α , PPAR γ , ABCA1, and ABCG1 in peritoneal macrophages from apoE^{-/-}/CD36^{-/-} mice (Fig.

2D). These results support a role for CD36 in mediating the anti-atherogenic effects of EP 80317.

EP 80317 shows curative effects in reducing atherosclerosis in apoE^{-/-} mice fed a HFHC diet

In the next series of experiments, we investigated the potential inhibitory effect of EP 80317 on atherosclerotic lesion progression. Treatment was delayed by 4, 6, or 8 wk after the start of the HFHC diet and continued until the mice were 18 wk of age. EP 80317 limited lesion progression (Fig. 3A and B) inasmuch as the percentage of total aortic lesion areas was reduced by 39% ($P<0.05$, $n=4$) and 31% ($P<0.05$, $n=4$) after initiation of treatment at 10 and 12 wk of age in apoE^{-/-} mice fed a HFHC diet from 6 wk of age, respectively. A similar trend was observed when EP 80317 treatment was delayed until the mice were 14 wk old, thereby reducing the treatment period to 4 wk (Fig. 3A and B). In contrast to the hypocholesterolemic effect of EP 80317 associated with a chronic and preventive treatment regimen of the peptide, total plasma cholesterol levels were modestly reduced or unchanged when drug administration was delayed by 4–8 wk after the HFHC diet was initiated. Neither HDL cholesterol nor triglyceride levels were significantly modulated Fig. 3C.

Anti-atherosclerotic effects of EP 80317 are reversible

To document the reversibility of the anti-atherosclerotic effects of EP 80317, apoE^{-/-} mice were fed a HFHC diet and treated with EP 80317 from 6 to 14 wk of age, after which the treatment was stopped. Mice were killed at 22 wk of age. As shown in Fig. 4A and B, the percentage of total aortic lesion areas was similar in both control and treated mice 8 wk after cessation of treatment with EP 80317. In a similar manner, total plasma cholesterol returned to the levels observed for the vehicle-treated group (Fig. 4C).

EP 80317 reduces oxLDL internalization and regulates the PPAR γ -LXR α -ABCA1 pathway in macrophages

The early stages of atherosclerotic lesions development rely largely on the subendothelial accumulation of monocytes/macrophages and their differentiation into macrophage foam cells. To investigate whether EP 80317 treatment leads to reduced intracellular levels of oxLDL, peritoneal macrophages from apoE^{-/-} mice fed a HFHC diet and treated with EP 80317 for 12 wk were harvested and exposed to DiI-oxLDL for 2 h (Fig. 5A). The percentage of mean fluorescence intensity, expressed as a percentage of 0.9% NaCl controls, was found to be reduced by $21 \pm 3\%$ in mice treated with EP 80317.

To further elucidate the role of EP 80317 in the regulation of cholesterol efflux within macrophages, we assessed the effects of long-term treatment (12 wk) on the expression of components of the PPAR γ -LXR α -ABC transporters pathway. Our results show that in the

absence of exposure to exogenous oxLDL, EP 80317 (300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per day) elicits a significant increase in mRNA expression (2-fold) of targeted genes including LXR α and ABCG1, whereas PPAR γ and ABCA1 gene expression was modestly increased (1.4-fold) (Fig. 5B, right panel). The modulation of targeted genes appears to be specific inasmuch as there was no significant change in PPAR α or SRA mRNA expression. However, the combined exposure to both exogenous oxLDL and EP 80317 treatment induced a higher expression of the transcription factors PPAR γ and LXR α (2.5- to 3-fold) and of ABC transporters (2.5- to 2.6-fold; Fig. 5B, left panel). The increase in gene expression was paralleled with an increase in protein expression of PPAR γ and LXR α (1.4- to 2.8-fold) and of ABC transporters (1.4-fold; Fig. 5C). Despite an apparent increase in CD36 mRNA levels (1.5- to 1.9-fold), CD36 protein levels were not significantly increased in peritoneal macrophages harvested from EP 80317-pretreated mice, as assessed by Western blot.

DISCUSSION

The earliest observable pathological lesions of atherosclerosis are fatty streaks, occurring as a result of the accumulation of lipid-laden macrophages in the intima of the vessel wall following scavenging of oxidized lipoproteins. In addition to macrophage foam cells, lesion progression is associated with the accumulation of T lymphocytes and smooth muscle cells in varying proportions within the lesions (34). The discovery of a key role for the scavenger receptor CD36 in the early uptake of modified lipoproteins and of its protective role in

limiting lesion progression in an atherosclerotic mouse model suggested that CD36 might be a novel molecular target for the treatment of atherosclerosis (6, 35, 36).

Our recent findings identified CD36 as a binding site for GHRP analogs (16). In the heart, binding of CD36 appears to account for the cardioprotective effects of GHRPs (28). This observation, in addition to the presence of CD36 in a number of tissues and cell types involved in atherosclerosis pathogenesis including macrophages and platelets, as well as the overlap between oxLDL and GHRP binding site on CD36 (37), has prompted us to investigate whether GHRPs might exert beneficial effects on atherosclerotic lesion development. The EP 80317 compound was selected as a drug prototype mainly due to the absence of potentially interfering GH-secreting properties, as well as for its potent *in vitro* binding properties to CD36 (37).

In the present study, we show the atheroprotective effect of EP 80317 as a selective CD36 ligand in apoE^{-/-} mice fed a HFHC diet, a model known to mimic the progressive series of atherogenic events as seen in humans (38). A prolonged (12 wk) administration of the peptide, initiated before the induction of aortic lesions in mice fed an atherogenic diet, prevented lesion formation by 51% (Fig. 1A and B). In contrast, the same therapeutic regimen in apoE^{-/-}/CD36^{-/-} mice did not significantly modulate lesion areas (Fig. 2A and B). In agreement with results published previously (6), knocking out the CD36 gene in apoE^{-/-} mice afforded a striking protection on lesion formation, as seen by an 80% reduction in total aortic tree lesion area compared with apoE^{-/-} mice. In addition, chronic

treatment with the selective GHS-R1a endogenous peptide ghrelin did not exert significant beneficial anti-atherosclerotic effects in hypercholesterolemic mice (Harb et al., unpublished results). Altogether, these results suggest that the anti-atherosclerotic properties of EP 80317 are CD36 dependent.

Chronic (12 wk) treatment with EP 80317 was associated with a 30% reduction in total plasma cholesterol, which may contribute to the striking inhibitory effect of the drug on atherosclerotic lesion development. However, shorter periods of treatment, initiated 4–8 wk after the HFHC diet was introduced, were associated with lower (~20%) or no hypocholesterolemic effect, yet the reduction in lesion areas was substantial (31–39%; Fig. 3B and C). Hence, these results suggest that in addition to an hypocholesterolemic effect, additional mechanisms may also significantly contribute to the anti-atherosclerotic properties of EP 80317.

The protective role of LXR ligands in atherogenesis has been recently documented in bone marrow transplants atherosclerotic mouse models (39, 40), and their beneficial effect appears to be largely due to an increase in LXR target genes such as ABCA1 and ABCG1 (13–15). It is thus interesting that EP 80317 treatment, by itself or associated with an exogenous administration of oxLDL, promotes gene and protein expression of LXR α and of the ABC transporter gene target ABCG1 and, to a lesser degree in unprimed cells, of ABCA1 (Fig. 5B and C). In addition, it has been reported that PPAR γ activation is beneficial in the atherosclerotic setting, inasmuch as the cholesterol efflux pathways are

stimulated through an increase in LXR α , a target PPAR γ gene, which may offset the potentially adverse effect PPAR γ agonists in up-regulating CD36 expression (8–10). In the present study, chronic treatment with EP 80317 elicited modest changes in CD36 mRNA expression within macrophages; however, total CD36 protein levels were not significantly modulated as assessed by Western blots. As reported previously, it may be possible that LXR α stimulation provides an escape pathway from the autoregulatory positive feedback that normally occurs between PPAR γ and CD36 (5, 11, 41). This may provide an interesting potential for GHRPs to regulate PPAR-dependent activation pathways toward LXR α and subsequently ABC transporters, without significantly increasing CD36 in macrophages.

Our results imply that EP 80317 modulates the transcriptional activity of nuclear receptors involved in macrophage cholesterol homeostasis. Unlike LXR α agonists, for which beneficial effects on macrophage efflux pathways may be counteracted by an up-regulation of fatty acid synthesis and lipogenesis (8, 42), EP 80317 did not modulate triglyceride levels or induce hepatic steatosis. Altogether, our results suggest that EP 80317 might interfere with the binding, as described previously (37) and internalization of oxLDL, in addition to enhancing cholesterol efflux pathway. These effects, and the lowering of total plasma cholesterol after long-term therapy might contribute, at least in part, to the beneficial effects of GHRPs in plaque regression. Interestingly, GHRPs and TSP-1, a known CD36 ligand, do not appear to share the same binding sites on CD36 (37), thus providing an apparent selectivity of GHRPs-mediated responses that may be directed

toward oxLDL and CD36 interaction on macrophage-associated function, without affecting TSP-1-mediated effects (7). Thus, the overall benefit of the peptide on atherogenesis seems to occur with minimal effect on adipocyte and muscle fatty acid metabolism. The mechanisms through which EP 80317 regulates plasma cholesterol levels are currently being investigated and could potentially involve regulation of the expression of cholesterol transporters at the intestinal/hepatic levels.

Taking into account the atheroprotective effect of EP 80317 in apoE^{-/-} mice, and not in apoE/CD36 double-deficient mice, it appears that the beneficial anti-atherosclerotic effect of GHRPs is CD36 dependent. Elucidation of the cellular and molecular effects of this peptide at different tissue levels will be needed to fully understand its beneficial potential in atherogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Eve-Marie Charbonneau, Dominique Lauzier, and Petra Pohankova for expert technical assistance. EP 80317 was a generous gift from Ardana Bioscience (Edinburgh, Scotland). This project was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 62837) and Ardana Bioscience.

REFERENCES

1. Lusis, A. J. (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407, 233-241
2. Steinberg, D. (2002) Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Med.* 8, 1211-1217
3. Fitzgerald, M. L., Moore, K. J., Freeman, M. W. (2002) Nuclear hormone receptors and cholesterol trafficking: the orphans find a new home. *J.Mol.Med.* 80, 271-281
4. Walczack, R., Tontonoz, P. (2002) PPARadigms and PPARadoxes: expanding roles for PPAR γ in the control of lipid metabolism. *J.Lipid Res.* 43, 177-186
5. Repa, J. J., Mangelsdorf, D. J. (2002) The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nature Med.* 8, 1243-1248
6. Febbraio, M., Podrez, E. A., Smith, J. D., Hajjar, D. P., Hazen, S. L., Hoff, H. F., Sharma, K., Silverstein, R. L. (2000) Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J.Clin.Invest.* 105, 1049-1056
7. Febbraio, M., Hajjar, D. P., Silverstein, R. L. (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J.Clin.Invest.* 108, 785-791
8. Vainio, S., Ikonen, E. (2003) Macrophage cholesterol transport: a critical player in foam cell formation. *Ann.Med.* 35, 146-155

9. Han, J., Hajjar, D. P., Zhou, X., Gotto, A. M., Jr., Nicholson, A. C. (2002) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-g-mediated gene expression. A new mechanism of action for high density lipoprotein. *J.Biol.Chem.* 277, 23582-23586
10. Valledor, A., Ricote, M. (2004) Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem.Pharmacol.* 67, 201-212
11. Chawla, A., Boisvert, W. A., Lee, C. H., Laffitte, B. A., Barak, Y., Joseph, S. B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P. A., Curtiss, L. K., Evans, R. M., Tontonoz, P. (2001) A PPARgamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol.Cell.* 7, 161-171
12. Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A. T., Neve, B., Torra, I. P., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., Brewer, H. B., Fruchart, J. C., Clavey, V., Staels, B. (2001) PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nature Med.* 7, 53-58
13. Repa, J. J., Turley, S. D., Lobaccaro, J. A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R. A., Dietschy, J. M., Mangelsdorf, D. J. (2000) Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289, 1524-1529
14. Venkateswaran, A., Laffitte, B. A., Joseph, S. B., Mak, P. A., Wilpitz, D. C., Edwards, P. A., Tontonoz, P. (2000) Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXRA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 97, 12097-12102

15. Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., Tall, A. R. (2004) ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *PNAS* 101, 9774-9779
16. Bodart, V., Febbraio, M., Demers, A., McNicoll, N., Pohankova, P., Perreault, A., Sejlitz, T., Escher, E., Silverstein, R. L., Lamontagne, D., Ong, H. (2002) CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ.Res.* 90, 844-849
17. Bowers, C. Y. (1998) Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cell.Mol.Life Sci.* 54, 1316-1329
18. Locatelli, V., Torsello, A. (1997) Growth hormone secretagogues: focus on the growth hormone-releasing peptides. *Pharmacol.Res.* 36, 415-423
19. Ghigo, E., Arvat, E., Giordano, R., Broglio, F., Gianotti, L., Maccario, M., Bisi, G., Graziani, A., Papotti, M., Muccioli, G., Deghenghi, R., Camanni, F. (2001) Biologic activities of growth hormone secretagogues in humans. *Endocrine* 14, 87-93
20. Bodart, V., Bouchard, J. F., McNicoll, N., Escher, E., Carriere, P., Ghigo, E., Sejlitz, T., Sirois, M. G., Lamontagne, D., Ong, H. (1999) Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ.Res.* 85, 796-802
21. De Gennaro Colonna, V., Rossoni, G., Bernareggi, M., Muller, E. E., Berti, F. (1997) Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur.J.Pharmacol.* 334, 201-207

22. MacAndrew, J. T., Ellery, S. S., Parry, M. A., Pan, L. C., Black, S. C. (2001) Efficacy of a growth hormone-releasing peptide mimetic in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Eur.J.Pharmacol.* 432, 195-202
23. Bisi, G., Podio, V., Valetto, M. R., Broglio, F., Bertuccio, G., Del Rio, G., Arvat, E., Boghen, M. F., Deghenghi, R., Muccioli, G., Ong, H., Ghigo, E. (1999) Acute cardiovascular and hormonal effects of GH and hexarelin, a synthetic GH-releasing peptide, in humans. *J.Endocrinol.Invest.* 22, 266-272
24. Locatelli, V., Rossoni, G., Schweiger, F., Torsello, A., De Gennaro Colonna, V., Bernareggi, M., Deghenghi, R., Muller, E. E., Berti, F. (1999) Growth hormone-independent cardioprotective effects of hexarelin in the rat. *Endocrinology* 140, 4024-4031
25. Rossoni, G., De Gennaro Colonna, V., Bernareggi, M., Polvani, G. L., Muller, E. E., Berti, F. (1998) Protectant activity of hexarelin or growth hormone against postischemic ventricular dysfunction in hearts from aged rats. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 32, 260-265
26. Tivesten, Å., Bollano, E., Caidahl, K., Kujacic, V., Sun, X. Y., Hedner, T., Hjalmarson, Å., Bengtsson, B.-Å., Isgaard, J. (2000) The growth hormone secretagogue Hexarelin improves cardiac function in rats after experimental myocardial infarction. *Endocrinology* 141, 60-66
27. Berti, F., Rossoni, G., De Gennaro Colonna, V. (1999) Hexarelin, a synthetic growth hormone secretagogue, exhibits protectant activity in experimental myocardial ischemia and reperfusion. In *Growth hormone secretagogues* (Ghigo, E., Boghen, M., Casanueva, F. F., and Dieguez, C., eds) pp. 301-314, Elsevier Science B.V., New York.

28. Torsello, A., Bresciani, E., Rossoni, G., Avallone, R., Tulipano, G., Cocchi, D., Bulgarelli, I., Deghenghi, R., Berti, F., Locatelli, V. (2003) Ghrelin plays a minor role in the physiological control of cardiac function in the rat. *Endocrinology* 144, 1787-1792
29. Quintanilha, A. T., Packer, L., Davies, J. M., Racanelli, T. L., Davies, K. J. (1982) Membrane effects of vitamin E deficiency: bioenergetic and surface density studies of skeletal muscle and liver mitochondria. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 393, 32-47
30. Maguire, G. F., Lee, M., Connelly, P. W. (1989) Sodium dodecyl sulfate-glycerol polyacrylamide slab gel electrophoresis for the resolution of apolipoproteins. *J.Lipid Res.* 30, 757-761
31. Yoshida, H., Quehenberger, O., Kondratenko, N., Green, S., Steinberg, D. (1998) Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macrosialin in resident mouse peritoneal macrophages. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 18, 794-802
32. Whitman, S. C., Daugherty, A., Post, S. R. (2000) Regulation of acetylated low density lipoprotein uptake in macrophages by pertussis toxin-sensitive G proteins. *J.Lipid Res.* 41, 807-813
33. Febbraio, M., Abumrad, N. A., Hajjar, D. P., Sharma, K., Cheng, W., Pearce, S. F., Silverstein, R. L. (1999) A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J.Biol.Chem.* 274, 19055-19062
34. Li, A. C., Glass, C. K. (2002) The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nature Med.* 8, 1235-1242

35. Kunjathoor, V. V., Febbraio, M., Podrez, E. A., Moore, K. J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J. S., Silverstein, R., Hoff, H. F., Freeman, M. W. (2002) Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J.Biol.Chem.* 277, 49982-49988
36. Nakata, A., Nakagawa, Y., Nishida, M., Nozaki, S., Miyagawa, J., Nakagawa, T., Tamura, R., Matsumoto, K., Kameda-Takemura, K., Yamashita, S., Matsuzawa, Y. (1999) CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19, 1333-1339
37. Demers, A., McNicoll, N., Febbraio, M., Servant, M., Marleau, S., Silverstein, R., Ong, H. (2004) Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem.J.* 382, 417-424
38. Nakashima, Y., Plump, A. S., Raines, E. W., Breslow, J. L., Ross, R. (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler.Thromb.* 14, 133-140
39. Joseph, S. B., McKilligin, E., Pei, L., Watson, M. A., Collins, A. R., Laffitte, B. A., Chen, M., Noh, G., Goodman, J., Hagger, G. N., Tran, J., Tippin, T. K., Wang, X., Lusis, A. J., Hsueh, W. A., Law, R. E., Collins, J. L., Willson, T. M., Tontonoz, P. (2002) Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 99, 7604-7609
40. Tangirala, R. K., Bischoff, E. D., Joseph, S. B., Wagner, B. L., Walczak, R., Laffitte, B. A., Daige, C. L., Thomas, D., Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Wang, X., Lusis, A. J., Tontonoz, P., Schulman, I. G. (2002) Identification of

macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis.

Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99, 11896-11901

41. Tontonoz, P., Mangelsdorf, D. J. (2003) Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol.Endocrinol.* 17, 985-993

42. Grefhorst, A., Elzinga, B. M., Voshol, P. J., Plösch, T., Kok, T., Bloks, V. W., van der Sluijs, F. H., Havekes, L. M., Romijn, J. A., Verkade, H. J., Kuipers, F. (2002) Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J.Biol.Chem.* 277, 34182-34190

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effects of long-term (12 wk) administration of EP 80317 in apoE^{-/-} mice.

Representative en face oil red-O-stained aortas from apoE^{-/-} mice fed an atherogenic diet from 6 wk of age and treated daily with 0.9% NaCl (**top**) or EP 80317 (300 µg/kg; **bottom**; **A**) and mean percentage of aortic lesion areas in apoE^{-/-} mice treated with EP 80317 ($n=6$) or vehicle ($n=4$; **B**). Representative histochemistry of aortic sections of apoE^{-/-} mice treated with vehicle or EP 80317 (**C**). Total plasma cholesterol, HDL cholesterol, and triglyceride levels in apoE^{-/-} mice treated with vehicle or EP 80317 (**D**). Mean body weight and food intake during the last week of treatment with vehicle or EP 80317 (**E**). Results are means \pm SE. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ compared with vehicle (0.9% NaCl).

Figure 2. Effects of long-term administration of EP 80317 in apoE/CD36 double null mice.

Representative en face oil red-O-stained aortas from apoE^{-/-}/CD36^{-/-} mice fed an atherogenic diet from 6 wk of age, and treated daily with 0.9% NaCl (**top**) or 300 µg EP 80317/kg (**bottom**; **A**) and mean percentage of aortic lesion areas in apoE^{-/-}/CD36^{-/-} mice treated with EP 80317 ($n=6$) or vehicle ($n=5$; **B**). Total plasma cholesterol, HDL cholesterol, and triglyceride levels in apoE^{-/-}/CD36^{-/-} mice treated with vehicle or EP 80317 (**C**). Representative steady-state mRNA levels of CD36, SRA, PPAR γ , LXR α , ABCA1, ABCG1, and GAPDH in peritoneal macrophages harvested from apoE^{-/-}/CD36^{-/-}

mice after chronic (12 wk) treatment with 0.9% NaCl or EP 80317 (**D**). Results are means \pm SE.

Figure 3. Curative effects of EP 80317 in apoE^{-/-} mice. Representative en face oil red-O-stained aortas from apoE^{-/-} mice fed an atherogenic diet from 6 wk of age, and treated with either 0.9% NaCl (**top**) or 300 μ g/kg EP 80317 from 10 to 18 wk of age (second from **top**), 12-18 wk of age (third from **top**), and 14 to 18 wk of age (**bottom**), respectively (**A**), and mean percentage of aortic lesions for each period of treatment (**B**). Total plasma cholesterol, HDL cholesterol and triglyceride levels in apoE^{-/-} mice treated with vehicle or EP 80317 for the different periods, as indicated (**C**). Results are expressed as mean \pm SE of $n = 5$ mice per group. * $P < 0.05$ compared with vehicle (0.9% NaCl).

Figure 4. Reversibility of the effect of EP 80317. Representative en face oil red-O-stained aortas from 22-wk-old apoE^{-/-} mice fed an atherogenic diet from 6 wk of age and treated daily from wk 6–14 with 0.9% NaCl (**top**) or 300 μ g EP 80317/kg (**bottom**; **A**) and mean percentage of aortic lesion area after cessation of treatment (**B**). Results are means \pm SE of $n = 5$ mice in each group. **C**) Total cholesterol returned to levels observed for vehicle-treated group.

Figure 5. Effect of EP 80317 on DiI-oxLDL internalization and gene expression of scavenger receptors, nuclear receptors, and ABC transporters. DiI-oxLDL

internalization in peritoneal macrophages harvested from apoE^{-/-} mice treated daily for 12 wk with 0.9% NaCl or EP 80317 (300 µg/kg; *A*). Overlay histogram shows FACS plots of peritoneal macrophages harvested from 0.9% NaCl-treated (black line) and EP 80317-treated mice (red line; representative from 3 experiments). Bar graph is percent change (±SE) in mean fluorescence intensity over the control macrophage population set at 100%. ***P* < 0.01 compared with macrophages from 0.9% NaCl-treated mice. Representative steady-state mRNA levels of CD36, SR-A, PPARα and PPARγ, LXRα, ABCA1, ABCG1, and GAPDH peritoneal macrophages harvested from apoE^{-/-} mice after chronic (12 wk) treatment with EP 80317 receiving (*B, left panel*) or not (*B, right panel*) an ip injection of oxLDL (250 µg) before collection of macrophages. ApoE^{-/-} mice were maintained on a HFHC diet and treated daily as in Figure 1. Immunoblots of CD36, LXRα, PPARγ, ABCA1, and ABCG1 expression in macrophages were performed (*C*). Each data set shows apoE^{-/-} mice treated vehicle or EP 80317 as indicated. Data are representative of 2–4 independent experiments.

FIGURE 1

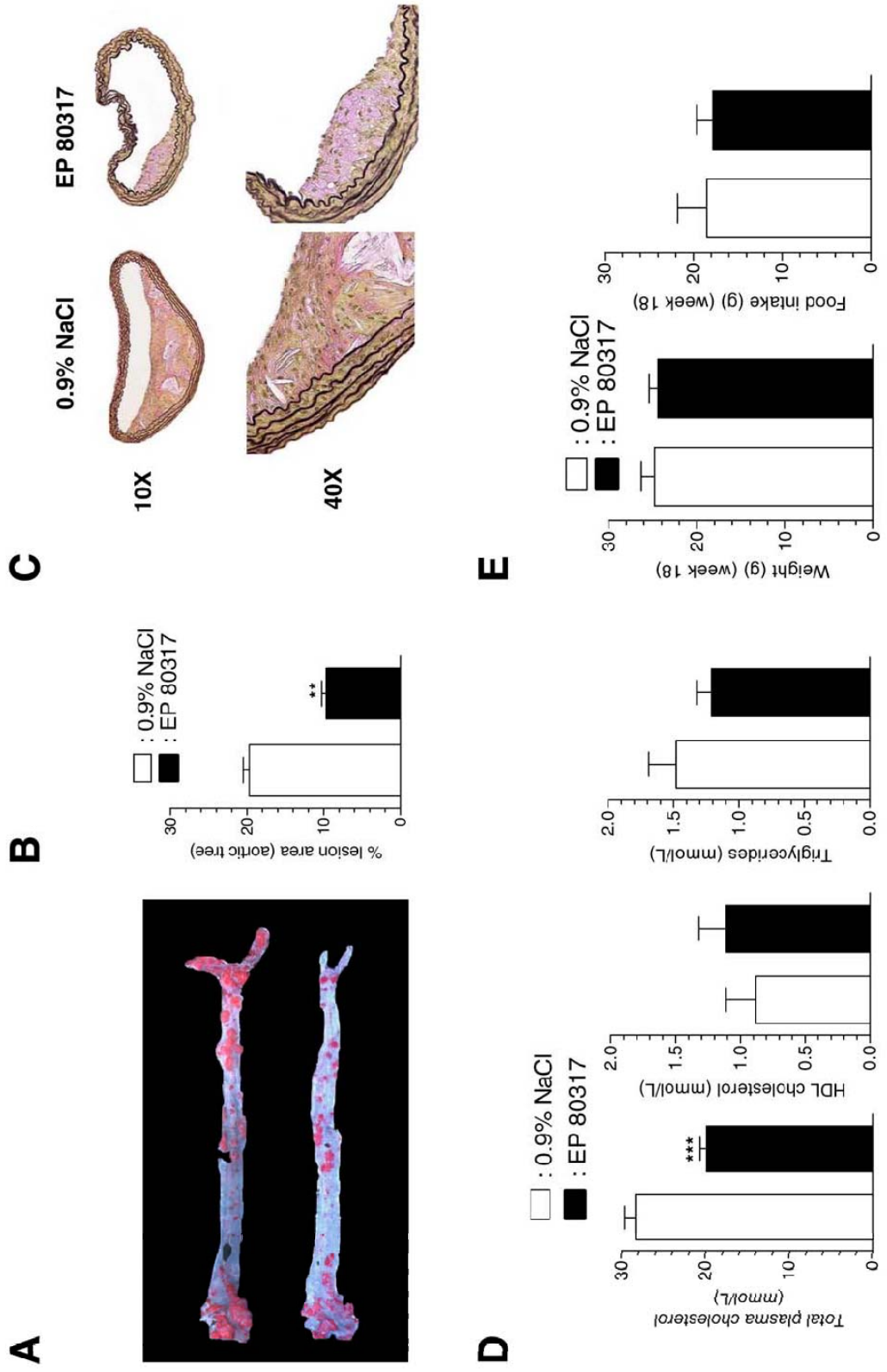
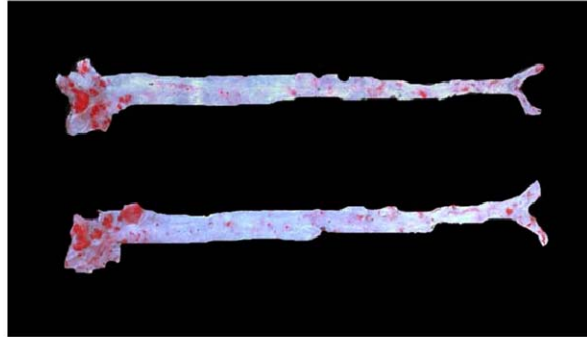
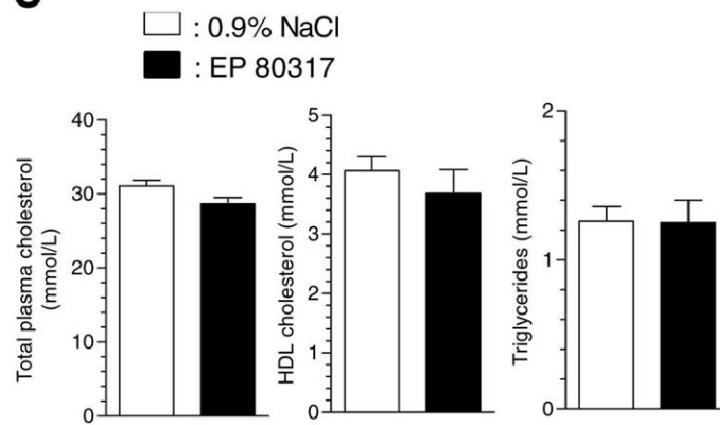


FIGURE 2

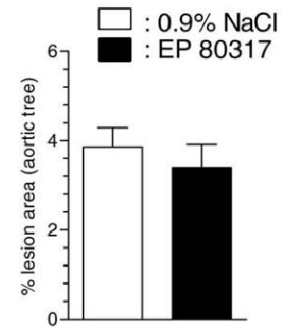
A



C



B



D

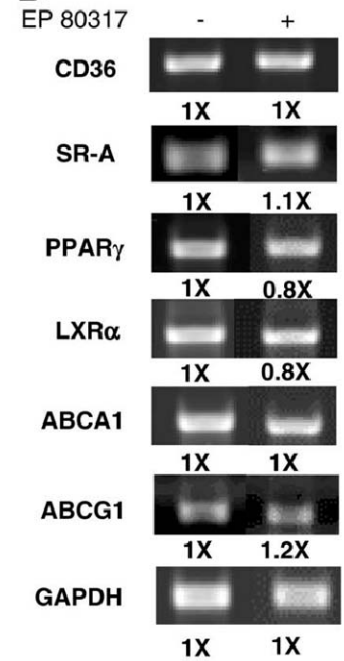
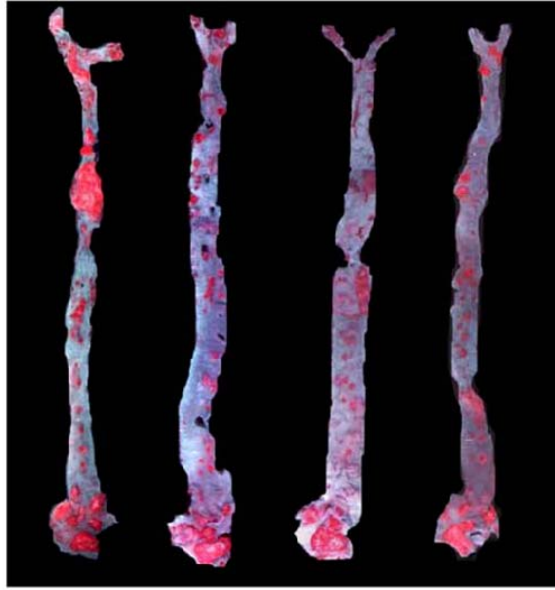
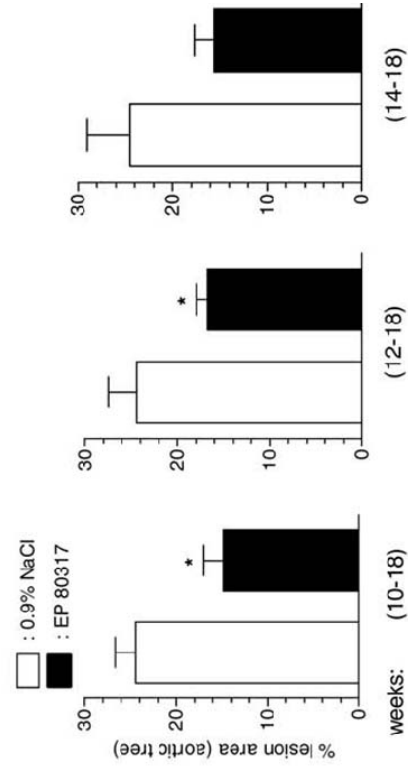


FIGURE 3

A



B



C

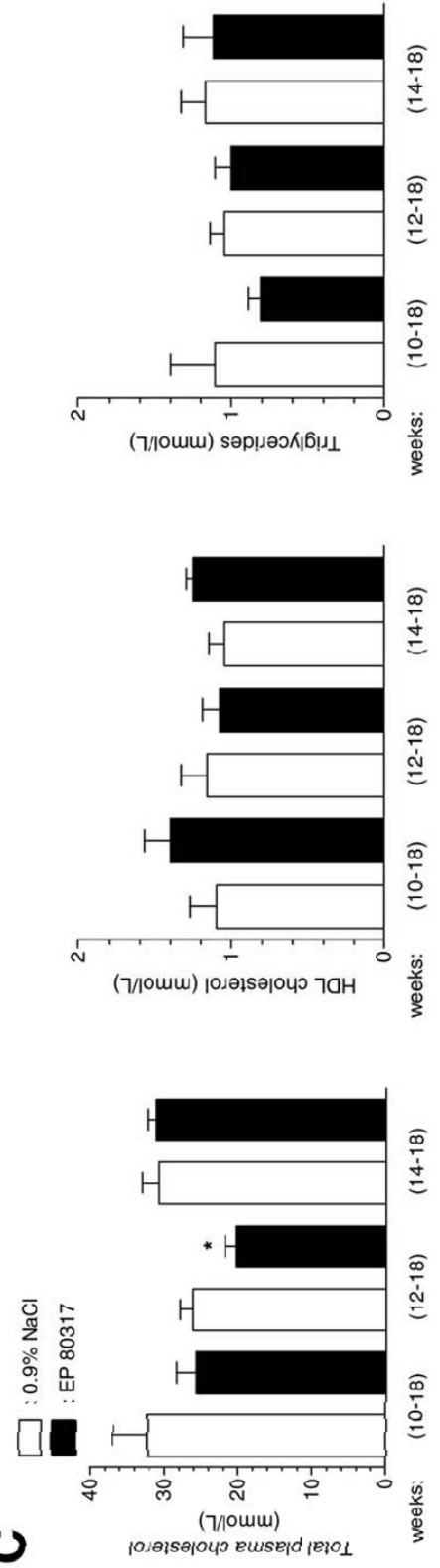


FIGURE 4

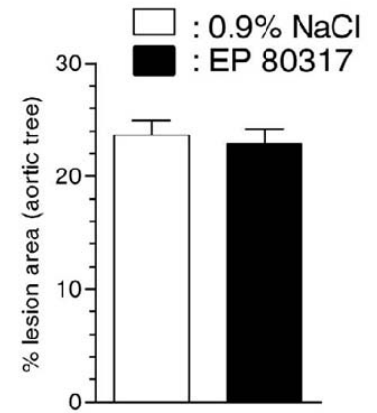
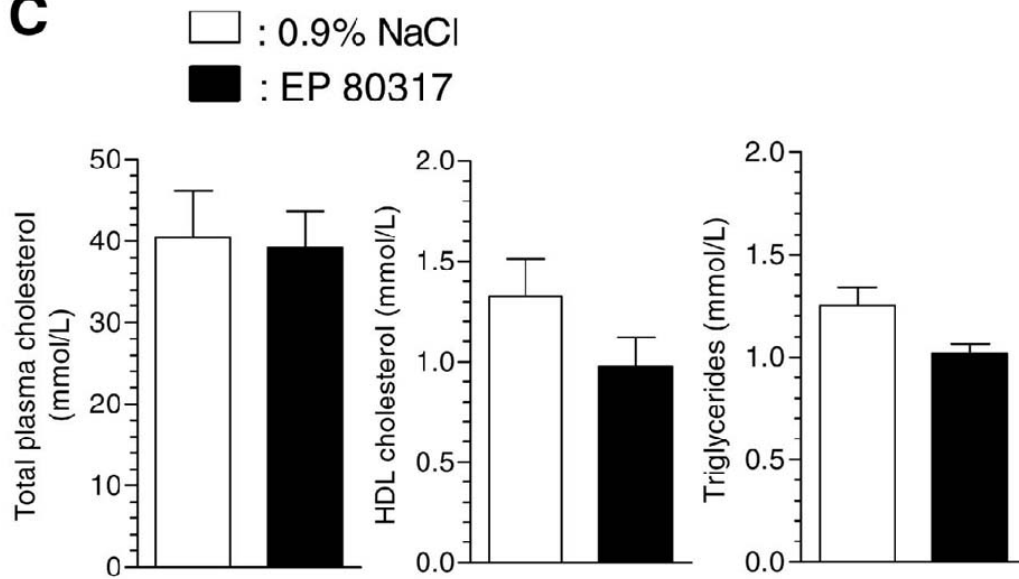
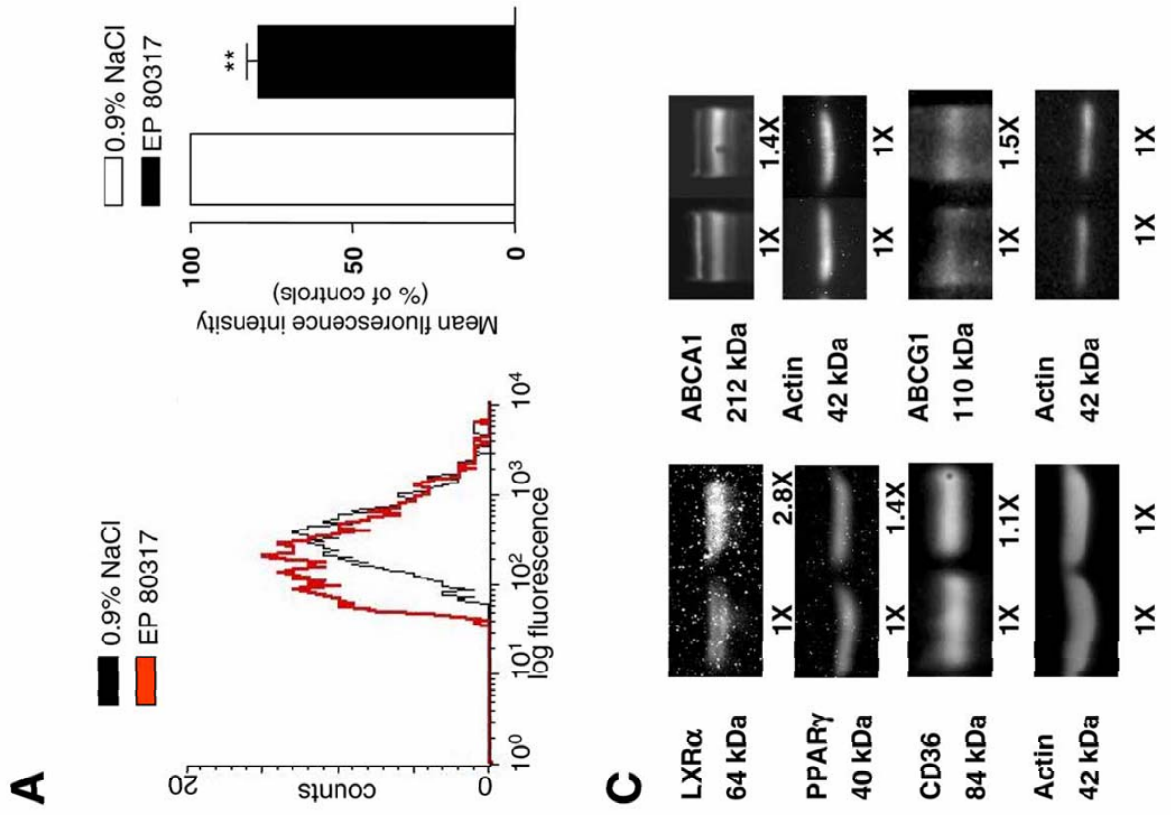
A**B****C**

FIGURE 5



**5 CD36-mediated cholesterol efflux is associated with
PPAR γ activation via a MAPK-dependent COX-2
pathway in macrophages**

Article publié dans *Cardiovasc Res.* 83(3): 457-64 (2009)

CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPAR γ activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages

Kim Bujold¹, David Rhainds^{1,4}, Christian Jossart¹, Maria Febbraio³,
Sylvie Marleau¹ and Huy Ong^{1,2}

¹Faculty of Pharmacy and ²Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³Department of Cell Biology, Lerner Research Institute, Cleveland, OH, USA.

Short title: CD36 signalling through a MAPK/COX-2/PPAR γ pathway

Author for correspondence:

Huy Ong, PhD, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station
Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7; Fax: 514-343-2102,
Tel: 514-343-6440

Key words: CD36, cholesterol efflux, COX-2, macrophages, PPAR γ

⁴Present address: Genizon BioSciences Inc., St-Laurent, Québec, Canada

RÉSUMÉ

Objectifs: Les sécrétines de l'hormone de croissance, comme ligands sélectifs du CD36, présentent des effets anti-athérosclérotiques associés à une régulation à la hausse de la cascade PPAR γ -LXR α -transporteurs ABC. Cependant, la cascade de signalisation menant à l'activation du PPAR γ en réponse à la stimulation du récepteur CD36 reste à déterminer. Le but de cette étude est de déterminer les effets du EP 80317 sur l'efflux du cholestérol dans les macrophages et d'élucider les mécanismes moléculaires menant à l'activation du PPAR γ .

Méthodes et résultats: Le EP 80317 entraîne une augmentation significative de l'efflux du cholestérol et des phospholipides dans les macrophages murins, préalablement chargés avec le [3 H]-cholestérol ou le chlorure de [3 H]-méthylcholine. L'efflux des lipides vers l'apolipoprotéine A-I et les lipoprotéines de haute densité est dépendant du récepteur CD36, tel que montré dans un modèle de souris déficient en CD36. L'efflux des lipides, induite par le EP 80317, est associé à une augmentation de l'activité du PPAR γ . L'activation du récepteur CD36 par le EP 80317 entraîne une cascade de signalisation qui passe par la phosphorylation de la *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK1/2), une augmentation de l'expression de la COX-2 et une augmentation de la production intracellulaire de 15d-PGJ $_2$, un ligand naturel du PPAR γ . De plus, l'efflux du cholestérol induite par le EP 80317 est complètement inhibé par des inhibiteurs du PPAR γ , ERK1/2 et COX-2, ainsi que des inhibiteurs des transporteurs ABC contrairement à l'inhibiteur de la MAPK p38, qui n'a montré aucun effet.

Conclusion : Cette étude suggère que le prostanöide 15d-PGJ₂ joue un rôle central dans l'activation du PPAR γ et de la cascade LXR α -transporteurs ABC suite à l'activation du CD36 par les analogues synthétiques des sécrétines de l'hormone de croissance. La régulation du EP 80317 sur le transport du cholestérol pourrait expliquer, en partie, les effets anti-athérosclérotiques des ligands du CD36.

ABSTRACT

Aims: Growth hormone-releasing peptides (GHRPs) as CD36 selective ligands feature potent anti-atherosclerotic activity that is associated with an upregulation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)-liver X receptor α (LXR α)-ATP-binding cassette (ABC) transporter pathway. However, the mechanism involved in PPAR γ activation in response to CD36 signalling has yet to be determined. Therefore, the present study aims to elucidate the upstream molecular mechanisms through which EP 80317, a selective CD36 ligand, promotes lipid efflux from macrophages through PPAR γ activation.

Methods and results: [3 H]-cholesterol- and [3 H]-methylcholine chloride-labelled murine macrophages treated with EP 80317 showed a significant increase in cholesterol and phospholipid efflux to both apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein in a CD36-dependent manner. Lipid efflux was associated with enhanced activation of PPAR γ . The signalling pathway by which this CD36 ligand promoted lipid efflux involved an increase in intracellular 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) levels induced by extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)-dependent COX-2 expression, leading to PPAR γ activation. In agreement, EP 80317-mediated cholesterol efflux was abrogated by inhibitors of PPAR γ , ERK1/2 and COX-2 as well as ABC transporter inhibitors, whereas a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor had no effect.

Conclusion: These findings suggest a central role for the prostanoid 15d-PGJ₂ in PPAR γ activation and the upregulation of the ABC transporter pathway in response to CD36

activation by synthetic GHRPs analogues. The resulting enhanced cholesterol efflux might explain, at least in part, the atheroprotective effect of selective CD36 ligands.

Contributions

Kim Bujold:

- Conceptualisation du projet
- Exécution de toute la partie expérimentale
- Analyse des résultats
- Écriture de l'article

David Rhains:

- Participation aux expériences avec cellules BHK
- Écriture de l'article

Christian Jossart:

- Courbe de compétition du EP 80317 avec le GHS-R1a

Maria Febbraio:

- Discussion et commentaires sur l'article

Sylvie Marleau et Huy Ong:

- Supervision du travail
- Participation à l'écriture de l'article

INTRODUCTION

The classic pathway for maintaining cholesterol homeostasis in macrophages has been reported to involve peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) activation and the upregulation of liver X receptor α (LXR α)¹. The latter, in return, regulates ATP-binding cassette (ABC) transporter expression in macrophages and cholesterol efflux^{1,2}. More recently, an alternative pathway for PPAR γ activation in macrophages, mediated by cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent increase in intracellular 15-deoxy- Δ ^{12,14}-prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂) production, as an endogenous PPAR γ activator, has been proposed^{3,4}. This pathway has been shown to involve the activation of ERK1/2-induced COX-2 gene transcription³. We have previously reported that hexarelin, a synthetic hexapeptide of the growth hormone-releasing peptides (GHRPs) family, which features a binding site overlapping with that of oxidized low density lipoprotein (oxLDL) on CD36⁵, promoted cholesterol efflux from macrophages and transcriptionally upregulated genes involved in the PPAR γ -LXR α -ABC transporter pathway⁶. Yet, whether PPAR γ activation was involved in attenuating foam cell formation and cholesterol efflux in response to selective CD36 ligands remained unknown.

In the present study, we investigated the role of PPAR γ activation as a central player in mediating cholesterol efflux in response to CD36 signalling by small, selective, non-lipid hexapeptides as ligands of CD36, and elucidated the upstream signalling cascade leading to its activation using EP 80317 as a selective CD36 ligand. Indeed, EP 80317 is a GHRP analogue featuring CD36 binding affinity similar to that of hexarelin⁵, but is devoid of

binding affinity to growth hormone secretagogue receptor-1a (GHS-R1a) (*Figure 1, supplementary data*). In a previous study, we showed that chronic administration of EP 80317 in apolipoprotein E (apoE)-deficient mice attenuated atherosclerosis in a CD36-dependent manner, an effect that was also associated with the upregulation of PPAR γ ⁷. This anti-atherosclerotic effect is consistent with that of PPAR γ agonists, which have been reported to facilitate cholesterol removal and reduce lipid deposition in macrophages ⁸. Interestingly, conditional disruption of PPAR γ in macrophages increased atherosclerosis ⁹. Key players of the cascade leading to cholesterol efflux including LXR α and members of the ABC transporter family, distal to PPAR γ , have been well described ¹⁰⁻¹³. For example, ABCA1 has been shown to mediate efflux of unesterified cholesterol and phospholipids to lipid-poor apolipoprotein A-I (apoA-I) ¹⁴ whereas ABCG1 mediates efflux of lipids to high density lipoprotein (HDL) as its preferred lipid acceptor ¹⁵. Both ABCA1 and ABCG1 were shown to play an important role in reverse cholesterol transport ^{13,16}.

In this study, the molecular mechanism of action of EP 80317, as a selective CD36 ligand, in eliciting cholesterol efflux to both apoA-I and HDL, has been investigated using resident peritoneal macrophages from apoE-deficient mice as a model of atherosclerotic lesional macrophages in functional studies, along with detailed mechanistic studies using murine J774 macrophage-like cells. J774 macrophages, which express very low level of apoE ¹⁷ and the highest intracellular cholesteryl ester/free cholesterol ratio ¹⁸, have been shown to feature high cholesterol efflux compared to mouse peritoneal macrophages ¹⁸, thus appearing as an appropriate cellular model for our study. We report here a novel

mechanism whereby EP 80317 can activate PPAR γ by increasing intracellular 15d-PGJ₂ production through ERK1/2-dependent COX-2 expression in macrophages, thus promoting cholesterol efflux from these cells.

METHODS

Materials

[1 α , 2 α (n)-³H]-cholesterol (35-50 Ci/mmol) and [methyl-³H]-choline chloride (60-85 Ci/mmol) were purchased from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid disodium salt (DIDS) and 8-(4-chlorophenylthio) adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (8-chloro-cAMP) were from Sigma (St. Louis, MO, USA). BLT-1 (blocks lipid transport) was purchased from Chembridge (San Diego, CA, USA). Apolipoprotein A-I (apoA-I), GW 9662, PD 98059 and SB 203580 were purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). NS-398 was purchased from Cayman Chemical (Ann Harbor, MI, USA). High density lipoprotein (HDL) was purchased from Chemicon (Temecula, CA, USA). EP 80317 (Haic-D2MeTrp-DLys-Trp-DPhe-LysNH₂) and analogues such as EP 70905 ([Spiro (S, S)-Pro-Leu]-D2MeTrp-DLys-Trp-DPhe-LysNH₂) and EP 80662 ((D2MeTrp-DHis-DLys-Phe-DTrp-DAla) cyclic) were provided by Ardana Bioscience (Edinburgh, UK).

Macrophage isolation

C57BL/6 wild type, apoE-deficient and apoE/CD36 double-deficient mice were obtained as previously described¹⁹ and bred in house. All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Ethics Committee of the Université de Montréal, in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of experimental animals, conforming with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (A5213-01). Four to five-month-old mice fed a normal chow diet were sacrificed by CO₂ asphyxiation and peritoneal cells were harvested with 5 ml of heparinized saline (10 U/ml).

Cell culture

J774 murine macrophage-like cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). J774 and peritoneal macrophages were cultured in Dulbecco's minimal essential media (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 UI/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Prior to lipid efflux assay, peritoneal macrophages and J774 cells were plated at a density of 5×10^5 and 2×10^5 cells per well, respectively, in 24-well plates.

Lipid efflux assay

Cholesterol and phospholipid efflux were assessed after labelling the cells with 1 µCi/ml of [1 α , 2 α (n)-³H]-cholesterol or [methyl-³H]-choline chloride, respectively. After 48 h, the cells were washed 3 times with DMEM containing 0.02% BSA fatty acid free and were

incubated overnight with EP 80317 (100 nM), or 8-(4-chlorophenylthio) adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt (8-chloro-cAMP) (0.3 mM) or 0.9% NaCl as vehicle. Cells were also incubated in the presence or absence of different inhibitors where indicated. Lipid efflux was initiated by adding either HDL (50 µg/ml) or apoA-I (15 µg/ml) to the cells. At 16 h (unless otherwise stated), the medium was collected and centrifuged for 10 min at 16, 000 g to remove cellular debris. For the quantification of cholesterol efflux, radioactivity in the medium was measured by liquid scintillation counting (LSC). Phospholipid efflux was assessed after extraction of phospholipids from the supernatant and cell pellets with hexane/isopropanol (3:2) and the radioactivity counted by LSC. The percentage efflux was calculated according to the equation: $((\text{medium dpm})/(\text{medium dpm} + \text{cell pellet dpm})) \times 100$.

Western blot analysis

J774 murine macrophages were incubated in 6-well plates. Cells were washed twice with PBS and lysed on ice in modified radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM EDTA, 25 mM NaF, 1% Triton X-100, 0.1% SDS) with protease and phosphatase inhibitors. Samples were centrifuged at 12, 000 g for 30 min at 4°C. Total protein content in supernatants was measured using the bicinchoninic acid protein kit (Pierce, Rockford, IL, USA). Proteins (50-75 µg) were resuspended in sample buffer and proteins were incubated at 95°C for 5 min, except for ABCA1 proteins which were incubated at 37°C for 30 min. Proteins were separated by SDS-PAGE on a 7.5% acrylamide gel and transferred to PVDF membranes, which were blocked with 5% (w/v)

BSA in Tris-buffered saline with 0.5% TWEEN 20. Proteins were detected using rabbit polyclonal antibodies. Rabbit polyclonal anti-PPAR γ (RDI-PPARGabrx) was from Research Diagnostics Inc (Flanders, NJ, USA), anti-LXR α was from Santa Cruz (sc-13068) (Santa Cruz, CA, USA), anti-ABCA1 (NB 400-105), anti-ABCG1 (NB 400-132) and anti-SR-BI (NB 400-104) were from Novus Biologicals (Littleton, CO, USA), purified anti-COX-2 (160126) was from Cayman Chemical (Ann Harbor, MI, USA) and anti-ERK1/2 (9102), anti-phospho ERK1/2 (9101S), anti-p38 (9212) and anti-phospho p38 (9211S) were from Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA). Signals were detected using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and chemiluminescence enhancement. The membranes were also probed with anti- β -actin monoclonal antibody (A-5316) as internal standard control (Sigma, St. Louis, MO, USA). Relative intensities of the bands were analyzed by densitometry using Image Quant software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

PPAR γ DNA binding activity

J774 macrophages were cultured in 35 mm petri dishes and incubated with EP 80317 (100 nM) for the indicated time points. Cells were washed, harvested with ice-cold PBS containing phosphatase inhibitors and centrifuged. Cells were lysed with a hypotonic buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 5 mM NaF, 10 μ M Na₂MoO₄ and 0.1 mM EDTA), mixed with 10% Triton-X-100 and centrifuged at 14,000 g for 30 seconds. The pellet was resuspended in extraction buffer (10 mM HEPES pH 7.9, 0.1 mM EDTA, 1.5 mM MgCl₂, 420 mM NaCl and 25% glycerol) containing protease and phosphatase inhibitors, incubated on ice

and centrifuged at 14, 000g for 10 min. The supernatant was snap frozen and stored at -80°C. DNA binding activity in the nuclear extract was measured using the PPAR γ transcription factor assay kit from Cayman Chemical (Ann Harbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions.

15d-PGJ₂ enzyme immunoassay (EIA)

J774 macrophages were cultured in 6-well plates with EP 80317 (100 nM) in the presence or absence of PD 98059 (10 μ M) and SB 203580 (10 μ M) as ERK1/2 and p38 MAPK inhibitors for 24 h, respectively. Intracellular 15d-PGJ₂ was extracted from J774 cells with C18 cartridges. Briefly, J774 cells were harvested, washed, resuspended in 1 ml ice-cold PBS and homogenized. Cells were acidified to pH 3.5 with 2 M HCl and incubated for 15 min on ice. Samples were centrifuged and the supernatant was loaded on the C18 cartridge which had been previously primed with 10 ml of ethanol followed by 10 ml of deionized water. The column was washed with water, followed by 15% ethanol and then hexane. 15d-PGJ₂ was then eluted with ethyl acetate and dried under a stream of nitrogen. Samples were resuspended in EIA assay buffer and 15d-PGJ₂ was measured using the EIA kit from Assay Design (Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Comparisons between two groups were performed using a 2-tailed Student's *t* test or a one-way ANOVA followed by pair-wise multiple comparisons using the Student-Newman-Keuls method, as indicated. Data were normalized

by log transformation, where appropriate. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

EP 80317 mediates cholesterol and phospholipid efflux in resident peritoneal macrophages in a CD36-dependent manner

To determine the effect of EP 80317 on cholesterol and phospholipid efflux, peritoneal macrophages from apoE-deficient mice were labelled with either [^3H]-cholesterol or [^3H]-methylcholine for 48 h. After a 24 h incubation with EP 80317 (100 nM) or 8-chloro-cAMP¹⁸ (0.3 mM), the cells were exposed to apoA-I as the lipid acceptor to promote cholesterol and phospholipid efflux. EP 80317 and 8-chloro-cAMP induced a significant increase in cholesterol efflux, by $43 \pm 9\%$ ($P < 0.05$) and $85 \pm 18\%$ ($P < 0.001$) compared to vehicle-treated cells, respectively (*Figure 1A*). The increase in cholesterol efflux is paralleled by a $47 \pm 3\%$ ($P < 0.01$) and $103 \pm 12\%$ ($P < 0.001$) increase in phospholipid efflux (*Figure 2, supplementary data*), using peritoneal macrophages from apoE-deficient mice incubated with apoA-I for 16 h. Similar efflux studies were conducted with HDL as the lipid acceptor, for which EP 80317 (100 nM) induced a $22 \pm 5\%$ ($P < 0.05$) in cholesterol efflux (*Figure 1A*), and a $23 \pm 6\%$ ($P < 0.05$) increase in phospholipid efflux (*Figure 2, supplementary data*). A similar increase in EP 80317-stimulated efflux of cholesterol from macrophages harvested from wild type mice was observed (*Figure 3, supplementary data*). To document whether the stimulation of cholesterol efflux by EP

80317 is dependent on cell surface CD36 expression, peritoneal macrophages from apoE/CD36 double-deficient mice were incubated overnight with EP 80317 and then exposed to apoA-I or HDL to initiate cholesterol efflux. EP 80317 (100 nM) did not modulate cholesterol efflux in macrophages lacking CD36 (*Figure 1B*).

EP 80317 stimulated lipid efflux in macrophages in an ABCA1- and ABCG1-dependent but SR-BI-independent manner

J774 cells of murine origin express very low apoE levels, thereby modeling closely apoE-deficient peritoneal macrophages¹⁷. To validate the use of this cell line to study the effects of GHRPs on the pathways leading to reverse cholesterol transport, we documented the effect of EP 80317 on cholesterol and phospholipid efflux. Similar results as those obtained with peritoneal macrophages were observed in J774 cells; EP 80317 (100 nM) and 8-chloro-cAMP (0.3 mM) increased cholesterol efflux to apoA-I by $163 \pm 8\%$ ($P < 0.001$) and $249 \pm 10\%$ ($P < 0.001$) after 4 h and by $95 \pm 3\%$ ($P < 0.001$) and $182 \pm 11\%$ ($P < 0.001$) after 16 h of incubation, respectively (*Figure 2A*). Similar results were also obtained with phospholipid efflux to apoA-I (*Figure 2B*). To investigate the role of EP 80317 in HDL-mediated efflux in this model, [³H]-cholesterol and [³H]-methylcholine chloride-loaded J774 cells were incubated with 100 nM EP 80317 overnight in the presence of 50 µg/ml HDL to promote lipid efflux. Under these conditions, EP 80317 elicited an increase of cholesterol efflux by $30 \pm 3\%$ ($P < 0.01$) and $26 \pm 3\%$ ($P < 0.001$) after 4 h and 16 h incubation with HDL, respectively (*Figure 2A*). In a parallel manner, choline-labelled

phospholipid efflux was stimulated by EP 80317 with a $28 \pm 11\%$ ($P < 0.01$) increase compared to vehicle (*Figure 2B*). A similar increase of cholesterol efflux to HDL was also promoted by other GHRP analogues such as EP 80662 and EP 70905 (*Figure 4, supplementary data*).

To delineate the role of ABCA1, we studied EP 80317-mediated cholesterol efflux to the apoA-I acceptor in J774 cells pretreated with DIDS (100 μ M), a non-selective inhibitor of ABC transporters²⁰. The presence of DIDS completely inhibited EP 80317-stimulated cholesterol efflux to apoA-I (*Figure 2C*). Similar results were obtained using HDL as the cholesterol acceptor (*Figure 2D*), suggesting a role for ABCG1 in EP 80317-mediated lipid efflux. The role of ABCG1 in cholesterol efflux from macrophages was further confirmed using a lipidated form of apoA-I generated with BHK-ABCA1 cells induced with mifepristone in the presence of apoA-I, inasmuch as ABCG1 mediates the transport of cholesterol from cells to lipidated lipoproteins, as opposed to ABCA1^{21,22}. [³H]-cholesterol-labelled J774 cells treated with EP 80317 overnight induced a significant increase in cholesterol efflux to lipidated apoA-I (*Figure 5, supplementary data*).

Since HDL is also an acceptor for the scavenger receptor SR-BI²³, BLT-1, an SR-BI inhibitor^{24,25}, was used to determine the role of this scavenger receptor in cholesterol efflux induced by EP 80317. BLT-1 (10 μ M) pre-treatment of J774 cells did not affect the EP 80317-stimulated cholesterol efflux to HDL (*Figure 2E*).

EP 80317-stimulated lipid efflux is associated with an upregulation of proteins involved in the reverse transport of cholesterol and an upregulation of PPAR γ activity

The stimulatory effect of EP 80317 on the PPAR γ -LXR α -ABC transporters pathway in J774 cells was shown by an increase of LXR α , ABCG1 and ABCA1 protein expression by 2.5-, 2.2- and 7.9-fold, respectively, following a 24 h incubation with EP 80317 (*Figure 3A*). However, no significant change in PPAR γ protein levels was detected by western blot analysis (*Figure 3A*). On the other hand, J774 cells incubated with EP 80317 for 30 min to 24 h showed an increase in PPAR γ activity with a maximum induction of 2.6-fold ($P < 0.01$) at 6 h of incubation (*Figure 3B*).

EP 80317-induced PPAR γ activation in macrophages is mediated by ERK1/2 signalling, COX-2 upregulation and 15d-PGJ₂ production

Time-course experiments showed that EP 80317 (100 nM) induced the phosphorylation of ERK1/2, up to a 1.7-fold increase ($P < 0.05$) in the ratio of P-ERK/total ERK at 60 min, which plateaued at 6 h (1.8-fold, $P < 0.01$) (*Figure 4A*) in J774 macrophages. In contrast, p38 MAPK phosphorylation was transient, with a 1.7-fold increase ($P < 0.01$) at 30 min (*Figure 4A*). In addition, EP 80317-elicited COX-2 transcription was delayed compared to the kinetics of ERK-activation, peaking at 6 h of incubation with a 2-fold increase ($P < 0.01$) (*Figure 4B*). In agreement, an increase in intracellular 15d-PGJ₂ levels was observed at 24 h post-incubation; this effect was inhibited selectively by the ERK1/2 inhibitor PD 98059, but not by the p38 MAPK inhibitor SB 203580³ (*Figure 4C*).

A central role for PPAR γ in mediating the effect of EP 80317 treatment was demonstrated using J774 macrophages treated with GW 9662 (2 μ M), a PPAR γ inhibitor^{26,27}. Pretreatment with GW 9662 completely abrogated EP-80317-elicited LXRA and ABCA1 expression (*Figure 4D*). Furthermore, the role of PPAR γ , ERK1/2, p38 MAPK and COX-2 in EP 80317-mediated cholesterol efflux was assessed in the presence or absence of their respective inhibitors, GW 9662, PD 98059, SB 203580 and NS-398. The increase in cholesterol efflux induced by EP 80317 was completely abrogated by these inhibitors except for SB 203580, suggesting that p38 MAPK is not involved in mediating the effects induced by this CD36 ligand (*Figure 4E*).

DISCUSSION

We have previously reported that apoE-deficient mice treated with EP 80317 feature reduced atherosclerotic lesions⁷. As macrophages are well known to play a central role in the initiation and progression of atherosclerosis and the removal of cholesterol and lipids from macrophages as a critical step in atherosclerosis regression, macrophages from apoE-deficient mice and J774 murine macrophage-like cells have been used to elucidate the molecular mechanism by which EP 80317 modulates the cholesterol efflux from these cells. We demonstrate here for the first time that the binding of scavenger receptor CD36 to its synthetic selective ligand, EP 80317, promotes cholesterol and phospholipid efflux from macrophages by inducing an increase in the intracellular levels of 15d-PGJ₂, which

activates PPAR γ . The increased levels of the intracellular PPAR γ natural ligand is mediated through ERK1/2-dependent COX-2 upregulation following the binding of the synthetic ligand EP 80317 to CD36 in murine macrophages, as summarized in Figure 5.

Our previous work on the regulation of cholesterol metabolism in macrophages by GHRPs has shown that hexarelin, the hexapeptide GHRP prototype, induces an increase in cholesterol efflux from differentiated THP-1 macrophages with enhanced expression of LXR α , apoE and ABC transporters ⁶. Yet, the proximal signalling events involved could not be ascertained as hexarelin features dual binding affinity to CD36 ²⁸ and GHS-R1a, the seven transmembrane G protein-coupled receptor identified as the ghrelin receptor ²⁹. Both receptors are expressed in macrophages. Furthermore, hexarelin appears to signal likely through GHS-R1a to enhance PPAR γ activity as shown in a GHSR-1a-transfected heterologous cell system ⁶. In order to elucidate the molecular signalling pathway involved in cholesterol efflux following CD36 activation, a selective CD36 ligand, EP 80317, devoid of binding affinity to GHS-R1a and featuring the same binding affinity to CD36 as that of hexarelin ⁵, was used.

In the present study, we show a novel regulatory pathway by which CD36 activation may lead to the induction of selected PPAR γ -regulated target genes involved in cholesterol efflux. Indeed, EP 80317, upon its binding to CD36, promotes cholesterol efflux by increasing the expression of COX-2, an inducible enzyme involved in the synthesis of prostaglandins in macrophages, through the activation of the ERK1/2 kinase pathway. In

agreement, EP 80317-induced cholesterol efflux is suppressed by NS-398 and PD 98059, selective inhibitors of COX-2 and ERK1/2, respectively. COX-2 upregulation induced by EP 80317 correlated with an increase in intracellular 15d-PGJ₂ levels, a potent endogenous PPAR γ activator, derived from the metabolism of PGD₂³⁰. In addition, EP 80317-elicited elevation in 15d-PGJ₂ levels were abrogated in PD 98059-treated macrophages, further supporting a role for ERK1/2 in COX-2 activation for the 15d-PGJ₂ biosynthesis. In these experiments, increased PPAR γ activity in EP 80317-treated cells was observed in the absence of protein upregulation of PPAR γ . This is in contrast to our previous observation in differentiated THP-1 macrophages treated with hexarelin, which showed an increase in PPAR γ expression and activity⁶. This differential increase in PPAR γ expression induced by hexarelin might be mediated through the activation of GHS-R1a, as previously shown in heterologous transfected cells⁶. The PPAR γ activation by 15d-PGJ₂ correlated with enhanced protein expression of LXR α and ABC transporters. These results suggest that PPAR γ activation by EP 80317 results in preferred recruitment of PPAR γ to the LXR α promoter, which selectively increases ABC transporter expression without modulating the expression of CD36, as observed previously with hexarelin⁶. In agreement, the upregulation of LXR α , with the subsequent increase in ABC transporter expression and cholesterol efflux promoted by EP 80317, were inhibited by pretreatment with GW 9662, a specific PPAR γ inhibitor, confirming the central role of PPAR γ in the macrophage lipid efflux signalling pathway. EP 80317 also appears to play a critical role in the reverse cholesterol transport process by activating selectively ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, in the cholesterol removal from peripheral macrophages via HDL acceptors. Interestingly,

the CD36 signalling cascade triggered by EP 80317 in macrophages is similar to that induced by statins (3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors), which were found to activate PPAR γ by inducing COX-2-dependent increase in 15d-PGJ₂ level in macrophages⁴. Such similarities in the signalling pathways converging to PPAR γ activation may explain, at least in part, the antiatherogenic property of statins³¹ and EP 80317⁷ by promoting cholesterol efflux from macrophages. Yet, whereas statins appear to signal through ERK and p38-dependent pathways, no evidence of p38 activation was found to be involved in EP 80317-elicited cholesterol efflux in J774 murine macrophages. Recently, it has been reported that oxLDL induced an increase in 15d-PGJ₂ through ERK1/2-dependent COX-2 expression³. This signalling pathway induced by oxLDL in macrophages has been suggested to prevent atherosclerotic progression³. Yet, this protective effect may be overridden by atherogenic oxidized phospholipids³²⁻³⁴ and oxLDL-upregulated proinflammatory cytokines³⁵. A positive regulatory feedback loop upregulating CD36 expression occurs concomitantly, further stimulating oxLDL uptake³⁶. In contrast, activation of PPAR γ by EP 80317 is uncoupled from the regulatory positive feedback loop leading to CD36 upregulation with subsequent uptake of oxLDL and foam cell formation. This may explain, at least in part, the antiatherosclerotic effect of this synthetic CD36 ligand⁷. Further studies will focus on potential anti-inflammatory effects of EP 80317 through 15d-PGJ₂ elevation within macrophages, as 15d-PGJ₂ activation of PPAR γ has been associated with reduced TNF- α , IL-6 and inducible nitric oxide synthase expression³⁷.

In conclusion, we demonstrated a novel mechanism whereby a selective ligand of CD36 can activate PPAR γ by increasing 15d-PGJ₂ production through an ERK1/2–dependent COX-2 expression in macrophages, thereby promoting cholesterol and phospholipid efflux from macrophages. These findings open new perspectives in targeting this signalling pathway as a potential novel approach for the treatment of atherosclerosis.

FUNDING

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP 62837) and by Ardana Bioscience (Edinburgh, Scotland, UK). K. B. and C.J. were recipients of doctoral fellowships from Robert Dugal-Rx&D and Rx&D Foundation, respectively. D. R. was a recipient of a postdoctoral scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to gratefully acknowledge the generous gift of BHK-ABCA1 and BHK-ABCG1 cells by Dr John F. Oram and the skillful technical assistance of Carolyn Johnson and Petra Pohankova.

REFERENCES

1. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB et al. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 2001;7:161-171.
2. Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nat Med* 2002;8:1243-1248.
3. Taketa K, Matsumura T, Yano M, Ishii N, Senokuchi T, Motoshima H et al. 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;283:9852-9862.
4. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K et al. 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;100:1442-1451.
5. Demers A, McNicoll N, Febbraio M, Servant M, Marleau S, Silverstein R et al. Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem J* 2004;382:417-424.
6. Avallone R, Demers A, Rodrigue-Way A, Bujold K, Harb D, Anghel S et al. A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor up-regulates sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway. *Mol Endocrinol* 2006;20:3165-3178.

7. Marleau S, Harb D, Bujold K, Avallone R, Iken K, Wang Y et al. EP 80317, a ligand of the CD36 scavenger receptor, protects apolipoprotein E-deficient mice from developing atherosclerotic lesions. *FASEB J* 2005;19:1869-1871.
8. Li AC, Binder CJ, Gutierrez A, Brown KK, Plotkin CR, Pattison JW et al. Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest* 2004;114:1564-1576.
9. Babaev VR, Yancey PG, Ryzhov SV, Kon V, Breyer MD, Magnuson MA et al. Conditional knockout of macrophage PPARgamma increases atherosclerosis in C57BL/6 and low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1647-1653.
10. Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:712-719.
11. Tall AR, Costet P, Wang N. Regulation and mechanisms of macrophage cholesterol efflux. *J Clin Invest* 2002;110:899-904.
12. Cavelier C, Lorenzi I, Rohrer L, von Eckardstein A. Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761:655-666.
13. Jessup W, Gelissen IC, Gaus K, Kritharides L. Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Curr Opin Lipidol* 2006;17:247-257.
14. Smith JD, Le Goff W, Settle M, Brubaker G, Waelde C, Horwitz A et al. ABCA1 mediates concurrent cholesterol and phospholipid efflux to apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* 2004;45:635-644.

15. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:9774-9779.
16. Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Billheimer JT, Rothblat GH et al. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest* 2007;117:2216-2224.
17. Werb Z, Chin JR. Onset of apoprotein E secretion during differentiation of mouse bone marrow-derived mononuclear phagocytes. *J Cell Biol* 1983;97:1113-1118.
18. Kiss RS, Maric J, Marcel YL. Lipid efflux in human and mouse macrophagic cells: evidence for differential regulation of phospholipid and cholesterol efflux. *J Lipid Res* 2005;46:1877-1887.
19. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF et al. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* 2000;105:1049-1056.
20. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP et al. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat Med* 2001;7:53-58.
21. Vaughan AM, Oram JF. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res* 2006;47:2433-2443.
22. Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M et al. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:534-540.

23. Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC et al. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 1997;272:20982-20985.
24. Nieland TJ, Penman M, Dori L, Krieger M, Kirchhausen T. Discovery of chemical inhibitors of the selective transfer of lipids mediated by the HDL receptor SR-BI. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15422-15427.
25. Duong M, Collins HL, Jin W, Zanotti I, Favari E, Rothblat GH. Relative contributions of ABCA1 and SR-BI to cholesterol efflux to serum from fibroblasts and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:541-547.
26. Xia M, Hou M, Zhu H, Ma J, Tang Z, Wang Q et al. Anthocyanins induce cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages: the role of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-liver X receptor alpha-ABCA1 pathway. *J Biol Chem* 2005;280:36792-36801.
27. Hou M, Xia M, Zhu H, Wang Q, Li Y, Xiao Y et al. Lysophosphatidylcholine promotes cholesterol efflux from mouse macrophage foam cells via PPARgamma-LXRalpha-ABCA1-dependent pathway associated with apoE. *Cell Biochem Funct* 2007;25:33-44.
28. Bodart V, Febbraio M, Demers A, McNicoll N, Pohankova P, Perreault A et al. CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res* 2002;90:844-849.
29. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996;273:974-977.

30. Straus DS, Glass CK. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med Res Rev* 2001;21:185-210.
31. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;420:868-874.
32. Podrez EA, Hoppe G, O'Neil J, Hoff HF. Phospholipids in oxidized LDL not adducted to apoB are recognized by the CD36 scavenger receptor. *Free Radic Biol Med* 2003;34:356-364.
33. Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M et al. Identification of a novel family of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem* 2002;277:38503-38516.
34. Podrez EA, Poliakov E, Shen Z, Zhang R, Deng Y, Sun M et al. 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* 2002;277:38517-38523.
35. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126.
36. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JGA, Chen HW, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR gamma. *Cell* 1998;93:229-240.
37. Scher JU, Pillinger MH. 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol* 2005;114:100-109.

FIGURE LEGENDS

Figure 1

EP 80317 increases lipid efflux from resident peritoneal macrophages of apoE-deficient mice in a CD36-dependent manner. [³H]-cholesterol-loaded peritoneal macrophages from apoE- (A) and apoE/CD36 double-deficient (B) mice were incubated overnight with EP 80317 (100 nM) or 8-chloro-cAMP (0.3 mM). Efflux was initiated by incubating the cells with apoA-I (15 µg/ml) or HDL (50 µg/ml) for 16 h. Data are expressed as the mean ± SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. **P* < 0.05, ****P* < 0.001 compared to 0.9% NaCl and #*P* < 0.05, ###*P* < 0.001 compared to EP 80317.

Figure 2

EP 80317 increases lipid efflux from murine J774 macrophages through an ABC transporter-dependent pathway. [³H]-cholesterol (A) or [³H]-methylcholine chloride (B)-loaded J774 cells were stimulated overnight with EP 80317 (100 nM) or 8-chloro-cAMP (0.3 mM). Efflux was initiated by incubating the cells with apoA-I (15 µg/ml) or HDL (50 µg/ml) for 4 or 16 h. [³H]-cholesterol-loaded J774 cells were treated overnight with EP 80317 (100 nM) in the absence or presence of DIDS (100 nM) (C and D), an ATP-binding cassette inhibitor. Efflux was initiated by incubating the cells with (C) apoA-I (15 µg/ml) or (D) HDL (50 µg/ml) for 16 h. In additional experiments, J774 cells were treated overnight with EP 80317 (100 nM) and efflux was initiated by adding HDL (50 µg/ml) with or without BLT-1 (10 µM), a SR-BI inhibitor, for 4 h (E). Data are expressed as the mean ±

SEM of 3 independent experiments in triplicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to 0.9% NaCl, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ compared to EP 80317 and λ $P < 0.05$ compared to BLT-1.

Figure 3

EP 80317-induced ABC transporters and LXR α expression is mediated by the increase of PPAR γ activity. (A) Immunoblots for PPAR γ , LXR α , ABCA1 and ABCG1 expression in macrophages following overnight incubation with EP 80317 (100 nM). (B) J774 cells were incubated with EP 80317 (100 nM) and PPAR γ activity was assessed at different time point using the PPAR γ Transcription Factor Assay kit from Cayman Chemical. Each value represents the mean \pm SEM of 3 independent experiments in duplicate. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to 0.9% NaCl.

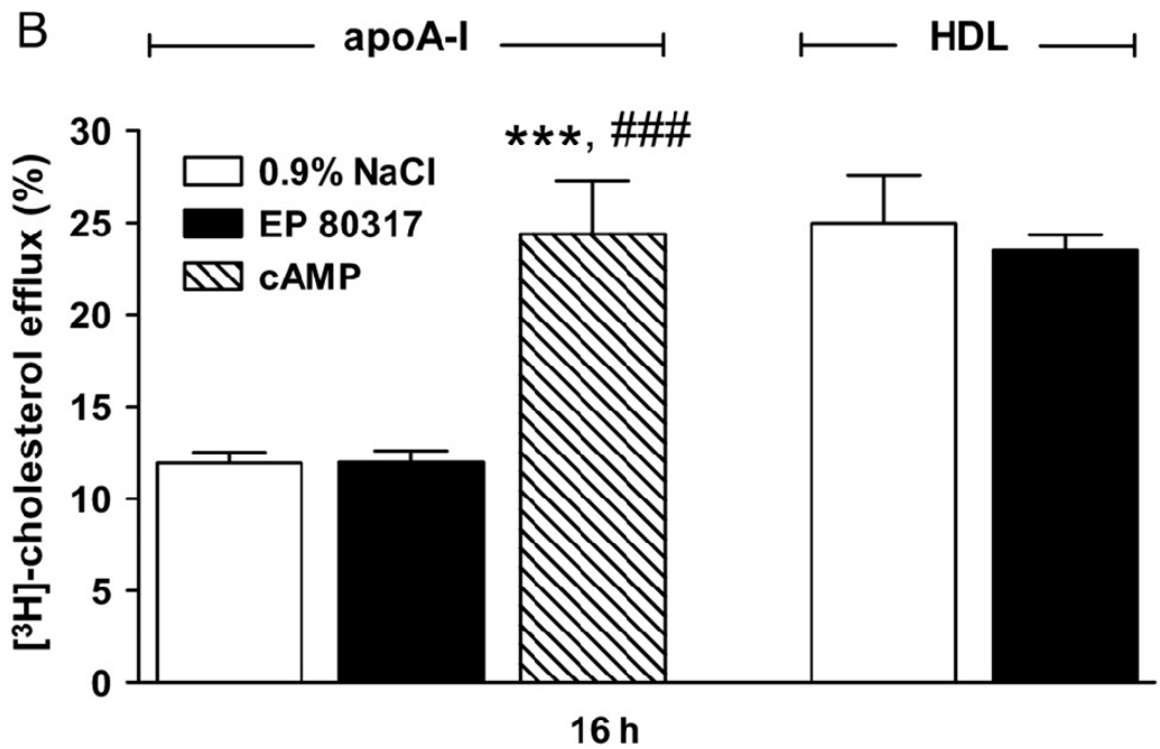
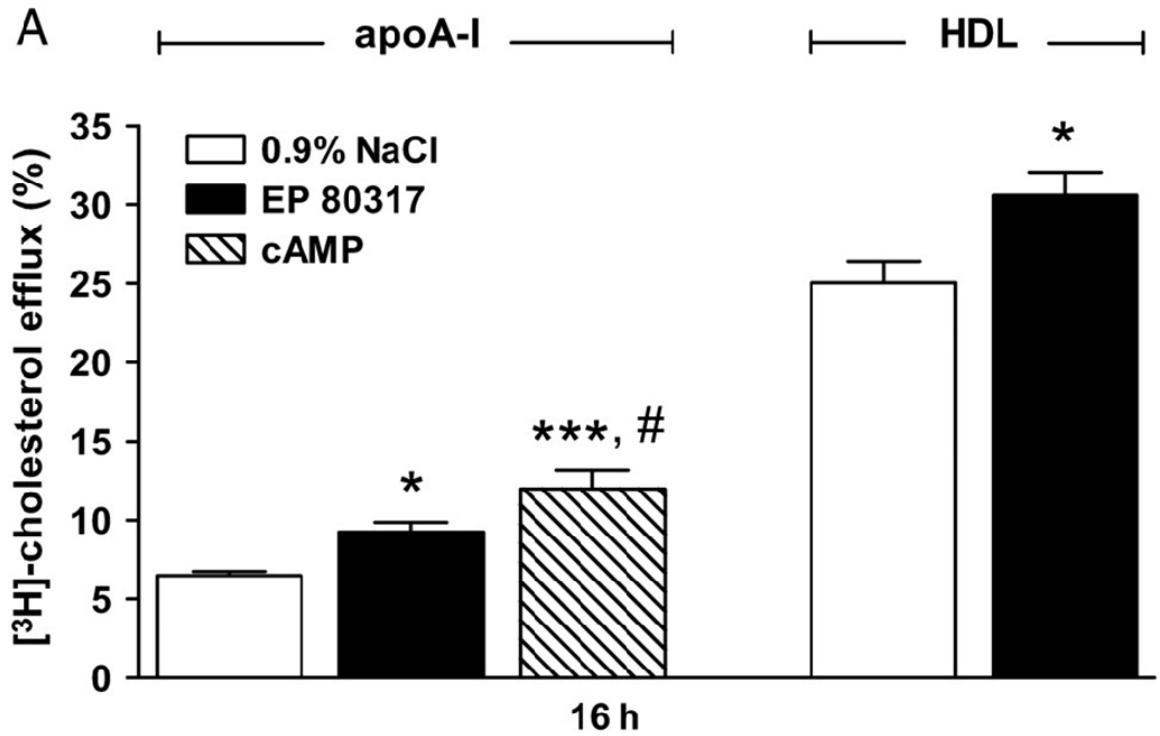
Figure 4

EP 80317 increases ERK1/2 activation, COX-2, LXR α and ABCA1 expression and 15d-PGJ₂ production but does not modulate p38 activity. J774 cells were incubated with EP 80317 (100 nM) for the indicated times. Protein samples were immunoblotted with (A) anti-phospho ERK1/2 (P-ERK1/2), anti-ERK1/2 (total-ERK1/2), anti-phospho p38 (P-p38), anti-p38 (total-p38) and (B) anti-COX-2 antibodies. Representative bands from 3 independent experiments are shown. (C) J774 macrophages were incubated with EP 80317 (100 nM) in presence or absence of PD 98059 (10 μ M) or SB 203580 (10 μ M) for 24 h and intracellular 15d-PGJ₂ concentrations determined by EIA. (D) Immunoblots for LXR α and

ABCA1 expression in J774 macrophages following overnight incubation with 100 nM EP 80317 in the presence or absence of GW 9662 (2 μ M). (E) Cholesterol efflux from EP 80317 (100 nM) stimulated J774 cells in presence or absence of GW 9662(2 μ M), PD 98059 (10 μ M), SB 203580 (10 μ M) or NS-398 (10 μ M). Results represent the mean \pm SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ compared to 0.9% NaCl, # $P < 0.05$ compared to EP 80317 and & $P < 0.05$ compared to PD 98059 + EP 80317.

Figure 5

Hypothetical pathway of EP 80317-mediated cholesterol and phospholipid efflux from macrophages. The activation of the scavenger receptor CD36 by its ligand EP 80317 induced an ERK1/2-dependent upregulation of COX-2. COX-2 induces an increase of 15d-PGJ₂ intracellular levels, that in turn, upregulates PPAR γ activity. The activation of PPAR γ mediates the upregulation of ABC transporters responsible for the cholesterol and phospholipid efflux from macrophages.

Figure 1

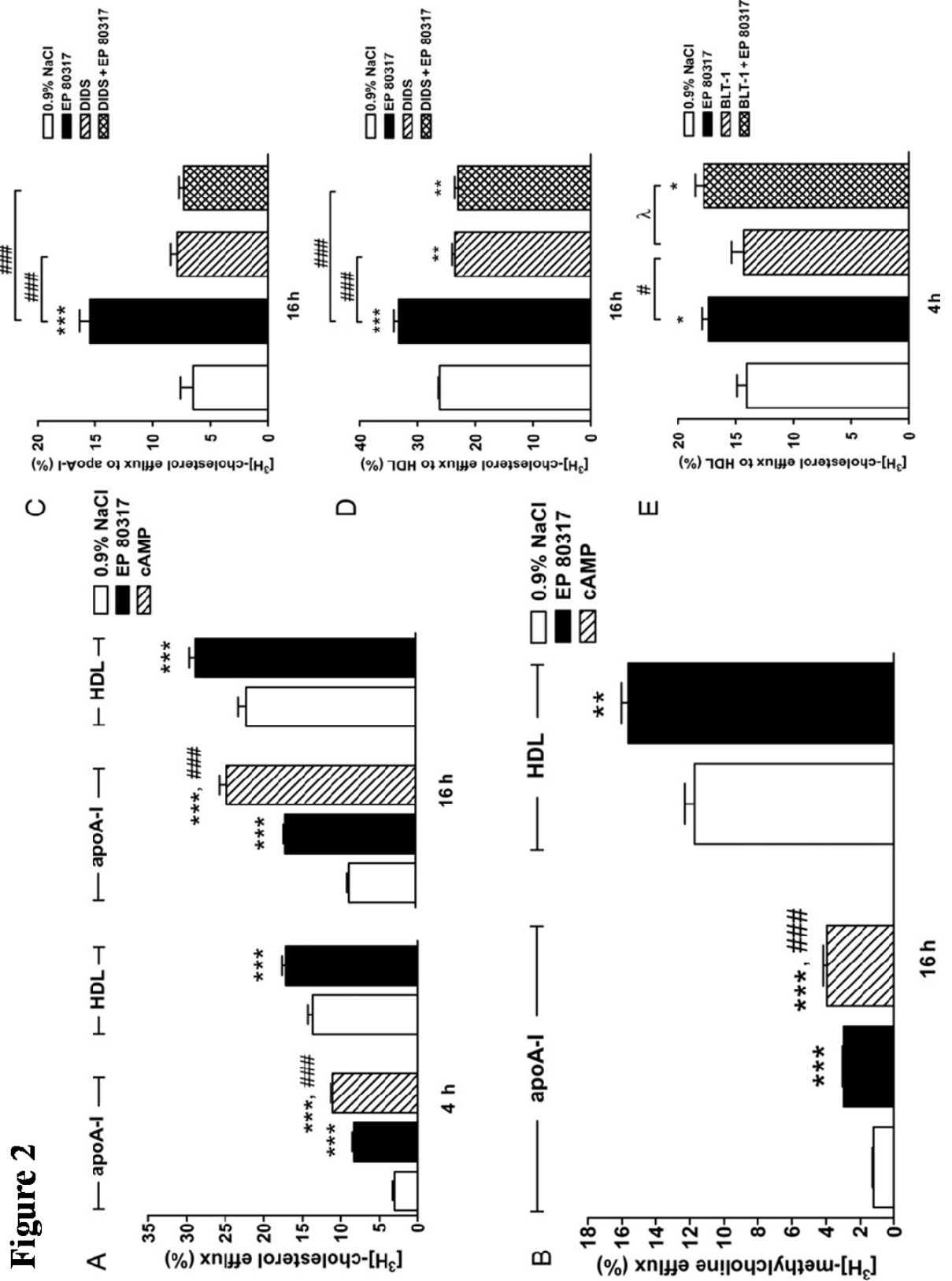


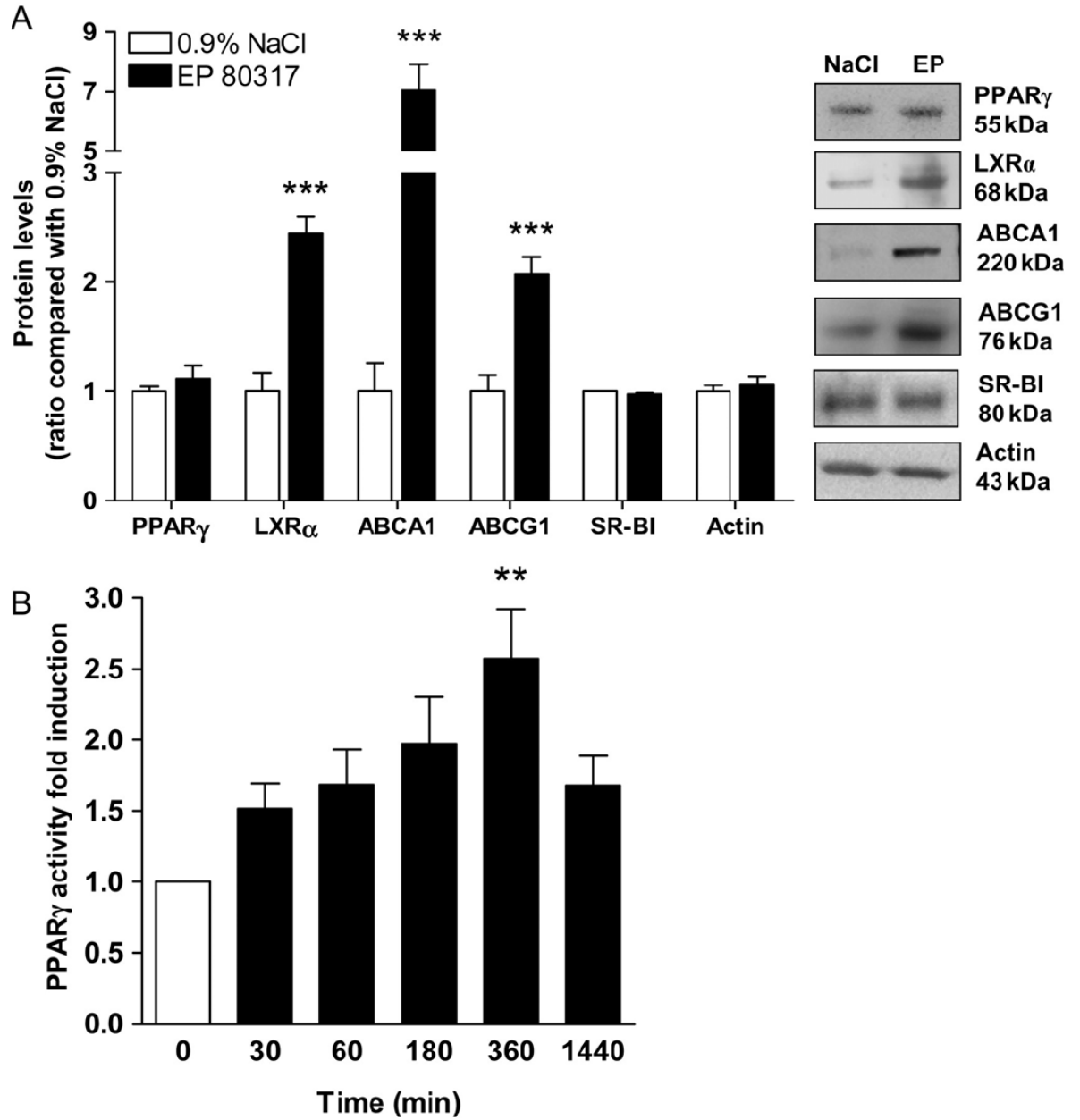
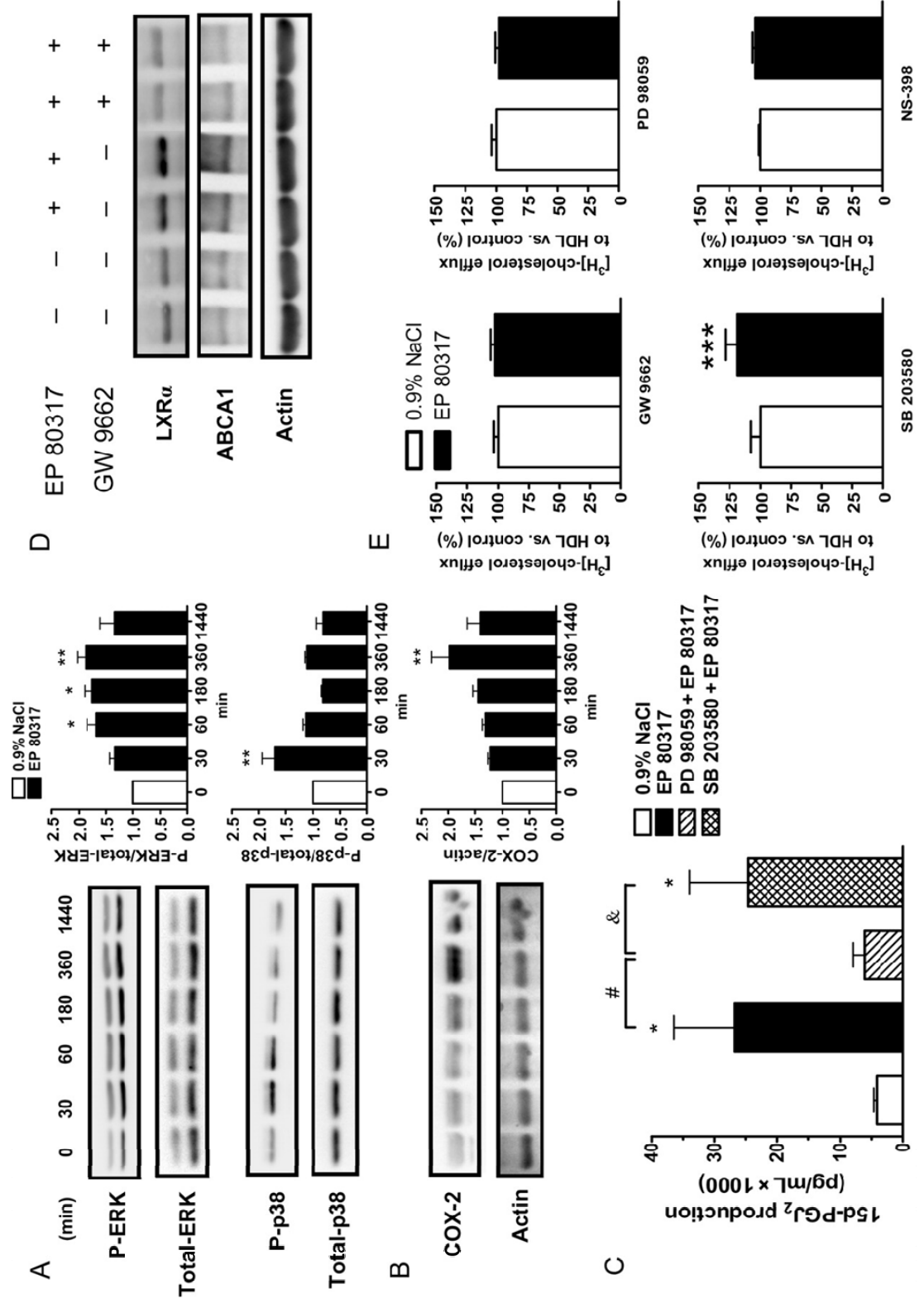
Figure 3

Figure 4



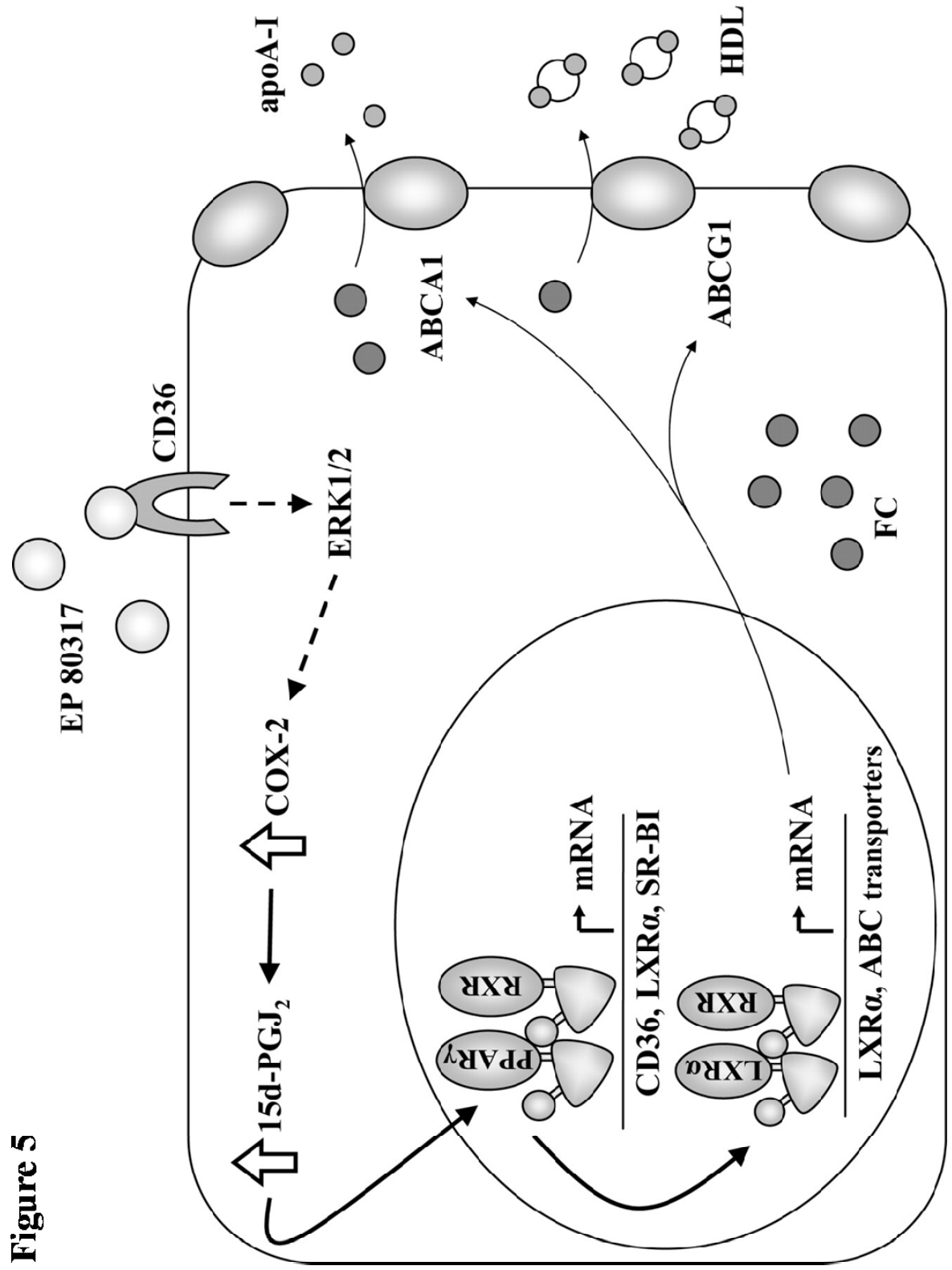


Figure 5

SUPPLEMENTARY DATA

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Competition binding analysis of EP 80317 on GHS-R1a. Competition binding curves of des-methyl-hexarelin and EP80317 for the binding of [¹²⁵I]-ghrelin (**1-28**). GHS-R1a-transfected LLC-PK1 membranes (50 µg) were incubated with 3×10^{-11} M of [¹²⁵I]-ghrelin (**1-28**) and varying concentrations of 2-desmethyl-hexarelin or EP 80317 as competitive ligands in 0.5 mL of binding buffer (50mM Tris-HCl, pH 7.3, 5mM MgCl₂, 2.5mM EDTA, 30 µg/ml bacitracin). After 1h incubation at 22 °C, bound radioligand was separated from free by vacuum filtration on Whatman GF/C filters pretreated with a 1% polyethylenimine solution. Data **are expressed as** the mean ± SEM. of triplicate determinations. The curves were analyzed with Prism (Graphpad Software Inc).

Figure 2

EP 80317 increases phospholipid efflux from resident peritoneal macrophages of apoE-deficient mice. EP 80317 (100 nM)- or 8-chloro-cAMP (0.3 mM)-stimulated efflux of [³H]-methylcholine to apoA-I (15 µg/ml) or HDL (50 µg/ml) at 16 hours. Data are expressed as the mean ± SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ compared to 0.9% NaCl and ### $P < 0.001$ compared to EP 80317.

Figure 3

EP 80317 increases cholesterol efflux from resident peritoneal macrophages of wild type mice. [³H]-cholesterol-loaded peritoneal macrophages from wild type mice were stimulated overnight with EP 80317 (100 nM) or 8-chloro-cAMP (0.3 mM). Efflux was initiated by incubating the cells with apoA-I (15 µg/ml) or HDL (50 µg/ml) for 16 h. The results show an increase in EP 80317-stimulated efflux by 51 and 14% to apoA-I and HDL, respectively, while cAMP increased cholesterol efflux to apoA-I by 117% compared to vehicle. Data are expressed as the mean ± SEM from 3 independent experiments performed in triplicate. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared to vehicle (0.9% NaCl) and ## $P < 0.01$ compared to EP 80317.

Figure 4

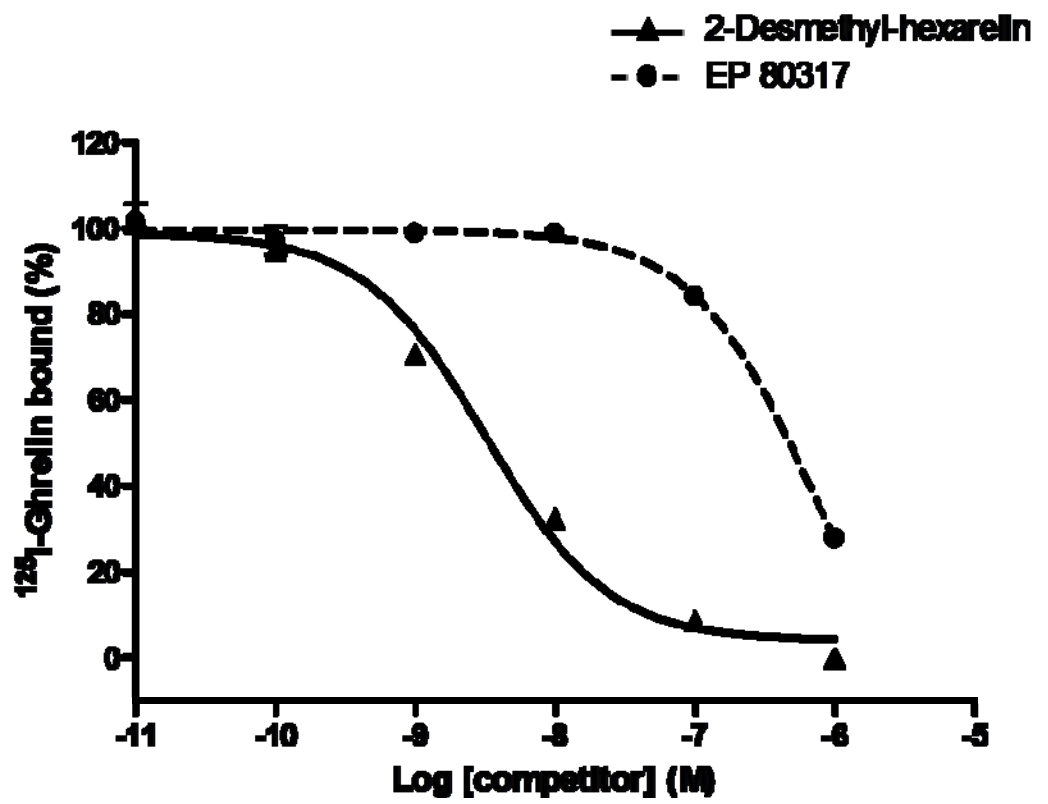
GHRPs analogues stimulate cholesterol efflux from J774 cells. Cholesterol efflux from J774 cells was also assessed, as previously described, following the incubation with other GHRP analogues. EP 80662 and EP 70905 induced a significant increase in cholesterol efflux (16% and 19%, respectively). Data are expressed as one representative experiment ± SEM from 3 experiments performed in triplicate. ** $P < 0.01$ compared to 0.9% NaCl.

Figure 5

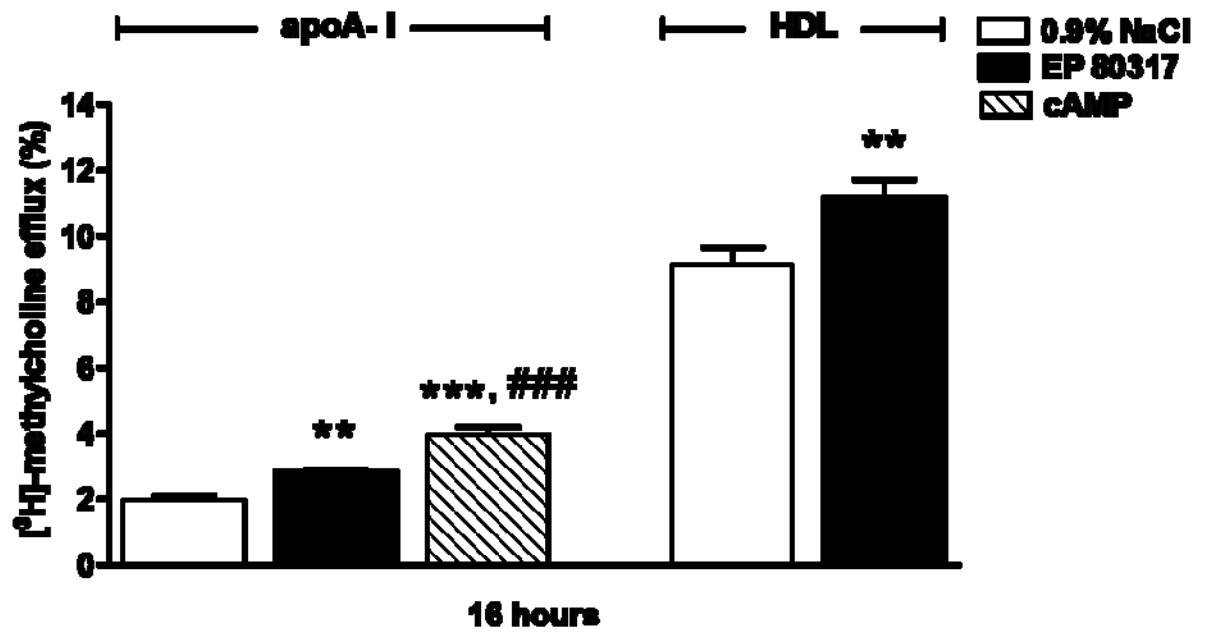
EP 80317 stimulates cholesterol efflux to lipidated apoA-I from murine J774 macrophages. ApoA-I (15 µg/ml) was incubated with mifepristone-induced BHK-ABCA1 cells for 24 hours and lipidated apoA-I particles were collected and used as a cholesterol

acceptor. [³H]-cholesterol-loaded J774 cells were treated overnight with EP 80317 (100 nM). Efflux was initiated by incubating the cells with lipidated-apoA-I (15 µg/ml) for 16 hours. Data are expressed as the mean ± SEM of 3 independent experiments performed in triplicate. ** $P < 0.01$ compared to 0.9% NaCl.

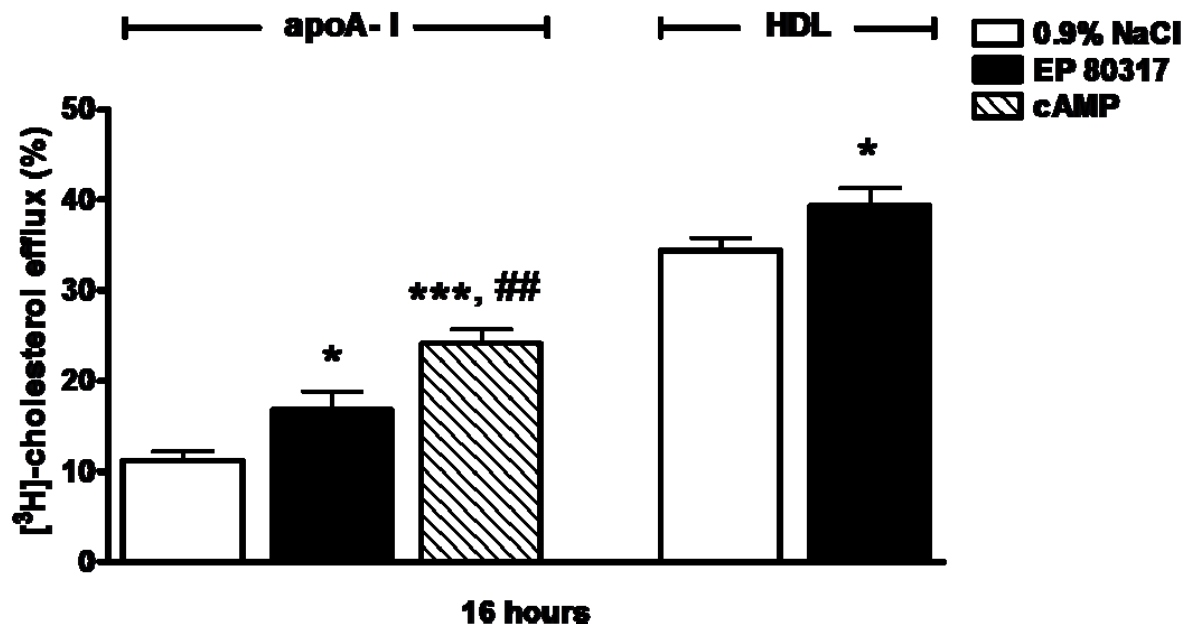
Supplementary data
Figure 1



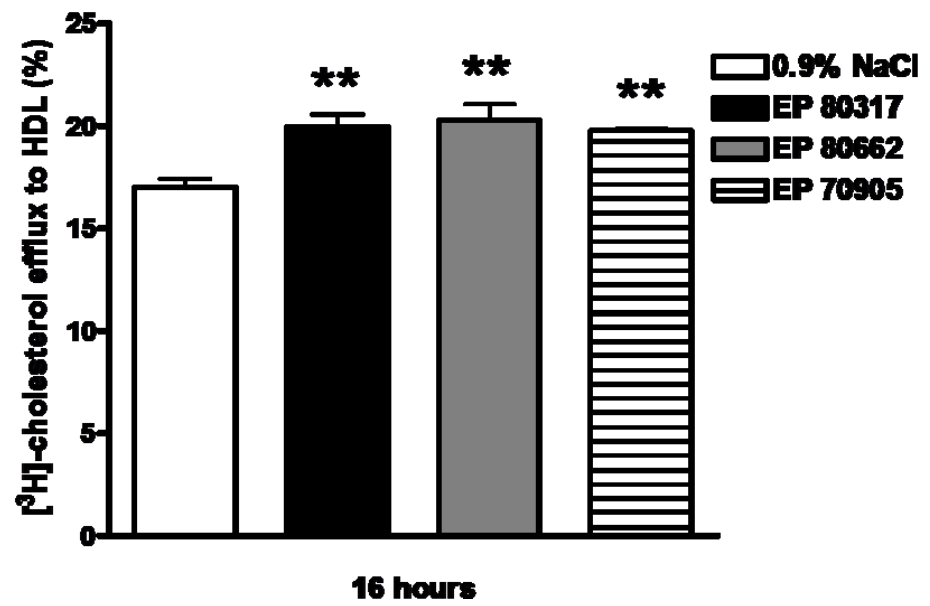
Supplementary data
Figure 2



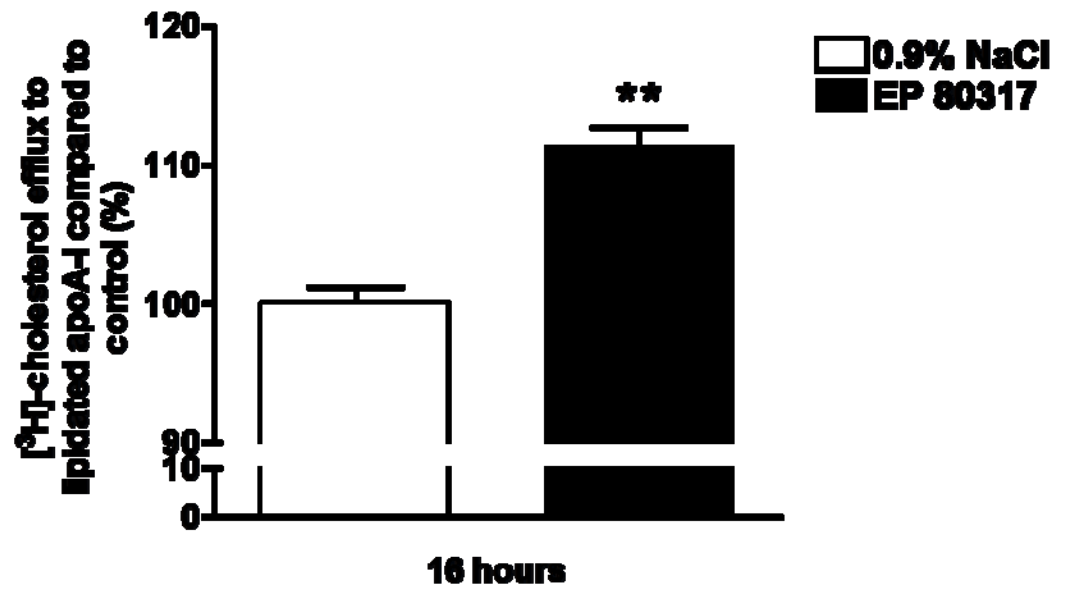
Supplementary data
Figure 3



Supplementary data
Figure 4



Supplementary data
Figure 5



6 EP 80317, a CD36 selective ligand, promotes reverse cholesterol transport in apolipoprotein E-deficient mice

Manuscrit en voie de soumission à Atherosclerosis 2012

EP 80317, a CD36 selective ligand, promotes reverse cholesterol transport in apolipoprotein E-deficient mice

Kim Bujold^a, David Rhainds^{a,1}, Louise Brissette^b, Maria Febbraio^c, Sylvie Marleau^a and
Huy Ong^a

^aFaculty of Pharmacy, Université de Montréal, ^bDépartement des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, Canada and ^cDepartment of Molecular Cardiology, Lerner Research Institute, Cleveland, OH, USA

Short title: EP 80317 promotes RCT *in vivo*

Author for correspondence:

Huy Ong, PhD, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7; Fax: 514-343-2102,
Tel: 514-343-6460

Key words: CD36, reverse cholesterol transport, ABCG5, ABCG8, NPC1L1

¹Present address: Montreal Heart Institute, Montréal, Québec, Canada

Résumé

Objectifs: Les effets anti-athérosclérotiques et hypocholestérolémiantes du EP 80317, un ligand sélectif du récepteur CD36, sont associés à une augmentation de l'efflux du cholestérol par les macrophages en réponse à l'activation de la cascade *peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)-liver X receptor α (LXR α)-transporteurs ATP-binding cassette (ABC)*. Toutefois, les mécanismes moléculaires responsables de la diminution des lésions athérosclérotiques et du taux de cholestérol total plasmatique engendrés par les ligands du CD36 *in vivo* restent à être élucidés. La présente étude a pour but d'évaluer les effets du EP 80317 sur le transport inverse du cholestérol chez des souris athérosclérotiques et de documenter ses effets sur le métabolisme du cholestérol au niveau hépatique et intestinal.

Méthodes et résultats: Pour étudier le transport inverse du cholestérol, nous avons effectué une injection intrapéritonéale de macrophages murins de la lignée J774 radiomarqués préalablement avec du cholestérol tritié chez des souris apoE^{-/-} prétraitées pendant une période de 12 semaines avec le EP 80317. Quarante-huit heures après l'injection des cellules radiomarquées, les souris ont été euthanasiées et les tissus, incluant le foie, les intestins et les fèces ont été prélevés. Nos résultats ont montré une augmentation de 205% ($P = 0.0374$) des taux de cholestérol tritié dans les fèces (cholestérol + acides biliaires) chez les souris traitées avec le EP 80317 par comparaison aux souris témoins, sans modification significative des concentrations plasmatiques du traceur ni accumulation hépatique. En accord avec l'augmentation du traceur au niveau fécal, l'expression des

gènes impliqués dans le métabolisme intestinal du cholestérol, dont $LXR\alpha$, ABCG5 et ABCG8 a été régulée à la hausse tandis que le transporteur NPC1L1, impliqué dans l'absorption intestinale du cholestérol, a été régulé à la baisse après un pré-traitement de 12 semaines par le EP 80317. Les gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol au niveau hépatique n'ont pas été modulés par le EP 80317.

Conclusion: Cette étude montre que les ligands sélectifs du CD36 favorisent le transport inverse *in vivo* en augmentant l'excrétion du cholestérol et en réduisant son absorption intestinale. Ces effets sont indépendants de la sécrétion hépatique du cholestérol dans les acides biliaires; ils sont plutôt associés à une augmentation de l'efflux du cholestérol par la voie transintestinale.

Abstract

Aims: The CD36 selective ligand, EP 80317, features potent anti-atherosclerotic and hypocholesterolemic effects that are associated with an increase in macrophage cholesterol efflux through the activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)-liver X receptor α (LXR α)-ATP-binding cassette (ABC) transporter pathway. However, the molecular mechanisms through which the CD36 ligand exerts its hypocholesterolemic and anti-atherosclerotic activity *in vivo* has yet to be determined. In the present study, we assessed the effects of EP 80317 on macrophage-to-feces reverse cholesterol transport and on the expression of selected genes associated with hepatic cholesterol metabolism and intestinal cholesterol transport.

Methods and results: Macrophage reverse cholesterol transport was assessed following the intraperitoneal injection of [3 H]-cholesterol-labelled J774 macrophages in hypercholesterolemic apoE-deficient mice that have been treated for 12 weeks with EP 80317. Forty-eight hours after the administration of [3 H]-cholesterol-labelled cells, blood, tissues and feces were harvested. The radioactivity recovered in the feces (cholesterol and bile acid combined) from EP 80317-treated mice was significantly increase by 205% ($P = 0.0374$) compared with that found in vehicle-treated mice despite no significant change in plasma [3 H]-tracer. In agreement, the expression of intestinal genes involved in cholesterol transport in the gut, including LXR α , ABCG5 and ABCG8, were significantly upregulated whereas that of the NPC1L1 transporter, regulating intestinal cholesterol absorption, was downregulated by EP 80317 compared with vehicle-treated mice. In contrast, no significant

change in the mRNA expression of genes involved in hepatic metabolism was observed in EP 80317-treated mice.

Conclusion: This study shows that EP 80317-mediated macrophage-to-feces reverse cholesterol transport increases fecal excretion of sterol by reducing intestinal cholesterol absorption. These effects are not dependent upon an increase in hepatic biliary cholesterol secretion but rather an upregulation of transintestinal cholesterol efflux.

Contribution

Kim Bujold:

- Conceptualisation du projet
- Exécution de toute la partie expérimentale
- Analyse des résultats
- Écriture de l'article

David Rhainds:

- Conceptualisation du projet
- Discussion et commentaires sur l'article

Louise Brissette:

- Contribution pour les études de clairances
- Commentaires sur l'article

Sylvie Marleau et Huy Ong:

- Supervision du travail
- Participation à l'écriture de l'article

Introduction

The macrophage CD36 receptor has been shown to play a prominent role in scavenging oxidatively modified low density lipoprotein (oxLDL) and generating foam cells¹. OxLDL catabolism within macrophages has been associated to the generation of bioactive lipids which activate peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) leading to the upregulation of a number of genes involved in lipid metabolism, including CD36². Along that line, our previous studies showed that EP 80317, a synthetic peptide ligand of CD36, can activate PPAR γ by increasing 15d-PGJ₂ production through an ERK1/2-dependent COX-2 upregulation in macrophages, thereby promoting cholesterol and phospholipid efflux³.

In this scheme of events, PPAR γ signaling in macrophages may lead to ATP-binding cassette (ABC) transporters upregulation and cholesterol efflux to high density lipoprotein (HDL) or apolipoprotein A-I (apoA-I), the first step in classical reverse cholesterol transport (RCT) to the liver, with subsequent hepatobiliary cholesterol secretion and excretion into feces^{4,5,6}. Alternatively, cholesterol may be cleared from the periphery by transintestinal cholesterol efflux, implying direct cholesterol secretion to the guts^{6,7,8}.

The present study aimed to investigate the effect of EP 80317 on RCT in an atherosclerotic mice model. To this purpose, apoE-deficient (apoE^{-/-}) and apoE/CD36 double-deficient (apoE^{-/-}/CD36^{-/-}) mice, fed with a high fat high cholesterol (HFHC) diet from 6 weeks of age, were pretreated with EP 80317 by daily s.c. injections for 12 weeks. The present study shows that a chronic treatment with EP 80317 promotes macrophages-to-feces RCT, an

effect associated with the upregulation of genes involved in intestinal cholesterol transport and a downregulation of those associated with intestinal cholesterol absorption.

Materials and methods

Materials

[1 α , 2 α (n)-³H]-cholesterol (35–50 Ci/mmol) was purchased from Amersham Biosciences. EP 80317 (Haic-D-2MeTrp-D-Lys-Trp-D-Phe-LysNH₂) was provided by Ardana Bioscience (Edinburgh, UK). All solutions for *in vivo* injections were sterile.

Animals

All experimental procedures were approved by the Institutional Animal Ethics Committee of Université de Montréal, in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines for use of experimental animals and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (A5213-01). ApoE^{-/-} and apoE^{-/-}/CD36^{-/-} mice and their littermate controls were backcrossed six times to C57BL/6 mice⁹. Six-week-old male mice were fed with HFHC (D12108, cholate-free AIN-76A semi-purified diet, Research Diets Inc) containing 40% wt/wt fat and 1.25% wt/wt cholesterol and water ad libitum. Mice were treated with EP 80317 (300 μ g/kg) or vehicle (0.9% NaCl) administered by daily s.c. injections for 12 weeks.

Plasma lipid analysis

Total plasma cholesterol and HDL cholesterol were assayed using the Infinity™ cholesterol reagent from Thermo Fisher Scientific according to the manufacturer's instructions. QUANTOLIP® HDL (HDL₂/HDL₃) precipitation reagent from Technoclone was used to precipitate non-HDL cholesterol from plasma.

Cell culture

J774 murine macrophages were obtained from the American Type Culture Collection. J774 macrophages were cultured in Dulbecco's minimal essential media (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 UI/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. J774 cells were radiolabelled by incubating the cells with 5µCi/mL of [1α , 2α (n)- 3 H]-cholesterol (Amersham Biosciences) for 48 hours at 37°C. The cells were washed three times, equilibrated in DMEM containing 0.2% BSA overnight and resuspended in PBS.

In vivo reverse cholesterol transport

ApoE^{-/-} mice, housed individually, were injected i.p. with [3 H]-cholesterol-labelled J774 cells (with a mean of 8×10^5 cpm/ 10^6 cells in 0.5 ml PBS). Blood samples (50 µl) were collected from the saphenous vein at 2, 6, 24 and 48 hours and plasma radioactivity was quantitated by liquid scintillation counting (LSC) using PerkinElmer beta counter. After 48 hours, mice were euthanized by CO₂ asphyxiation and exsanguinated, perfused with ice-

cold PBS and the liver and small intestine were removed. Aliquots (200 mg) of liver and small intestine were dissolved in 2 ml of SolvableTM reagent (PerkinElmer) and incubated at 50°C overnight, followed by treatment with 0.2 ml of 30% hydrogen peroxide. Feces were collected at 24 and 48 hours and weighted. Radioactivity content in plasma, liver, intestine and feces was measured by LSC using Hionic Fluor scintillation fluid (PerkinElmer). [³H] tracer levels in plasma, liver and feces were expressed as [³H]-tracer percentage of injection.

Real-time PCR analysis of hepatic and intestinal mRNA levels

In additional experiments, total mRNA from ~100 mg aliquots of liver and small intestine collected in Trizol (Invitrogen Life Technologies) were extracted and reverse transcribed to cDNA using oligo dT 12-18 random primers and SuperScriptTM II reverse transcriptase from Invitrogen according to the manufacturer's instructions. Real-time PCR was performed on a Rotor-Gene 3000 instrument (Montreal Biotech) using Platinum® SYBR® green qPCR supermix (Invitrogen Life Technologies) and gene-specific oligonucleotides (Supplemental materials Table I). mRNA levels were normalized to GAPDH and the relative gene expression was calculated using the comparative $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Comparisons between two groups were performed using a two-tailed unpaired Student's t-test. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Effect of EP 80317 pretreatment on RCT and lipoprotein plasma profile after an i.p. injection of [³H]-loaded macrophages

Plasma-time curves of [³H]-tracer plateaued by ~ 6 hours after the injection of radiolabelled macrophages. EP 80317 pretreatment did not significantly alter [³H]-cholesterol plasma levels nor the calculated AUC (0-48 hours) (Figure 1A). Yet, the [³H]-cholesterol content in liver of EP80317-treated mice was reduced by 42% ($P = 0.0137$) (Figure 1B), whereas that in feces was increased by 205% ($P = 0.0374$) (Figure 1C). Total and non HDL plasma cholesterol were reduced by 20 and 23% ($P = 0.0300$), respectively, in EP 80317-treated mice whereas HDL plasma cholesterol levels were not changed by treatment (Table I).

Effect of EP 80317 on hepatic and intestinal gene expression

Compared to vehicle-treated mice, jejunal LXR α mRNA levels were increased by 2.3-fold ($P = 0.0292$) in EP 80317-treated mice, along with those of ABCA1, ABCG1, ABCG5 and ABCG8, by 7.5- ($P = 0.0080$), 6.8- ($P = 0.0255$), 4.4- ($P = 0.0555$) and 6.2-fold ($P = 0.0401$) respectively (Figure 2A). In contrast, intestinal sterol influx transporter Niemann-

Pick C1 Like 1 (NPC1L1) mRNA levels were decreased by 70% ($P = 0.0019$) whereas CD36 mRNA levels were unaffected (Figure 2A). In the liver, neither LXR α and ABC transporters, nor the rate-limiting bile acid synthesis enzyme cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7a) mRNA levels, were modulated after chronic EP 80317-treatment (Figure 2B). In addition, the fractional catabolic rate of radioiodinated lipoproteins, LDL and very low density lipoprotein (VLDL), were unchanged in treated mice (Supplementary Figure 1).

Effect of EP 80317 pretreatment in apoE/CD36 double-deficient mice

To document whether EP 80317-elicited elevation expression of genes involved in cholesterol transport in intestine is dependent on CD36 expression, jejunal mRNA levels of LXR α and selected target genes were determined in apoE^{-/-}/CD36^{-/-} mice. EP 80317 did not significantly modulate LXR α , ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8 and NPC1L1 mRNA levels in the jejunum of CD36 deficient mice (Figure 3).

Discussion

The principal finding of the present study is that the anti-atherosclerotic GHRP derivative, EP 80317, promotes macrophages-to-feces reverse cholesterol transport in apoE^{-/-} mice in a CD36-dependent manner. Enhanced cholesterol excretion into feces was associated with intestinal ABC efflux transporters upregulation and downregulation of NPC1L1, both of

which may concur to RCT. Indeed, although the hepatobiliary route has been proposed as the main route for the disposal of cholesterol^{4, 5, 6} several recent studies provided evidence for alternative routes for the removal of excess cholesterol^{7, 8, 10, 11}. For instance, *Mdr2*^{-/-} and *ABCG5*^{-/-}/*ABCG8*^{-/-} transgenic mice have been reported to present diminished ability to secrete bile into the intestine, yet the mice have similar fecal cholesterol output when compared with their control littermates^{12, 13}. These observations suggested that macrophage RCT may occur in the absence of biliary cholesterol secretion through a pathway now referred to as transintestinal cholesterol efflux (TICE)^{6, 14}.

In our previous studies, we have shown that incubation of macrophages with synthetic selective ligands of CD36 enhanced cholesterol efflux, through an ERK1/2-dependent COX-2 stimulation of 15d-PGJ₂, an endogenous activator of PPAR γ ³. The activation of PPAR γ -LXR α -ABC transporters pathway, the first step in RCT, was found to be uncoupled from the regulatory positive feedback on CD36 expression in EP 80317-treated macrophages and presumably, foam cell formation. To study the effect of EP 80317 on RCT *in vivo*, we have traced the fate of tritiated cholesterol following the i.p. injection of radiolabelled macrophages, according to Zhang et al.¹⁵. In agreement with a preponderant role for intestine in enhancing RCT, intestinal LXR α and downstream target genes were upregulated, including the ABC transporters ABCA1, ABCG5 and ABCG8^{8, 16, 17}. It has been shown that ABCG5 and ABCG8 function as obligate heterodimers to promote sterol excretion into bile¹⁸. Overexpression of ABCG5/G8 in transgenic mice results in increased hepatobiliary excretion of cholesterol and increased fecal neutral sterol excretion¹⁸⁻²¹,

while inactivation of both genes has the opposite effect²². In contrast, jejunal NPC1L1 mRNA levels were downregulated. Although controversial findings regarding the role of NPC1L1 in regulating RCT has been reported²³, our observations are in agreement with others, who have shown that NPC1L1 inhibition or genetic inactivation result in a substantial reduction in intestinal cholesterol absorption and increased fecal cholesterol excretion^{24,25}, thus preventing the development of atherosclerosis in apoE^{-/-} mice^{26,27}.

Among drugs that may modulate RCT, LXR agonists have been shown to increase RCT and fecal cholesterol excretion by upregulating hepatic ABCG5 and ABCG8²⁸⁻³⁰. GW610742, a PPAR δ agonist, was shown to increase intestinal cholesterol excretion by decreasing NPC1L1 expression rather than an upregulation of intestinal ABCG5 and ABCG8 expression^{23, 25, 31}. Yet, a drawback associated with LXR agonists was the development of liver steatosis³²⁻³⁴, whereas a chronic administration of EP 80317 was not associated with fatty liver³⁵, which is in line with the low [³H]-cholesterol content in liver of EP 80317-treated mice. Furthermore, in contrast with LXR agonists, no change in hepatic mRNA levels of ABC transporters, CYP7a1 or LXR α were found in the livers of EP 80317-treated mice, and neither LDL nor VLDL plasma clearance were modulated following a chronic treatment with EP 80317 (Supplementary figure 1), suggesting that the CD36 ligand does not stimulate hepatic cholesterol metabolism. Thus, EP 80317-mediated decrease in hepatic [³H]-cholesterol might be explained by a reduced cholesterol hepatic uptake as a consequence of increased TICE, rather than through a change in lipoprotein fractional catabolic rate or hepatic cholesterol transporters such as SR-BI or LDLR. In

keeping with an important role of TICE in EP 80317-mediated RCT, no significant changes in plasma HDL levels were observed in apoE-deficient mice treated with a CD36 selective ligand³⁵.

To further investigate the molecular mechanisms through which EP 80317 increased TICE, we investigated its effect on intracellular vesicular cholesterol transport proteins Rab8 and Rab9. Whereas Rab8 contributes to endosomal cholesterol removal³⁶, Rab9 plays a role in cholesterol trafficking from late endosomes to the trans-Golgi network^{37, 38}. Our results show that EP 80317 pretreatment did not alter intestinal Rab8 and Rab9 gene expression (data not shown).

In conclusion, our results support that CD36 selective ligands promote macrophages-to-feces RCT through CD36 receptor-mediated by stimulating the alternative RCT pathway, rather than through the classical hepatobiliary route. Reduction of atherosclerotic lesion development by a chronic administration of EP 80317 may be due, in part, to enhanced TICE.

Funding

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP 62837) and by Ardana Bioscience (Edinburgh, Scotland, UK). K. B. was a recipient of a doctoral fellowship from Robert Dugal-Rx&D Foundation and D. R. was a recipient of a postdoctoral scholarship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

Acknowledgments

The authors wish to gratefully acknowledge the skillful technical assistance of Louise Falstrault, Petra Pohankova and Vilayphone Luangrath.

References

- (1) 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 April;105(8):1049-56.
- (2) Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 1998 April 17;93(2):229-40.
- (3) 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 August 1;83(3):457-64.
- (4) Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res* 1968 March;9(2):155-67.
- (5) Cuchel M, Rader DJ. Macrophage reverse cholesterol transport: key to the regression of atherosclerosis? *Circulation* 2006 May 30;113(21):2548-55.
- (6) van der Velde AE, Brufau G, Groen AK. Transintestinal cholesterol efflux. *Curr Opin Lipidol* 2010 June;21(3):167-71.
- (7) van der Velde AE, Vrans CL, van den Oever K, Kunne C, Oude Elferink RP, Kuipers F, Groen AK. Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* 2007 September;133(3):967-75.
- (8) van der Veen JN, van Dijk TH, Vrans CL, van MH, Havinga R, Bijsterveld K, Tietge UJ, Groen AK, Kuipers F. Activation of the liver X receptor stimulates trans-

- intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem* 2009 July 17;284(29):19211-9.
- (9) 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 July 1;83(1):42-51.
- (10) Kruit JK, Plosch T, Havinga R, Boverhof R, Groot PH, Groen AK, Kuipers F. Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology* 2005 January;128(1):147-56.
- (11) Brown JM, Bell TA, III, Alger HM, Sawyer JK, Smith TL, Kelley K, Shah R, Wilson MD, Davis MA, Lee RG, Graham MJ, Crooke RM, Rudel LL. Targeted depletion of hepatic ACAT2-driven cholesterol esterification reveals a non-biliary route for fecal neutral sterol loss. *J Biol Chem* 2008 April 18;283(16):10522-34.
- (12) Temel RE, Brown JM. A new framework for reverse cholesterol transport: non-biliary contributions to reverse cholesterol transport. *World J Gastroenterol* 2010 December 21;16(47):5946-52.
- (13) Temel RE, Sawyer JK, Yu L, Lord C, Degirolamo C, McDaniel A, Marshall S, Wang N, Shah R, Rudel LL, Brown JM. Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell Metab* 2010 July 4;12(1):96-102.
- (14) Vrans CL. From blood to gut: direct secretion of cholesterol via transintestinal cholesterol efflux. *World J Gastroenterol* 2010 December 21;16(47):5953-7.
- (15) Zhang W, Yancey PG, Su YR, Babaev VR, Zhang Y, Fazio S, Linton MF. Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2003 November 4;108(18):2258-63.

- (16) Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H, Mangelsdorf DJ. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2002 May 24;277(21):18793-800.
- (17) Lo SG, Murzilli S, Salvatore L, D'Errico I, Petruzzelli M, Conca P, Jiang ZY, Calabresi L, Parini P, Moschetta A. Intestinal specific LXR activation stimulates reverse cholesterol transport and protects from atherosclerosis. *Cell Metab* 2010 August 4;12(2):187-93.
- (18) Graf GA, Yu L, Li WP, Gerard R, Tuma PL, Cohen JC, Hobbs HH. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. *J Biol Chem* 2003 November 28;278(48):48275-82.
- (19) Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 2002 September;110(5):671-80.
- (20) Yu L, York J, von BK, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem* 2003 May 2;278(18):15565-70.
- (21) Yu L, Gupta S, Xu F, Liverman AD, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, Repa JJ, Hobbs HH, Cohen JC. Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion. *J Biol Chem* 2005 March 11;280(10):8742-7.
- (22) Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, von BK, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 December 10;99(25):16237-42.

- (23) Vrans CL, van der Velde AE, van den Oever K, Levels JH, Huet S, Oude Elferink RP, Kuipers F, Groen AK. Peroxisome proliferator-activated receptor delta activation leads to increased transintestinal cholesterol efflux. *J Lipid Res* 2009 October;50(10):2046-54.
- (24) Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004 February 20;303(5661):1201-4.
- (25) Briand F, Naik SU, Fuki I, Millar JS, Macphee C, Walker M, Billheimer J, Rothblat G, Rader DJ. Both the peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist, GW0742, and ezetimibe promote reverse cholesterol transport in mice by reducing intestinal reabsorption of HDL-derived cholesterol. *Clin Transl Sci* 2009 April;2(2):127-33.
- (26) Davis HR, Jr., Compton DS, Hoos L, Tetzloff G. Ezetimibe, a potent cholesterol absorption inhibitor, inhibits the development of atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 December;21(12):2032-8.
- (27) Davis HR, Jr., Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Zhu LJ, Graziano MP, Altmann SW. Deficiency of Niemann-Pick C1 Like 1 prevents atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 April;27(4):841-9.
- (28) Calpe-Berdiel L, Rotllan N, Fievet C, Roig R, Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC. Liver X receptor-mediated activation of reverse cholesterol transport from macrophages to feces in vivo requires ABCG5/G8. *J Lipid Res* 2008 September;49(9):1904-11.
- (29) Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation* 2006 January 3;113(1):90-7.

- (30) Zanotti I, Poti F, Pedrelli M, Favari E, Molero E, Franceschini G, Calabresi L, Bernini F. The LXR agonist T0901317 promotes the reverse cholesterol transport from macrophages by increasing plasma efflux potential. *J Lipid Res* 2008 May;49(5):954-60.
- (31) van der Veen JN, Kruit JK, Havinga R, Baller JF, Chimini G, Lestavel S, Staels B, Groot PH, Groen AK, Kuipers F. Reduced cholesterol absorption upon PPARdelta activation coincides with decreased intestinal expression of NPC1L1. *J Lipid Res* 2005 March;46(3):526-34.
- (32) Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev* 2000 November 15;14(22):2819-30.
- (33) Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev* 2000 November 15;14(22):2831-8.
- (34) Grefhorst A, Elzinga BM, Voshol PJ, Plosch T, Kok T, Bloks VW, van der Sluijs FH, Havekes LM, Romijn JA, Verkade HJ, Kuipers F. Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2002 September 13;277(37):34182-90.
- (35) 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 November;19(13):1869-71.

- (36) Linder MD, Uronen RL, Holtta-Vuori M, van der Sluijs P, Peranen J, Ikonen E. Rab8-dependent recycling promotes endosomal cholesterol removal in normal and sphingolipidosis cells. *Mol Biol Cell* 2007 January;18(1):47-56.
- (37) Narita K, Choudhury A, Dobrenis K, Sharma DK, Holicky EL, Marks DL, Walkley SU, Pagano RE. Protein transduction of Rab9 in Niemann-Pick C cells reduces cholesterol storage. *FASEB J* 2005 September;19(11):1558-60.
- (38) Choudhury A, Dominguez M, Puri V, Sharma DK, Narita K, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells. *J Clin Invest* 2002 June;109(12):1541-50.
- (39) Luangrath V, Brodeur MR, Rhains D, Brissette L. Mouse CD36 has opposite effects on LDL and oxidized LDL metabolism in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 July;28(7):1290-5.
- (40) Matthews CM. The theory of tracer experiments with ¹³¹I-labelled plasma proteins. *Phys Med Biol* 1957 July;2(1):36-53.

Figure legends

Figure 1. Fate of [³H]-cholesterol following the injection of [³H]-cholesterol-loaded J774 macrophages *in vivo*. ApoE^{-/-} mice, pretreated or not with EP 80317 (300 µg/kg/day) for 12 weeks, were injected i.p. with [³H]-cholesterol-loaded J774 macrophages. Plasma-time curves of [³H]-tracer (0-48 hours), expressed as [³H]-tracer % of injection/ml plasma, following the injection of radiolabelled-macrophages (A). Area under the curve (AUC) is expressed as (pmol/ml)·h and was calculated with. Radioactivity content of liver at 48 hours (B) and of feces (0-48 hours) (C). Values are expressed as [³H]-tracer % of injection/100 mg ± SEM (n = 11 and 13 mice in 0.9% NaCl and EP 80317 group, respectively). **P* < 0.05 compared with the vehicle (0.9% NaCl)-treated group.

Figure 2. Hepatic and intestinal mRNA levels of genes involved in the metabolism and transport of cholesterol as determined by real-time RT-PCR. Tissues were obtained from apoE^{-/-} mice treated or not with EP 80317 (300 µg/kg/day) for 12 weeks. Total RNA was extracted from jejunum (A) and liver (B) and mRNA levels of indicated genes were determined. Data are presented as fold change (± SEM) versus vehicle (n = 11 and 14 livers and n = 13 and 17 intestines were analyzed for 0.9% NaCl and EP 80317 mice, respectively). **P* < 0.05 and ***P* < 0.01 compared with vehicle (0.9% NaCl)-treated mice.

Figure 3. EP 80317-mediated effects are CD36-dependent. Small intestines were obtained from apoE^{-/-}/CD36^{-/-} mice treated with or without EP 80317. Total RNA was

extracted from small intestines, and mRNA levels of indicated genes were determined by real-time RT-PCR. Data are presented as fold change (\pm SEM) versus vehicle. Six and seven tissues were analyzed for the vehicle and EP 80317 groups, respectively.

Table I. Plasma lipid profile in apoE^{-/-} fed with a HFHC diet treated with or without EP 80317 (300 µg/kg/day) for 12 weeks.

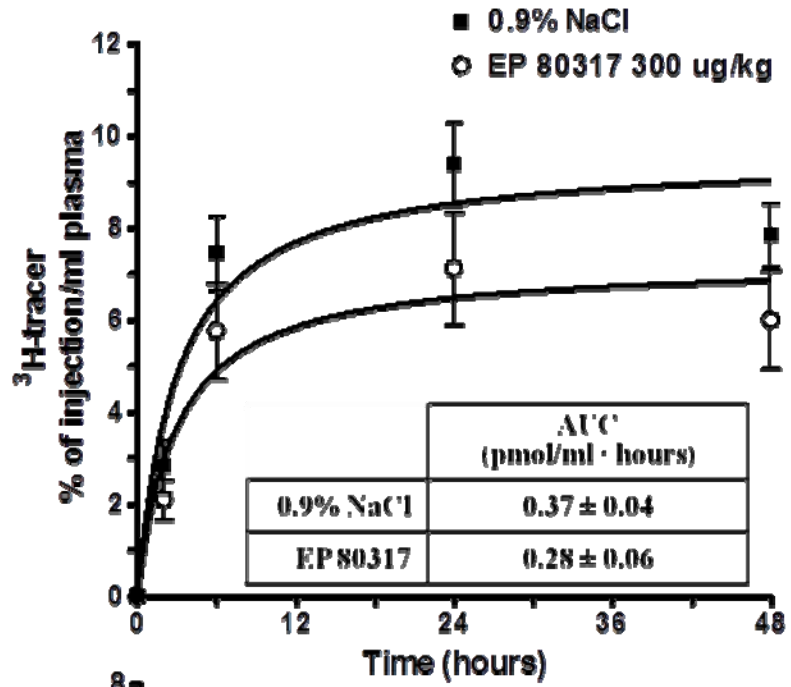
	apoE ^{-/-} mice (mmol/L)	
	0.9% NaCl	EP 80317
Total cholesterol	30 ± 2	24 ± 1 ^a
Non-HDL cholesterol	29 ± 2	23 ± 1 ^a
HDL cholesterol	1 ± 0.03	1 ± 0.01

^a*P* < 0.05 compared to 0.9% NaCl-treated mice

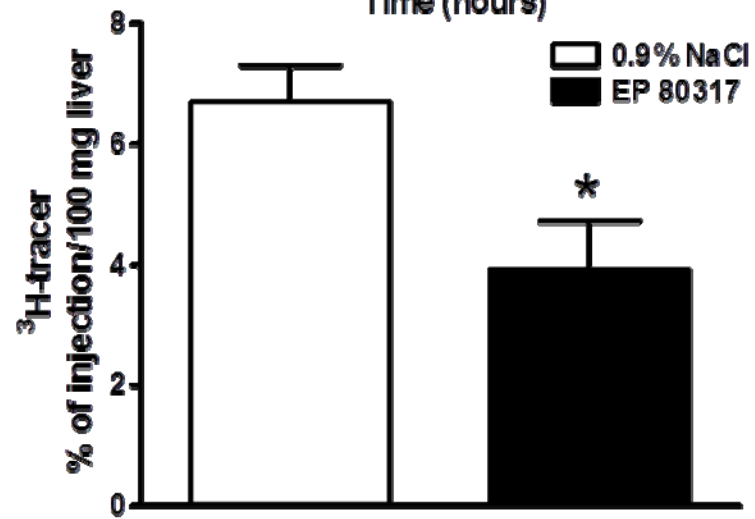
Results are means ± SEM of 16 and 17 mice in vehicle and EP 80317 group. **P* < 0.05 compared with vehicle (0.9% NaCl).

Figure 1

A.



B.



C.

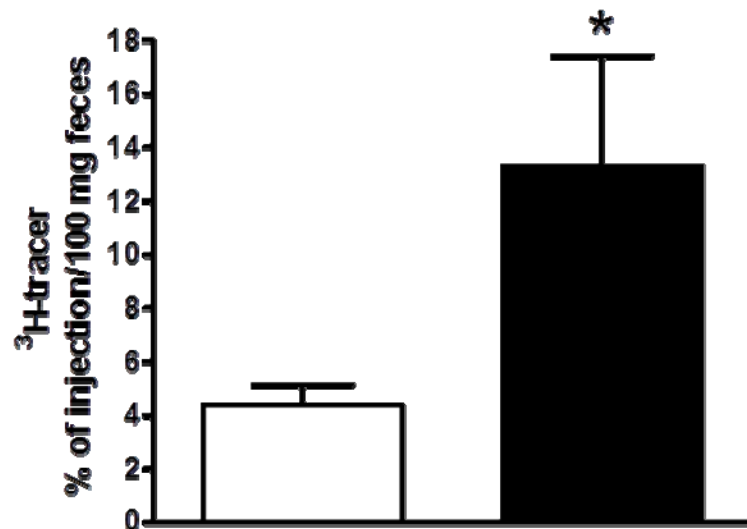


Figure 2

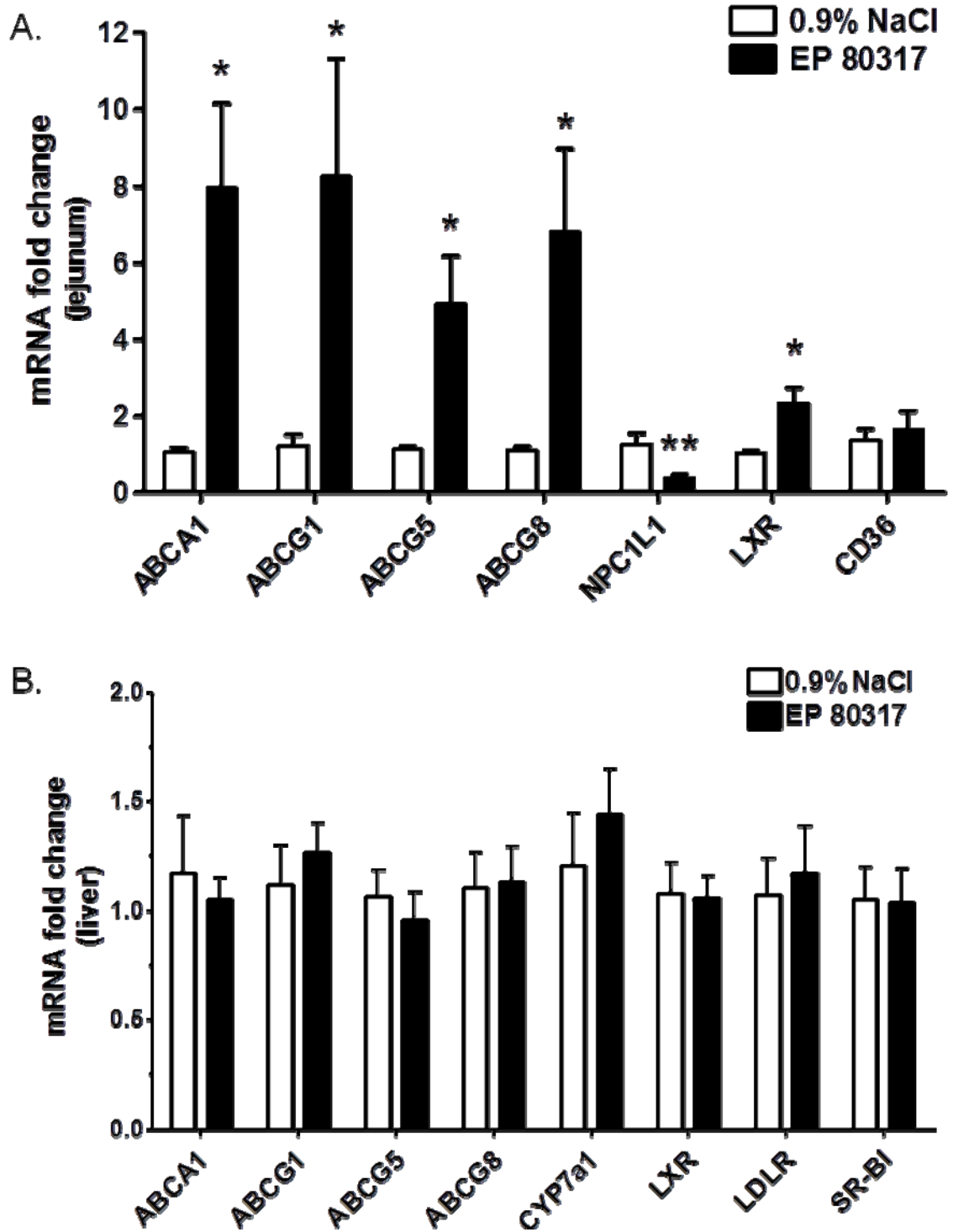
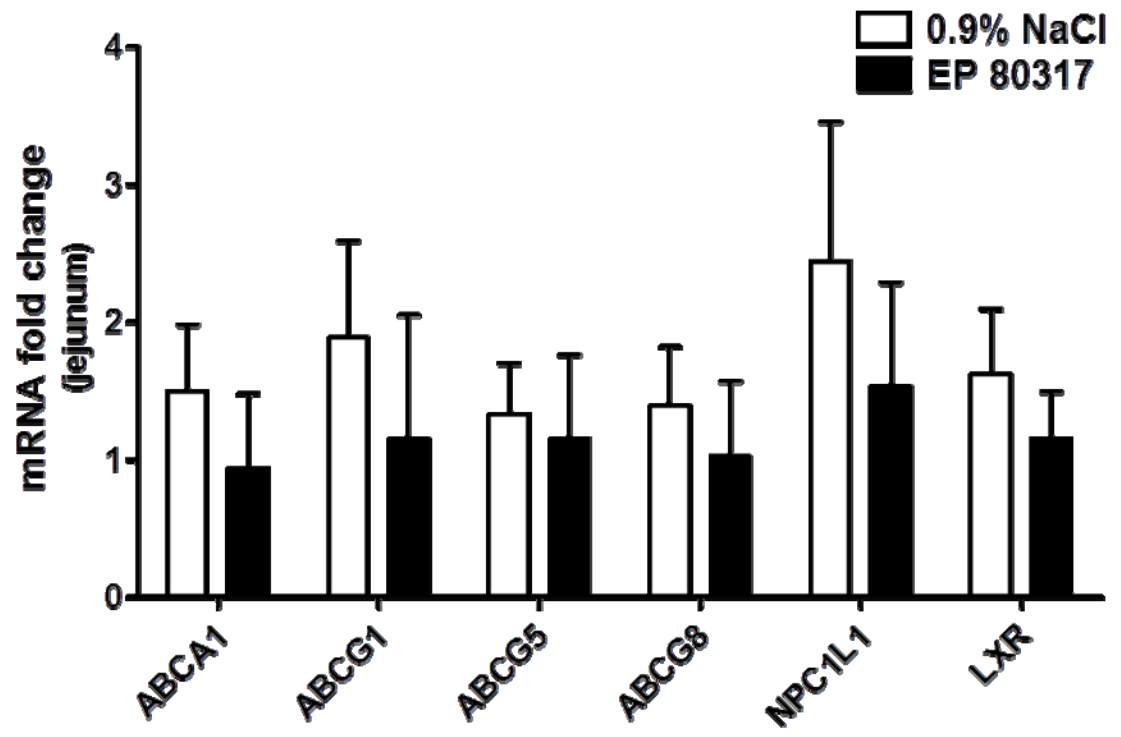


Figure 3



Supplementary data

Materials and methods

Lipoprotein isolation and labelling

Human LDL (density = 1.025 to 1.063 g/mL) and VLDL ($d < 1.006$ g/ml) were isolated from human plasma obtained from the Royal Victoria Hospital (Montréal, Québec, Canada). Before isolation, plasma containing to 0.01% EDTA, 0.02% sodium azide, 10 μ M PMSF, and 10 μ M Trolox and lipoproteins were isolated by ultracentrifugation as described by Hatch and Lees (Hatch and Lees, 1968). LDL and VLDL were labeled with sodium 125 iodine in the presence of iodine monochloride and free iodine was removed by gel filtration on Sephadex G-25 followed by dialysis in TBS. Specific activity ranged from 130,000 to 210,000 cpm/ μ g protein.

LDL and VLDL kinetics *in vivo*

Mice were injected by the tail vein with a bolus of human LDL containing 480 μ g of nonradiolabelled lipoproteins and 20 μ g of [125 I] radiolabelled LDL in 150 μ L of saline or with 20 μ g of [125 I] radiolabelled VLDL in 150 μ L of saline. At the indicated time, blood samples were withdrawn from the saphenous veins (50 μ L) in microvette tubes coated with heparin and centrifuged at 10 000 g for 5 minutes at 4°C. [125 I] was measured in the

trichloroacetic acid (TCA)-precipitable fraction of plasma to eliminate the contribution of protein degradation. Disappearance curves of either LDL or VLDL were generated as described previously³⁹ by dividing the plasma radioactivity at each point by the radioactivity determined at 2 minutes after tracer injection.

Plasma fractional catabolic rates (FCR) were calculated using a two-compartment model according to Matthews⁴⁰ using the following formula: $(C1/\beta1 + C2/\beta2)-1$, where $\beta1$ and $\beta2$ are slopes, and C1 and C2 are intercepts of the late and initial linear curve fits, respectively. Student's *t*-test was used to obtain statistical comparison of the data. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

Figure legends

Figure 1. Clearance of [¹²⁵I]-labelled LDL and [¹²⁵I]-labelled VLDL in apoE^{-/-} mice.

A) 480 μ g of nonradiolabelled human LDL and 20 μ g of radiolabelled [¹²⁵I] LDL was injected in apoE^{-/-} mice. Each point represents the mean value (\pm SEM) of 8-9 mice. B) 20 μ g of radiolabelled [¹²⁵I] VLDL was injected in apoE^{-/-} mice. Each point represents the mean \pm SEM from 6-7 mice.

Supplementary data

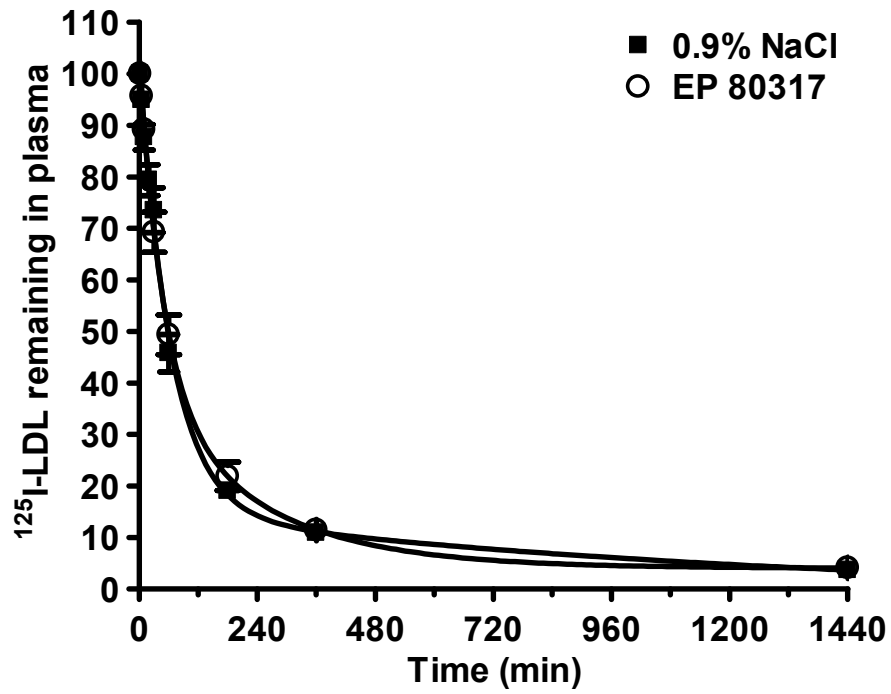
Table I. Primers used for real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
ABCA1	CTGACGGGAAGAGAGCATGT	TTTGTTGCCGCCACTGTAGT
ABCG1	CTCCTATGTCAGATACGGCT	TACAGCTTCGCATTCTCCAC
ABCG5	TCAGGACCCCAAGGTCATGAT	AGGCTGGTGGATGGTGACAAT
ABCG8	GACAGCTTCACAGCCCACAA	GCCTGAAGATGTCAGAGCGA
NPC1L1	GGAAATGCAATCCTTCCAGA	GCCAGGGAGATGTACAGGAA
LXR	CGGCAGTGAGAGCATCACC	GCTCATTCATGGCTCTGGAGA
CD36	GGCCTTACTTGGGATTGG	CCAGTGTATATGTAGGCTCATCCA
CYP7a1	TTTCAAATGATCAGGAGCCC	GCTGTCCGGATATTCAAGGA
SR-BI	GCTGGTGCCCATCATCTGCCA	TCTTGCAGCACCGTGCCCTTG
LDLR	CAAGGTGTGCGACTCCGCCC	GGTCCACCAACCGGAAGCCG
GAPDH	GGAAAGCTCTGGCGTGATG	CTGTTGCTGTAGCCGTATTC

Supplementary data

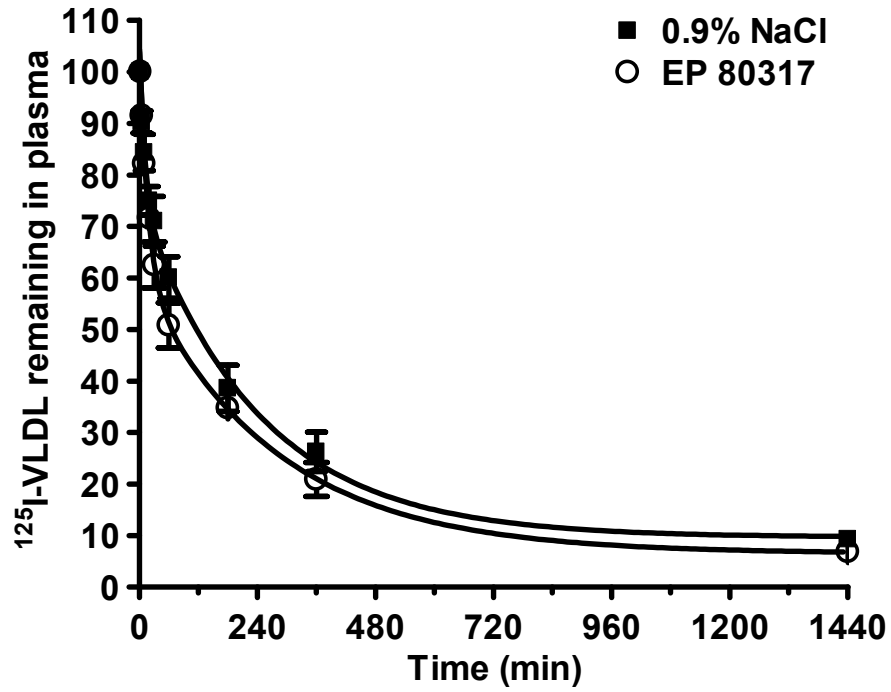
Figure 1.

A.



	FCR (pools/min)	$t_{1/2}$ alpha (min)	$t_{1/2}$ beta (min)
0.9% NaCl	0.000052 \pm 0.0000068	47 \pm 6	802 \pm 129
EP 80317	0.000061 \pm 0.0000089	41 \pm 9	523 \pm 123

B.



	FCR (pools/min)	$t_{1/2}$ alpha (min)	$t_{1/2}$ beta (min)
0.9% NaCl	0.000038 \pm 0.0000064	30 \pm 9	450 \pm 82
EP 80317	0.000042 \pm 0.0000051	18 \pm 4	367 \pm 53

**Chapitre 7, 8 et 9: Discussion générale,
perspectives et conclusion**

7 Discussion

L'incidence élevée de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires qui y sont rattachées impose un lourd fardeau économique sur les systèmes de santé. La pharmacothérapie actuellement utilisée pour le traitement de l'athérosclérose vise principalement à diminuer les taux de lipides et de cholestérol plasmatiques, à réduire l'hypertension ou bien à contrôler l'hémostase pour prévenir les complications thrombotiques (Weber & Noels, 2011). Les statines, des inhibiteurs de la HMG-CoA destinés à réduire la synthèse du cholestérol, sont encore aujourd'hui une thérapie de choix. En plus de réduire les taux plasmatiques de cholestérol, les statines exercent des effets anti-inflammatoires, améliorent la fonction endothéliale et limitent la progression des lésions athérosclérotiques (Ray & Cannon, 2005). Toutefois, bien que des études cliniques ont montré que les statines réduisent globalement de 20 à 40% le risque d'événements cardiovasculaires majeurs, le risque demeure élevé chez les patients qui présentent une dyslipidémie, notamment des taux élevés de triglycérides et de faibles taux d'HDL (Tonelli *et al.*, 2011; Fruchart *et al.*, 2008; Last *et al.*, 2011). Parmi les autres composés présentement utilisés pour le traitement de l'athérosclérose, on retrouve les fibrates qui sont des agonistes du récepteur PPAR α utilisés pour réduire les taux de triglycérides (Remick *et al.*, 2008; Abourbih *et al.*, 2009) et la niacine (vitamine B₃) qui est plutôt utilisée pour augmenter les taux de HDL plasmatiques ainsi que pour ces effets anti-inflammatoires (Lukasova *et al.*, 2011a; Lukasova *et al.*, 2011b; Villines *et al.*, 2011). Cependant, ni les fibrates ni la niacine n'ont montré une réduction de la mortalité dans la prévention

secondaire des maladies cardiovasculaires (Saha & Arora, 2011; Elam *et al.*, 2011; Last *et al.*, 2011), mais ces thérapies utilisées conjointement avec les statines pourraient favoriser un meilleur contrôle des taux de lipides plasmatiques.

De nouvelles approches thérapeutiques sont à l'étude dans le traitement des maladies cardiovasculaires. Entre autres, la démonstration d'une corrélation inverse entre les taux plasmatiques de HDL et les maladies cardiovasculaires dans des études épidémiologiques, a conduit à l'élaboration de différents composés capables d'augmenter les taux plasmatiques de HDL et ainsi que leurs fonctions. Les mimétiques du HDL, comprenant de l'apoA-I recombinante, visent à stimuler le transport inverse du cholestérol et sont présentement l'objet d'études cliniques de phase I et II (Nissen *et al.*, 2003; Navab *et al.*, 2010; Redondo *et al.*, 2011; Weber & Noels, 2011). Les inhibiteurs de la CETP, réduisant le transport du cholestérol des HDL vers les LDL, induisent une augmentation des taux de HDL (Hunt & Lu, 2009; Weber *et al.*, 2010). Cependant, l'augmentation des événements cardiovasculaires dus à une augmentation de la pression artérielle et des taux d'aldostérone plasmatiques, considérés comme des effets hors-cibles, a entraîné l'arrêt des études cliniques de phase III (Nissen *et al.*, 2007; Nicholls *et al.*, 2008). Toutefois, de nouveaux inhibiteurs de la CETP (dalcetrapib, anacetrapib et evacetrapib) sont en cours de développement et les résultats des différentes études cliniques semblent prometteurs et ne semblent pas engendrer d'effets hors-cible (Kappelle *et al.*, 2011; Barter & Rye, 2012).

Au niveau préclinique, différents groupes de chercheurs ont investigué le potentiel de cibler les macrophages pour le développement de nouveaux traitements anti-athérosclérotiques,

ces derniers jouant un rôle crucial dans l'initiation et la progression de la pathologie. Les études visent une réduction de leur recrutement, par exemple en bloquant les récepteurs de chimiokines; une atténuation de la génération de métabolites réactifs de l'oxygène par des anti-oxydants ou encore une réduction de la réponse inflammatoire par l'inhibition de la lipoprotéine phospholipase A2 (Lp-PLA2) (Weber & Noels, 2011; Saha *et al.*, 2009; Tiwari *et al.*, 2008).

Notre groupe de recherche s'est intéressé au récepteur CD36, qui joue un rôle-clé dans l'internalisation des lipoprotéines modifiées conduisant à la formation des cellules spumeuses, et dont la délétion prévient le développement des lésions athérosclérotiques (Kunjathoor *et al.*, 2002; Nakata *et al.*, 1999; Febbraio *et al.*, 2000). Ces observations suggèrent que le récepteur CD36 pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'athérosclérose. La découverte d'un site de liaison pour les sécrétines de l'hormone de croissance sur le récepteur CD36 (Bodart *et al.*, 2002), ainsi que la présence de ce récepteur sur différents types cellulaires impliqués dans l'athérosclérose, nous a conduit à émettre l'hypothèse de recherche selon laquelle un traitement par un GHRP aurait un effet anti-athérosclérotique. Ayant confirmé cette hypothèse (1^{er} article de cette thèse), nous avons étudié les mécanismes moléculaires impliqués dans la gestion lipidique au niveau des macrophages (objet des articles 2 et 3).

Des études ont montré que l'hexaréline et le EP 80317, deux peptides synthétiques de la famille des GHRPs, se lient au récepteur CD36 et que leur site de liaison chevauche celui des LDLox (Demers *et al.*, 2004). Cependant, l'hexaréline a une double affinité de liaison

pour les récepteurs CD36 et GHS-R1a, ce dernier ayant été identifié comme le récepteur de la ghréline. Afin d'étudier les effets anti-athérosclérotiques des GHRPs ainsi que leurs effets sur le métabolisme du cholestérol dans les macrophages, nous avons choisi d'utiliser un ligand sélectif du CD36, le EP 80317. Ce dernier possède une affinité similaire à celle de l'hexaréline pour le récepteur CD36 (Demers *et al.*, 2004), toutefois l'affinité du EP 80317 pour le GHS-R1a est 100 fois plus faible que l'affinité de l'hexaréline pour ce même récepteur (Bujold *et al.*, 2009).

7.1 Rôle des ligands sélectifs du récepteur CD36 dans le développement de l'athérosclérose

Pour étudier les effets des ligands sélectifs du CD36 sur le développement de l'athérosclérose, nous avons utilisé un modèle de souris avec une délétion du gène apoE. De prime abord, le modèle de souris ne paraît pas être le meilleur modèle pour étudier le développement des lésions athérosclérotiques puisqu'il est bien connu que les souris de type sauvage sont particulièrement résistantes au développement de l'athérosclérose, même lorsque soumises à une alimentation riche en cholestérol et en lipides, en raison de faibles taux plasmatiques de LDL-cholestérol (Fazio & Linton, 2001). Cependant, la génération de modèles murins génétiquement modifiés a permis l'utilisation de cette espèce pour l'étude de différentes pathologies métaboliques dont l'athérosclérose. De plus, la diète de type «Western», c'est-à-dire une diète normale à laquelle ont été ajoutés des acides gras et du

Un autre avantage du modèle murin a été de nous permettre d'étudier le rôle du récepteur CD36 et les effets pharmacologiques des ligands sélectifs du CD36 dans le traitement de l'athérosclérose en utilisant une lignée de souris déficiente en apoE et en CD36. Néanmoins, l'interprétation des résultats doit aussi tenir compte des différences d'espèce, le profil lipidique chez l'humain et chez la souris étant différent. En effet, les taux plasmatiques normaux de cholestérol total chez l'humain se situent environ à 5 mmol/L et au delà de 5 mmol/L chez les sujets hypercholestérolémiques, et le cholestérol est principalement contenu dans les LDL et les HDL. Chez la souris, la délétion du gène apoE engendre quant à elle une hypercholestérolémie de l'ordre de 10 mmol/L sur une diète normale, tandis que la diète utilisée dans nos études a entraîné des taux de l'ordre de 25 à

30 mmol/L, résultant d'une accumulation de résidus de chylomicrons et de VLDL. En dépit de cette divergence, la progression des lésions athérosclérotiques chez la souris apoE^{-/-} est semblable à celle observée chez les patients atteints d'une hyperlipoprotéinémie de type III, résultant d'une accumulation de β -VLDL ou d'IDL (Ghiselli *et al.*, 1981; Nakashima *et al.*, 1994; Reddick *et al.*, 1994; Scalia *et al.*, 2001; Zadelaar *et al.*, 2007; Pendse *et al.*, 2009). De nombreuses études ont montré que l'apoE présente des propriétés anti-athérosclérotiques qui sont indépendantes de leur rôle dans la clairance des lipoprotéines (Davignon, 2005; Raffai *et al.*, 2005). En effet, l'apoE est aussi un accepteur du cholestérol impliqué dans l'efflux du cholestérol par les macrophages, en plus d'exercer des effets anti-oxydants, anti-inflammatoires et anti-plaquettaires (Davignon, 2005; Raffai *et al.*, 2005; Grainger *et al.*, 2004; Zadelaar *et al.*, 2007), ce qui fait que le modèle de souris génétiquement déficient est aussi un modèle pro-inflammatoire qui favorise la formation des cellules spumeuses. Une alternative au modèle murin utilisé aurait été d'utiliser le modèle de souris déficientes en récepteurs des LDL qui présente une hypercholestérolémie modérée et un profil lipidique plus près de celui retrouvé chez l'humain (Tangirala *et al.*, 1995; Potteaux *et al.*, 2007), et pour lesquels le modèle double déficient en CD36 a aussi été généré (Kennedy *et al.*, 2009; Podrez *et al.*, Nat Med 2007). Cependant, les lésions athérosclérotiques se développent plus lentement que chez les souris déficientes en apoE nourries avec une diète normale, et l'utilisation à long terme d'une diète riche en cholestérol chez la souris LDLR^{-/-} entraîne le développement de xanthomes cutanés et tendineux (Potteaux *et al.*, 2007; Ishibashi *et al.*, 1994).

Notre étude visant à caractériser les effets anti-athérosclérotiques d'un traitement prolongé avec le EP 80317, débuté en même temps que la diète enrichie en lipides et en cholestérol, a montré une réduction de 51% de la formation des lésions chez les souris apoE^{-/-}, sans toutefois modifier le développement des lésions chez les souris apoE^{-/-}/CD36^{-/-} soumises au même protocole, suggérant que les effets du EP 80317 sont dépendants de l'expression du récepteur CD36 (article 1).

Nous avons montré que le EP 80317 non seulement prévient le développement des lésions athérosclérotiques, mais que ces effets sont aussi curatifs, c'est-à dire qu'il freine le développement des lésions même si la formation des lésions est déjà amorcée chez les souris nourries avec une diète riche en lipides et en cholestérol depuis déjà 4, 6 ou 8 semaines. Notre étude nous a aussi montré que le EP 80317 entraîne une diminution des taux plasmatiques totaux de cholestérol de 30%, sans toutefois affecter significativement les taux de HDL-cholestérol ou de triglycérides. Bien que l'effet hypocholestérolémiant puisse expliquer en partie la réduction des lésions chez les souris traitées pendant 12 semaines avec le EP 80317, les études subséquentes ont montré qu'un traitement de quelques semaines, initié tardivement après le début de la diète, ne réduisait pas de façon importante les taux plasmatiques de cholestérol en dépit d'un effet anti-athérosclérotique appréciable. Ces résultats nous ont suggéré que d'autres mécanismes étaient impliqués dans les effets anti-athérosclérotiques des ligands du CD36, et nous avons approfondi les mécanismes impliqués dans le métabolisme du cholestérol au niveau des macrophages.

Nos études ont montré que l'hexaréline et le EP 80317 entraînent une diminution de la formation des cellules spumeuses, première étape du développement des lésions athérosclérotiques (Avallone *et al.*, 2005) (article 1), par un mécanisme dépendant de la présence du récepteur CD36. Ces premières études ont aussi montré que les effets des ligands du CD36 étaient associés à des événements importants dans l'homéostasie du cholestérol dans les macrophages, en régulant l'internalisation du cholestérol ainsi que son efflux vers le tissu hépatique. Nos résultats ont montré une réduction de 21% de l'internalisation des LDLox dans les macrophages isolés provenant de souris apoE^{-/-} traitées pendant 12 semaines avec le EP 80317 (article 1). Les mécanismes intracellulaires impliqués dans l'internalisation des lipoprotéines modifiées par les récepteurs *scavengers* ont été clarifiés au cours des dernières années (Ricci *et al.*, 2004; Rahaman *et al.*, 2006). Il a été montré que l'activation de la kinase cytoplasmique JNK-2 chez les souris apoE^{-/-} hypercholestérolémiques entraîne la phosphorylation du récepteur SR-A et facilite l'internalisation des LDLox dans les macrophages (Ricci *et al.*, 2004). De ce fait, la délétion du gène JNK-2 chez les souris apoE^{-/-} est associée à une réduction de la formation des cellules spumeuses et des lésions athérosclérotiques secondairement à la réduction de la phosphorylation du récepteur SR-A, particulièrement de la sérine 49 (sérine 48 chez l'humain) (Ricci *et al.*, 2004; Fong & Le, 1999). De façon similaires, des études ont montré que l'internalisation des lipoprotéines modifiées par le récepteur CD36 active les voies de signalisation impliquant les kinases de la famille *src* et la phosphorylation subséquente de JNK-1 et 2 (Rahaman *et al.*, 2006). À l'appui d'un rôle signalétique important de JNK dans l'internalisation des LDLox par le CD36, l'inhibition pharmacologique de JNK avec

l'inhibiteur SP600125 a entraîné une diminution de leur internalisation (Rahaman *et al.*, 2006). Des études préliminaires dans notre laboratoire ont montré que les ligands du CD36 diminuent la phosphorylation de JNK induite par le POVPC ce qui pourrait expliquer, du moins en partie, la diminution de l'internalisation des LDLox avec le EP 80317 (Lambert-Lanteigne P., résultats non-publiés, 2011). Cependant, d'autres études sur la phosphorylation potentielle du récepteur CD36 et la cascade de signalisation engendrée suite à l'activation du CD36 par le EP 80317 seraient nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans la réduction de l'internalisation des LDLox par les macrophages.

Nous avons aussi montré qu'un traitement à long terme avec les ligands du CD36 induit une augmentation de l'expression des récepteurs nucléaires PPAR γ et LXR α dans les macrophages provenant des souris apoE^{-/-} nourries avec une diète riche en gras et en cholestérol (article 1). Ces récepteurs nucléaires sont impliqués dans la régulation de l'expression des transporteurs ABC, eux-mêmes impliqués dans l'efflux du cholestérol (Chinetti *et al.*, 2001; Chawla *et al.*, 2001b; Li & Glass, 2004). Ces observations nous ont suggéré que l'activation des récepteurs PPAR γ et LXR α pourrait jouer un rôle important dans la réduction de la formation des cellules spumeuses et des lésions athérosclérotiques (Li *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2001b). Ainsi, en plus de diminuer l'internalisation des lipoprotéines modifiées, le EP 80317 stimule la cascade impliquée dans l'efflux du cholestérol appuyant un effet des ligands sélectifs du CD36 dans la régulation du métabolisme du cholestérol au niveau des macrophages.

7.2 Régulation du métabolisme du cholestérol dans le macrophage par les ligands du CD36

Notre première étude nous a permis de montrer que le EP 80317 entraîne une augmentation de l'expression des récepteurs nucléaires et des transporteurs ABC impliqués dans l'efflux du cholestérol au niveau des macrophages (Article 1). Les travaux subséquents avaient pour but d'élucider les mécanismes moléculaires responsables des changements du métabolisme du cholestérol induits par le EP 80317 dans les macrophages, en lien avec l'efflux du cholestérol.

Pour étudier les effets des ligands du CD36 sur l'efflux du cholestérol, nous avons utilisé des macrophages péritonéaux isolés de souris apoE^{-/-} ainsi que des cellules d'une lignée immortalisée de macrophages d'origine murine, les cellules J774. Nous avons opté pour cette lignée cellulaire puisque des études ont montré que les macrophages J774 n'expriment pas (ou très peu) l'apoE (Werb & Chin, 1983; Mazzone & Reardon, 1994), tout comme les macrophages du modèle que nous avons utilisé dans nos études *in vivo*. Il a aussi été montré que le transporteur ABCA1 est exprimé plus fortement dans les macrophages J774 que dans les J774 transfectés avec l'apoE, ce qui suggère que l'apoE régule l'expression des transporteurs ABC (Huang *et al.*, 2001). Les macrophages J774 étaient donc le modèle de choix pour répondre à nos objectifs, en complément des études réalisées avec les macrophages péritonéaux de souris apoE^{-/-}, disponibles en quantité limitée. Un autre

argument en faveur de l'utilisation des macrophages J774 est le fait que l'autre lignée cellulaire macrophagique murine couramment utilisée, les macrophages RAW 264.7, n'expriment pas (ou très peu) le PPAR γ (Ricote *et al.*, 1998b), malgré une controverse à cet effet (Feng *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2002).

Pour nos études d'efflux, les macrophages ont d'abord été chargés de cholestérol tritié afin de quantifier l'efflux de cholestérol par les transporteurs ABC. Dans plusieurs études sur l'efflux des lipides, les macrophages ont été chargés de LDL acétylés (LDLac) dans le but de mimer les cellules spumeuses; cependant, les LDLac ne sont pas synthétisées de façon endogène et ne sont pas métabolisées de la même manière que les LDL (Wang *et al.*, 2007). De plus, tandis que le cholestérol dérivé des LDL est préférentiellement transporté vers les particules de HDL, le cholestérol dérivé des LDLac est plutôt transporté vers les apoA-I pauvres en lipides (Wang *et al.*, 2007). Nous avons donc choisi d'utiliser les macrophages péritonéaux de souris apoE^{-/-}, propices à former des cellules spumeuses, et les macrophages murins J774, qui présentent un rapport élevé d'esters de cholestérol/cholestérol libre, un peu comme les macrophages qui à l'état spumeux, sont gorgées de gouttelettes lipidiques riches en esters de cholestérol (Kiss *et al.*, 2005).

Chez ces deux modèles cellulaires, nous avons montré que les ligands du CD36 entraînent une augmentation de l'efflux du cholestérol vers l'apoA-I et les particules de HDL en régulant à la hausse l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1. L'utilisation des macrophages provenant de souris déficientes en ABCA1, ABCG1 et SR-BI a permis au groupe de Rothblat à Philadelphie de montrer que les transporteurs ABCA1 et ABCG1 sont

responsables d'environ 35 et 21% de l'efflux du cholestérol cellulaire *in vitro* respectivement, tandis que le récepteur SR-BI ne contribuerait qu'à 9% de l'efflux total (Adorni *et al.*, 2007). En plus des différents modèles cellulaires, l'utilisation de différents inhibiteurs pharmacologiques nous a permis de mettre en évidence le rôle crucial des transporteurs ABC, par comparaison aux transporteurs SR-BI qui ne semblent pas jouer un rôle significatif dans l'efflux induit par le EP 80317 dans les macrophages (Article 2). Nos résultats ont montré que l'augmentation de l'efflux du cholestérol est complètement inhibée en présence de DIDS (*4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid*), un inhibiteur non-sélectif des transporteurs ABC (Chinetti *et al.*, 2001). Étant donné que les données de la littérature appuyait principalement l'effet inhibiteur du DIDS sur le transporteur ABCA1, mais non sur le transporteur ABCG1, nous avons utilisé des particules d'apoA-I lipidées, générées suite à l'incubation de particules d'apoA-I pauvres en lipides avec des cellules BHK-ABCA1, comme accepteur de cholestérol (Vaughan & Oram, 2006; Gelissen *et al.*, 2006; Lorenzi *et al.*, 2008). En effet, ces particules d'apoA-I lipidées se lient préférentiellement au récepteur ABCG1 et nos résultats ont montré que le EP 80317 entraîne une augmentation de l'efflux du cholestérol vers ces particules. Une alternative aurait été d'utiliser des inhibiteurs pharmacologiques comme le benzamil ou la thyroxine pour inhiber le transporteur ABCG1 (Cserepes *et al.*, 2004; Seres *et al.*, 2008). Nous avons cependant utilisé le BLT-1 (*Block Lipid Transport-1, 2-Hexyl-1-cyclopentanone thiosemicarbazone*), un inhibiteur du transporteur lipidique SR-BI (Nieland *et al.*, 2002), qui nous a permis de montrer que l'efflux du cholestérol stimulé par le EP 80317 n'est pas perturbé par l'inhibition du SR-BI. Nos résultats sont en accord avec les études qui ont

montré que l'expression des transporteurs ABC dans les macrophages est responsable de l'efflux des lipides et probablement du transport inverse du cholestérol, contrairement au transporteur SR-BI (Adorni *et al.*, 2007; Brundert *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007).

Les limites de nos études incluent le fait que les expériences ont été réalisées *in vitro* sur des macrophages murins. Or, les récepteurs nucléaires comme PPAR γ et LXR régulent le transport intracellulaire, l'estérification et l'efflux du cholestérol dans les macrophages de façon différente entre les rongeurs et les humains (Rigamonti *et al.*, 2008). Cependant, des études antérieures avec l'hexaréline, un analogue du EP 80317, ont montré une augmentation de l'efflux dans les cellules humaines THP-1 via l'activation de la voie PPAR γ (Avallone *et al.*, 2005). De plus, il aurait été intéressant d'utiliser des macrophages provenant de souris déficientes en ABCA1, ABCG1 et même SR-BI, cependant les lignées transgéniques ne nous étaient pas disponibles sur un fond génétique de souris apoE^{-/-} comme les autres cellules utilisées dans notre étude. Nous avons alors plutôt envisagé l'utilisation d'ARN interférents (ARNi) dirigés contre les gènes des transporteurs ABC. Cependant, de nombreux essais avec différents ARNi n'ont pas résulté en une diminution significative de l'expression du transporteur ABCG1. Nous avons donc utilisé une stratégie incluant différents inhibiteurs pharmacologiques et les apoA-I lipidées.

L'objectif de cette étude était d'élucider l'effet des ligands du CD36 sur l'efflux du cholestérol dans les macrophages et la cascade de signalisation impliquée dans l'efflux induit par le EP 80317. Plusieurs études avaient documenté le rôle du transporteur ABCG1 dans l'efflux du cholestérol et la formation des cellules spumeuses. Cependant, à la lueur de

publications récentes, le rôle d'ABCG1 dans le développement de l'athérosclérose est controversé. D'une part, des études ont montré que l'absence d'ABCG1 dans les macrophages entraîne une légère augmentation des lésions athérosclérotiques dans un modèle de souris LDLR^{-/-}, par un effet directement lié à une diminution de l'efflux du cholestérol (Out *et al.*, 2006). D'autre part, des études ont plutôt montré que l'absence d'ABCG1 menait à une réduction du développement de l'athérosclérose (Baldan *et al.*, 2006a; Ranalletta *et al.*, 2006). Cette réduction des lésions a été attribuée soit à une augmentation de l'apoptose induite par les LDLox et les oxystérols dans les macrophages déficients en ABCG1 (Baldan *et al.*, 2006a; Terasaka *et al.*, 2007; Yvan-Charvet *et al.*, 2010), soit à une augmentation de la sécrétion de l'apoE (Ranalletta *et al.*, 2006). De plus, la surexpression d'ABCG1 ne modifie pas le développement de l'athérosclérose chez la souris apoE^{-/-} nourrie avec une diète riche en lipides (Burgess *et al.*, 2008). Néanmoins, le groupe d'Alan Tall de Columbia University à New York a montré que la double absence des transporteurs ABCA1 et ABCG1 entraîne une augmentation significative des lésions athérosclérotiques et qu'un mécanisme compensatoire des transporteurs pourrait expliquer que les effets sur les lésions sont modestes lorsque seulement un des deux transporteurs est absent (Yvan-Charvet *et al.*, 2007). L'ensemble de ces études suggère que nous ne pouvons éliminer la participation du transporteur ABCG1 à l'efflux du cholestérol, mais que l'ABCG1 ne participe pas, ou très peu, à la lipidation des HDL circulantes (Out *et al.*, 2006; Kennedy *et al.*, 2005; Ranalletta *et al.*, 2006; Yvan-Charvet *et al.*, 2007). Ainsi, le rôle d'ABCG1 dans le développement de l'athérosclérose demeure controversé (Kennedy *et al.*, 2005; Burgess *et al.*, 2008; Out *et al.*, 2006; Baldan *et al.*, 2006a; Ranalletta *et al.*,

2006). De plus, des études récentes ont montré que le transporteur ABCG1 jouerait un rôle spécifique dans l'homéostasie du cholestérol dans des cellules particulières comme les macrophages pulmonaires, les adipocytes ou les cellules β pancréatiques. En effet, l'absence d'ABCG1 a entraîné une accumulation massive de lipides dans les macrophages alvéolaires et une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, ce qui suggère que ABCG1 joue un rôle-clé dans le maintien de l'homéostasie au niveau pulmonaire (Out *et al.*, 2006; Baldan *et al.*, 2006b; Baldan *et al.*, 2008; Wojcik *et al.*, 2008). ABCG1 semble aussi jouer un rôle dans le métabolisme des lipides au niveau des cellules adipeuses en régulant la lipolyse et le stockage des triglycérides. En accord avec ces observations, plusieurs groupes ont observé une augmentation de l'expression d'ABCG1 chez les souris obèses tandis que l'ablation du transporteur ABCG1 dans les cellules adipeuses entraîne une diminution du poids, une augmentation de la température corporelle et une augmentation de la lipolyse associée à une augmentation de l'expression de la lipase hormono-sensible et de la triglycéride lipase adipocytaire (Buchmann *et al.*, 2007; Edgel *et al.*, 2012). De plus, ABCG1 semble jouer un rôle dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans les vésicules d'insuline contenues dans les cellules β pancréatiques. Des études ont montré que l'absence du transporteur ABCG1 entraînait un changement de morphologie des vésicules causé par une diminution de la concentration de cholestérol intra-vésiculaire menant à une diminution de la sécrétion de l'insuline (Sturek *et al.*, 2010; Kruit *et al.*, 2012). En lien avec ces études, des études récentes ont montré qu'ABCG1 est aussi un transporteur intracellulaire qui favorise le maintien de l'homéostasie des stérols en redistribuant le cholestérol vers le feuillet interne des vésicules

endosomales ou des vésicules d'insuline (Tarling & Edwards, 2011; Sturek *et al.*, 2010). La découverte de ces nouvelles fonctions d'ABCG1 nous suggère de relativiser l'importance d'une augmentation de l'expression d'ABCG1 et de l'efflux du cholestérol vers les HDL induite par les ligands du CD36 dans un contexte d'athérosclérose.

7.3 Cascade de signalisation menant à l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ : effet anti-inflammatoire potentiel des ligands du CD36

Notre deuxième étude nous a aussi permis d'élucider la cascade de signalisation engendrée par le EP 80317 en amont de l'activation du récepteur nucléaire PPAR γ . La cascade de signalisation induite lors de l'activation du récepteur CD36 par différents ligands est caractérisée par des voies communes. Dans la plupart des cas, il a été démontré que la liaison des ligands au récepteur CD36 active les kinases de la famille *src*, conduisant à l'activation des MAPK. Nos travaux ont montré que la liaison du EP 80317 au récepteur CD36 à la surface des macrophages induit la phosphorylation de la MAPK ERK1/2, entraînant l'activation de PPAR γ et de la cascade LXR-transporteurs ABC. En fonction des résultats rapportés dans la littérature, nous aurions pu croire que l'activation du récepteur CD36 par les GHRP entraînerait une inhibition de la MAPK ERK1/2 menant à une augmentation de l'activité de PPAR γ , puisque des études ont montré que la phosphorylation de la Ser⁸⁴ par la MAPK ERK1/2 diminue l'activité transcriptionnelle du

Des études ont montré que le récepteur nucléaire PPAR γ , en plus de réguler le transport du cholestérol dans les macrophages, présente des propriétés anti-inflammatoires. L'activation du PPAR γ inhibe les facteurs de transcription comme NF κ B et AP-1, résultant en une diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires (Jiang *et al.*, 1998), de l'expression endothéliale de certaines molécules d'adhérence comme VCAM-1 (van Bilsen & van Nieuwenhoven, 2010; Hamblin *et al.*, 2009) et une diminution de l'activation des macrophages (Ricote *et al.*, 1998c). Nos études ont permis de montrer qu'un traitement chronique avec le EP 80317 chez la souris déficiente en apoE diminue les taux

plasmatiques des protéines pro-inflammatoires telles que les cytokines et chimiokines TNF α , IL-6, RANTES, IL-1 α et IL-1 β (Harb *et al.*, 2009). De plus, le EP 80317 inhibe l'inflammation en diminuant l'expression vasculaire de la NADPH oxydase, iNOS, VCAM-1 et la chimiokine CCL2 (Harb *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que les effets anti-athérosclérotiques des ligands du CD36 peuvent s'expliquer en partie par une réduction de la réponse inflammatoire en réponse à l'activation du PPAR γ . À l'appui, notre étude a montré que le EP 80317 induit une augmentation de l'expression de COX-2 dans les macrophages, entraînant la production intracellulaire du 15d-PGJ₂, un ligand endogène du récepteur PPAR γ . En plus des effets anti-inflammatoires induits par l'activation du PPAR γ , il a été montré que le 15d-PGJ₂ peut inhiber directement l'activité de NF κ B en se liant de façon covalente à IKK ou en inhibant la liaison du NF κ B à l'ADN (Scher & Pillinger, 2005; Surh *et al.*, 2011). Il serait intéressant de voir si le 15d-PGJ₂ est responsable des effets anti-inflammatoires du EP 80317 en agissant directement sur le PPAR γ ou en empruntant une voie alternative. Nous avons montré que les ligands du CD36 entraînent l'augmentation de l'expression de COX-2. D'une part, l'enzyme COX-2 joue un rôle clé dans l'inflammation (Seibert & Masferrer, 1994; Seibert *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2000). Toutefois, l'expression de COX-2 est régulée par une boucle de rétroaction négative induite par le PPAR γ (Inoue *et al.*, 2000), ce qui pourrait expliquer que l'expression de COX-2 induite par le EP 80317 est transitoire. De plus, l'augmentation de l'expression de COX-2 semble être associée à un mécanisme de protection dans le développement de l'athérosclérose, en partie par l'activation du récepteur PPAR γ . En effet, les coxibs (celecoxib, rofecoxib et NS-398) entraînent une augmentation de l'expression du récepteur

CD36 et une diminution de l'expression des gènes impliqués dans l'efflux du cholestérol, ce qui favorise la formation des cellules spumeuses (Funk & FitzGerald, 2007; Chan *et al.*, 2007; Anwar *et al.*, 2011; Leon *et al.*, 2011; Reiss *et al.*, 2009). Il a été montré que les facteurs de transcription *CCAAT/enhancer-binding protein-β* (C/EBPβ) et AP-1 sont impliqués dans la régulation du gène COX-2 (Wu *et al.*, 2005; Wu, 2005) et la cascade de signalisation engendrée par les MAPK peut influencer l'activité de C/EBPβ et AP-1 (Hu *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2002; Karin, 1995). Il serait donc possible, tout comme pour les LDLox, que l'activation de ERK1/2 par le EP 80317 entraîne l'activation de ces facteurs de transcription résultant en une augmentation de la transcription du gène COX-2. Des essais luciférase nous permettraient de mesurer l'activité de ces facteurs de transcription et de déterminer s'ils sont impliqués dans la régulation de l'expression de COX-2 induite par le EP 80317.

L'utilisation d'un modèle murin d'athérosclérose induit par l'angiotensine II a récemment permis d'étudier les effets des ligands des PPARs sur l'inflammation vasculaire conduisant à une réduction des lésions athérosclérotiques, sans toutefois modifier les taux plasmatiques de cholestérol. En effet, des études ont montré que l'induction de l'inflammation par l'angiotensine II est associée à une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des molécules d'adhérence en réponse à l'activation du NFκB, menant au développement des lésions athérosclérotiques chez les souris apoE^{-/-} et LDLR^{-/-} (Daugherty & Cassis, 1999; Daugherty *et al.*, 2000; Tham *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 2001). L'activation des PPARs atténue l'accumulation des LDL dans la paroi artérielle, la perméabilité

vasculaire et l'expression des médiateurs pro-inflammatoires induits par l'angiotensine II (Takata *et al.*, 2008; Ji *et al.*, 2009a; Ji *et al.*, 2009b). Comme nous avons montré que le EP 80317 entraîne l'activation du PPAR γ , il serait intéressant d'étudier les effets anti-inflammatoires des ligands du CD36 dans le modèle d'athérosclérose induit par l'angiotensine II. Pour étudier les effets anti-inflammatoires *in vitro*, l'utilisation d'un modèle cellulaire qui exprime une phosphatase alcaline embryonnaire sécrétée (SEAP) induite par l'activation de NF κ B nous permettrait d'évaluer les effets des ligands du CD36 sur l'activation du NF κ B en réponse aux LDLox et même au LPS (Xie *et al.*, 2011).

De plus, l'apoE médie de puissants effets anti-inflammatoires (Laskowitz *et al.*, 2000; Roselaar & Daugherty, 1998; De Bont N. *et al.*, 2000; De Bont N. *et al.*, 1999; Van Oosten M. *et al.*, 2001). De récentes études ont montré que l'apoE est impliquée dans la monocytose ainsi que dans l'accumulation des monocytes dans les lésions athérosclérotiques et favorise la conversion des macrophages pro-inflammatoires de type M1 en macrophages de type M2 (Murphy *et al.*, 2011; Weber & Soehnlein, 2011; Baitsch *et al.*, 2011). Au début des années 2000, Laffite *et al.* ont montré que l'expression de l'apoE est régulée par le récepteur LXR dans les macrophages et les adipocytes (Laffite *et al.*, 2001). Comme les ligands du CD36 entraînent une augmentation de l'expression du LXR dans les macrophages (articles 1 et 2) et inhibent la migration des monocytes/macrophages dans les lésions athérosclérotiques (Harb *et al.*, 2009), il serait intéressant d'évaluer les effets du EP 80317 sur l'expression de l'apoE dans les macrophages.

7.4 Le transport inverse du cholestérol : effets des GHRPs sur l'absorption du cholestérol intestinale

Pour maintenir un équilibre, l'excès de cholestérol doit être transporté des macrophages vers le foie pour être éliminé. Nous avons d'abord montré que le EP 80317 entraîne la réduction des plaques athérosclérotiques et une réduction de l'hypercholestérolémie après un traitement prolongé (article 1), en plus d'entraîner une augmentation de l'efflux du cholestérol dans les macrophages isolés (article 2). Cependant, l'importance du mécanisme d'efflux du cholestérol dans la réduction des plaques d'athérosclérose *in vivo* n'avait pas été investiguée. Nous avons d'abord effectué des expériences visant à montrer les effets des GHRPs sur l'efflux du cholestérol et des phospholipides dans les macrophages péritonéaux isolés de souris traitées préalablement pendant 12 semaines par le EP 80317. Cependant, ces expériences d'efflux nécessitent une incubation des macrophages isolés avec du cholestérol tritié pendant une période de 24 à 48 heures. Or, les transporteurs ABC sont soumis à un *turnover* rapide et sont rapidement dégradés (Tall, 2008; Arakawa & Yokoyama, 2002; Wang *et al.*, 2003a). Ainsi, la période d'incubation requise *ex vivo* est vraisemblablement associée à une diminution de l'expression des transporteurs ABC, ce qui expliquerait l'échec de ces expérimentations à montrer un effet significatif sur l'efflux du cholestérol (résultats non publiés). Il était donc nécessaire d'évaluer les effets du EP 80317 sur l'efflux des macrophages *in vivo* pour évaluer la contribution de ce mécanisme dans la réduction des plaques athérosclérotiques et des taux de cholestérol plasmatiques totaux après un traitement de 12 semaines par le EP 80317.

Le transport inverse du cholestérol est initié soit en stimulant l'efflux du cholestérol, soit en augmentant les taux plasmatiques de HDL ainsi que leur efficacité ou encore en stimulant le métabolisme hépatique et l'excrétion intestinale du cholestérol (Khera *et al.*, 2011). Pour étudier les effets du EP 80317 sur le transport inverse du cholestérol *in vivo*, nous avons injecté dans la cavité péritonéale de souris des macrophages J774 radiomarqués avec du cholestérol tritié. Nos résultats n'ont pas montré d'augmentation significative du cholestérol tritié dans le plasma des souris prétraitées, pendant 12 semaines, avec le EP 80317 (article 3). Ces résultats pourraient possiblement être expliqués par le fait que les macrophages J774 injectés n'ont pas été traités par le EP 80317, et donc que la cascade PPAR γ -LXR α et l'expression des transporteurs ABC n'auraient pas été stimulés chez ces macrophages. Toutefois, les transporteurs ABC étant sujets à un *turnover* rapide, l'augmentation de l'expression d'ABCA1 et ABCG1 induite par le EP 80317 aurait aussi pu diminuer après l'injection des macrophages J774, même prétraités par le EP 80317. Une autre explication potentielle de ces résultats est liée au fait que bien que le EP 80317 diminue significativement les taux de cholestérol total plasmatiques chez les souris apoE $^{-/-}$, les taux de HDL plasmatiques demeurent inchangés; ainsi, il n'y a donc pas d'augmentation de la quantité d'accepteur extracellulaire pour le cholestérol chez les souris traitées (article 1).

En dépit de ces observations, nos résultats montrent qu'un traitement avec le EP 80317 favorise le transport inverse du cholestérol en induisant une augmentation de l'excrétion intestinale du cholestérol, sans toutefois moduler le métabolisme hépatique. Cependant, la

méthode utilisée pour étudier le RCT *in vivo* présente certaines limitations, incluant le fait qu'une injection intrapéritonéales des cellules radiomarquées puisse permettre un accès direct des lipoprotéines marquées aux intestins. Pour appuyer nos résultats, nous aurions pu utiliser la méthode de Wang et al. (Wang *et al.*, 2007) qui consiste à injecter les cellules radiomarquées par voie subcapsulaire (arrière du cou), évitant ainsi un contact direct avec l'intestin. Toutefois, notre étude a tout de même montré que le EP 80317 entraîne une augmentation de l'expression des transporteurs ABCG5/ABCG8 dans le jéjunum, ainsi qu'une diminution de l'expression de NPC1L1, un transporteur impliqué dans l'absorption du cholestérol au niveau intestinal (article 3). Le transport inverse est un processus qui, de manière classique, transporte le cholestérol des tissus périphériques vers le foie pour être sécrété dans la bile puis excrété dans les fèces. Cependant, il a récemment été montré que l'intestin pourrait jouer un rôle important dans le transport inverse du cholestérol, indépendamment de la sécrétion biliaire au niveau hépatique (Temel *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2008). L'efflux du cholestérol transintestinal (TICE) implique le transport du cholestérol directement de la circulation à travers les entérocytes puis vers la lumière intestinale. Kruit et al. ont montré que l'activation du LXR chez les souris *Mdr2^{-/-}*, un modèle où il y a absence de sécrétion biliaire, entraîne une augmentation de l'excrétion du cholestérol dans les fèces (Kruit *et al.*, 2005). Nos résultats montrent que le EP 80317 stimule l'expression du LXR α et des transporteurs ABCG5/ABCG8 au niveau de l'intestin sans affecter l'expression des gènes hépatiques (article 3). Ces résultats suggèrent que le EP 80317 favorise l'excrétion du cholestérol dans les fèces indépendamment de la sécrétion biliaire, une voie alternative qui a pour avantage de ne pas augmenter la concentration de

cholestérol dans la bile, pouvant ainsi limiter la formation de calculs biliaires chez l'homme (Cooper, 1991). Les effets du EP 80317 sur l'excrétion intestinale du cholestérol pourrait expliquer, en partie, la diminution des taux plasmatiques de cholestérol observée chez les souris apoE^{-/-} traitées pendant 12 semaines (article 1). Dans le cas des GHRPs, contrairement à notre hypothèse selon laquelle le EP 80317 pourrait réguler le métabolisme hépatique et intestinal, les résultats de cette troisième étude montrent le EP 80317 ne module pas les gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol au niveau hépatique. De plus, nous avons étudié la clairance hépatique des LDL et des VLDL marqués radioactivement chez les souris apoE^{-/-} traitées pendant 12 semaines avec les ligands du CD36. L'analyse cinétique a révélé que le EP 80317 ne modifie ni la clairance des LDL, ni celle des VLDL, par comparaison aux souris témoins (article 3). Ces résultats appuient nos observations suggérant que le métabolisme hépatique ne joue pas un rôle important dans les effets anti-athérosclérotiques du EP 80317. L'étude du TICE, qui consiste à perfuser une section de l'intestin avec une solution de Krebs contenant un mélange de taurocholate/phosphatidylcholine (van der Velde *et al.*, 2007; van der Velde *et al.*, 2008; Vrins *et al.*, 2009), pourrait aussi venir confirmer l'hypothèse selon laquelle le EP 80317 entraîne une augmentation du TICE.

7.5 Le récepteur CD36 comme nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'athérosclérose : avantages et inconvénients

De nombreuses études expérimentales ont montré que les ligands du PPAR γ entraînent une réduction de l'athérosclérose en stimulant l'efflux du cholestérol des macrophages et en antagonisant l'activité de certains facteurs de transcription comme le NF κ B (Collins *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001b; Ricote *et al.*, 2004; Chinetti *et al.*, 2001; Zadelaar *et al.*, 2007), sans toutefois moduler les taux plasmatiques de cholestérol. Cependant, l'activation du PPAR γ entraîne une augmentation de l'expression du récepteur CD36, engendrant une boucle de rétroaction positive qui favorise l'accumulation de lipides dans les macrophages (Nicholson *et al.*, 2000). Tout comme les agonistes du PPAR γ , le EP 80317 stimule la cascade PPAR γ -LXR α -transporteurs ABC et est associé à une augmentation des transporteurs ABCA1 et ABCG1 menant à une augmentation de l'efflux du cholestérol. Toutefois, le EP 80317 ne module pas à la hausse l'expression protéique du CD36 malgré la stimulation du PPAR γ , ce qui montre que les GHRPs ne favorisent pas cette boucle de rétroaction positive (Article 1). Ces résultats sont appuyés par une étude menée en parallèle avec l'hexaréline, un ligand des récepteurs CD36 et GHS-R1a, qui montrent que l'expression protéique du CD36 demeure inchangée après un traitement de 12 semaines administré à des souris apoE^{-/-} (Avallone *et al.*, 2005). Malgré les effets anti-athérosclérotiques des agonistes du PPAR γ observés dans le modèle murin, les essais

cliniques ont montré que les thiazolidinediones sont associés à une augmentation des risques d'insuffisance cardiaque et d'infarctus du myocarde (Jandeleit-Dahm *et al.*, 2009; Home *et al.*, 2009; Nissen & Wolski, 2010; Lincoff *et al.*, 2007). Cependant, le traitement par l'hexaréline, un ligand du récepteur CD36, a permis de préserver la contractilité ventriculaire suite à une ischémie myocardique et l'intégrité fonctionnelle de l'endothélium vasculaire (De Gennaro Colonna *et al.*, 1997a; De Gennaro Colonna *et al.*, 1997b).

Tout comme les agonistes du PPAR γ , les ligands synthétiques du LXR diminuent la progression de l'athérosclérose en régulant l'homéostasie du cholestérol dans le macrophage (Joseph *et al.*, 2002b; Tangirala *et al.*, 2002; Terasaka *et al.*, 2003). La délétion spécifique de LXR α et LXR β dans les macrophages favorise l'accumulation des lipides et le développement des lésions athérosclérotiques dans la paroi artérielle (Tangirala *et al.*, 2002). En plus d'activer le transport inverse du cholestérol, le facteur de transcription LXR inhibe les gènes pro-inflammatoires exprimés par le macrophage ce qui en fait une cible de choix dans le traitement de l'athérosclérose. Cependant, l'activation du LXR favorise la synthèse des acides gras en régulant l'expression des gènes impliqués dans la lipogenèse comme le SREBP1c et la FAS (Chen *et al.*, 2004; Joseph *et al.*, 2002a) entraînant une accumulation accrue de triglycérides dans le foie menant à une stéatose hépatique et une hausse des taux des VLDL et triglycérides plasmatiques (Chen *et al.*, 2004; Joseph *et al.*, 2002a; Terasaka *et al.*, 2003; Grefhorst *et al.*, 2002). Une étude macroscopique chez les souris apoE^{-/-} traitées pendant 12 semaines avec le EP 80317 n'a montré aucun signe de stéatose hépatique (Article 1). De plus, le EP 80317 n'entraîne pas de modification de

l'expression des gènes hépatiques impliqués dans le transport du cholestérol, pas plus que l'expression du SREBP1c, ce qui explique l'absence d'accumulation de triglycérides dans le foie de nos souris (Article 1 et 3). Le EP 80317 entraîne une diminution des taux de cholestérol totaux mais contrairement aux agonistes du LXR, le EP 80317 ne modifie pas les taux de triglycérides dans la circulation (Article 1). L'utilisation des agonistes du LXR a été limitée aux études expérimentales due à l'accumulation des triglycérides au niveau hépatique. Comme l'augmentation des gènes impliqués dans la synthèse des acides gras est principalement modulée par le LXR α , les efforts ont été axés sur le développement de composés sélectifs pour le récepteur LXR β qui auraient les mêmes effets bénéfiques sur le métabolisme du cholestérol en périphérie sans toutefois avoir les effets néfastes menant à la stéatose hépatique (Li et al., 2010; Lund et al., 2006; Quinet et al., 2006).

Bien que l'utilisation des statines conduit à une réduction des événements coronariens majeurs et des décès, les risques résiduels demeurent élevés chez un nombre considérable de patients. De nombreuses études expérimentales effectuées avec la rosuvastatine ont montré une diminution des lésions athérosclérotiques chez les souris apoE^{-/-}, LDLR^{-/-} ainsi que chez le modèle de souris apoE*3Leiden, un modèle plus représentatif de la pathologie humaine, et ces effets ne sont pas uniquement attribuables à une diminution du cholestérol plasmatique (Kleemann *et al.*, 2003; Zadelaar *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2009; Schroeter *et al.*, 2009; Gronros *et al.*, 2008; Enomoto *et al.*, 2009). Or, en plus de diminuer la synthèse du cholestérol, les statines en augmentent l'absorption intestinale et sont associés à de nombreux effets secondaires principalement d'ordre hépatique et musculaire (Costet,

2010). Les GHRPs engendrent aussi une diminution des taux plasmatiques de cholestérol mais contrairement aux statines, le EP 80317 favorise l'excrétion du cholestérol tout en diminuant l'absorption intestinale. Ces effets ne peuvent cependant pas expliquer en totalité la diminution des lésions athérosclérotiques observée chez les souris traitées pendant une période de 4, 8, 10 ou 12 semaines.

Pour réduire l'incidence de morbidité et mortalité liées aux complications de l'athérosclérose, les recherches se sont concentrées sur le développement de nouvelles thérapies, entre autres sur la synthèse de petits peptides mimétiques de l'apoA-I qui, bien qu'ils ne présentent aucune homologie de séquence avec l'apoA-I, ont la capacité de former des hélices α -amphipathiques de classe A qui miment la liaison de l'apoA-I sur les lipides (Sethi *et al.*, 2007; Getz & Reardon, 2011; Navab *et al.*, 2010). Des études ont montré que ces peptides mimétiques préviennent la formation des lésions athérosclérotiques en favorisant l'efflux du cholestérol et son transport inverse, en plus de montrer des effets anti-inflammatoires comparables aux HDL, principalement en séquestrant les lipides oxydés. Toutefois, les peptides mimétiques doivent être complexés à des phospholipides pour maximiser leurs effets, puisque les peptides seuls ne présentent que très peu ou pas d'effets (Di Bartolo *et al.*, 2011). En plus, l'administration orale des peptides mimétiques sont associés à une faible biodisponibilité. Tout comme les peptides mimétiques, les ligands sélectifs du CD36 sont de petits peptides et nos études ont montré que leurs effets anti-athérosclérotiques sont dus, en partie, à la modulation de l'efflux du cholestérol et du transport inverse du cholestérol (articles 1, 2 et 3) ainsi que par une réduction de

l'inflammation vasculaire (Harb *et al.*, 2009). Des études ont montré que l'utilisation des peptides mimétiques de l'apoA-I, en association avec une statine, amplifie les effets anti-athérosclérotiques (Navab *et al.*, 2005). Il serait tout aussi intéressant de voir si l'association d'un ligand du CD36 avec une statine exercerait un effet synergique dans la réduction des lésions athérosclérotiques. Bien que les peptides mimétiques des apolipoprotéines présentent un potentiel prometteur pour freiner le développement de l'athérosclérose, ils ont été associés à des effets secondaires gastrointestinaux, des nausées et des maux de tête (Nissen *et al.*, 2003; Di Bartolo *et al.*, 2011). De plus, il ne semble pas y avoir de corrélation entre les différentes propriétés pharmacologiques des peptides mimétiques, c'est-à-dire que les peptides qui sont les plus efficaces à induire l'efflux du cholestérol dans les macrophages ne sont pas nécessairement de bons candidats anti-inflammatoires et vice versa (D'Souza *et al.*, 2010; Osei-Hwedieh *et al.*, 2011).

Les effets anti-athérosclérotiques des ligands du CD36 (*Figure 23*) sont attribuables entre autres à la régulation de la gestion des lipides au niveau des macrophages, ce qui entraîne une diminution de la formation des cellules spumeuses mais aussi à une diminution des taux plasmatiques de cholestérol, une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol et une inhibition de l'inflammation vasculaire. Cependant, le récepteur CD36 est exprimé par plusieurs types cellulaires et dans différents tissus. Les effets des ligands du CD36 sur la réaction inflammatoire et l'angiogenèse dans d'autres contextes pathologiques devront être étudiés avec précaution pour s'assurer que l'activation de ce récepteur pléiotrope soit spécifique en ciblant l'effet thérapeutique recherché.

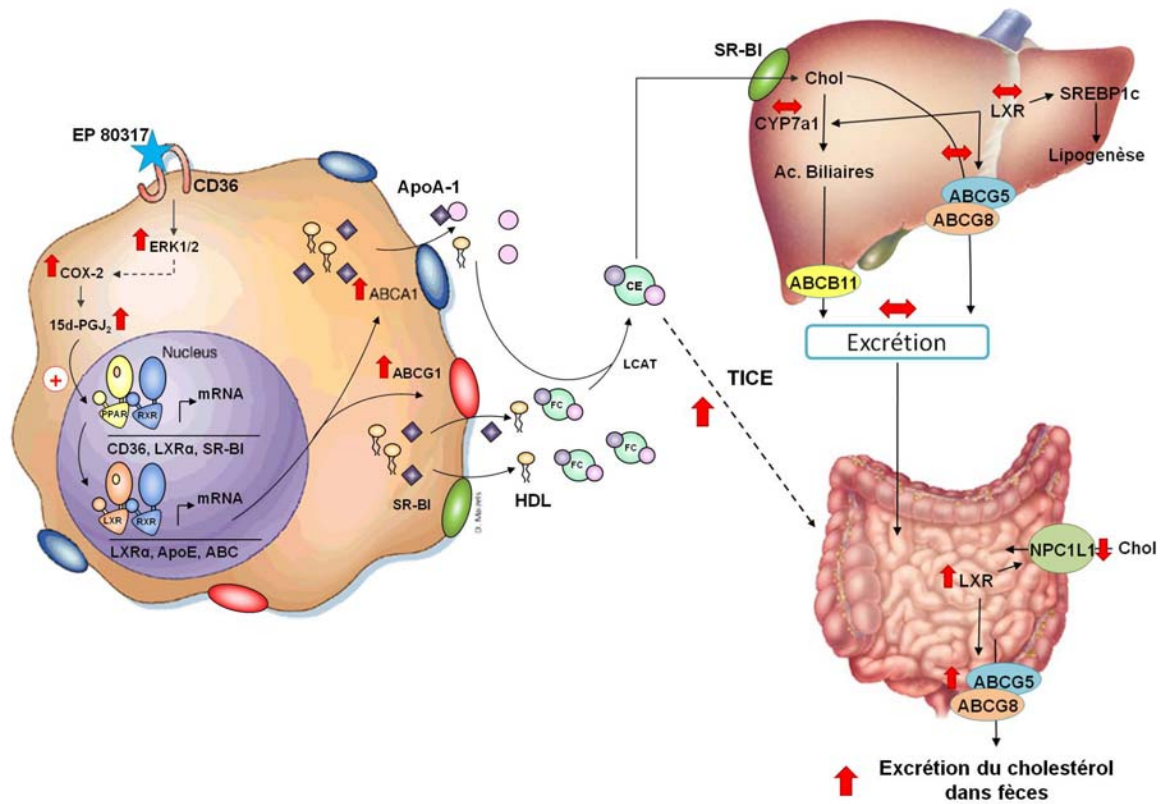


Figure 23. Synthèse des effets anti-athérosclérotiques des GHRPs

Les effets anti-athérosclérotiques des ligands du CD36 sont attribuables entre autres à la régulation de la gestion des lipides au niveau des macrophages. L'activation du récepteur CD36 par le EP 80317 entraîne une cascade de signalisation qui passe par la phosphorylation de la protéine kinase ERK1/2, une augmentation de l'expression de la COX-2 et une augmentation de la production intracellulaire de 15d-PGJ₂, conduisant à l'activation de la cascade PPAR γ -LXR α -transporteurs ABC associée à une augmentation de l'efflux du cholestérol. L'activation du récepteur CD36 entraîne aussi une diminution de l'absorption intestinale du cholestérol en diminuant l'expression du NPC1L1 et en régulant à la hausse les transporteurs ABCG5/G8 favorisant l'excrétion du cholestérol dans les fèces (Bujold K., 2011).

8 Perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse nous ont permis d'élucider les mécanismes impliqués dans les effets anti-athérosclérotiques des ligands du CD36, notamment les effets sur le métabolisme lipidique au niveau des macrophages ainsi que sur le transport inverse du cholestérol vers le foie.

Cascade de signalisation en amont de la kinase ERK1/2

Bien que les principales protéines de signalisation ont été identifiées dans le cadre de cette thèse, différents points restent à être éclaircis. Dans cette voie, la cascade de signalisation en amont de la kinase ERK1/2 reste à être déterminée. En effet, nous avons montré que le EP 80317 induit la phosphorylation de la kinase ERK1/2 et entraîne une augmentation de l'expression de la COX-2, cependant les protéines impliquées dans la cascade entre le récepteur CD36 et la kinase ERK1/2 n'ont pas été étudiées. Nous savons déjà que les membres de la famille des kinases src sont impliqués dans la cascade de signalisation induite par l'activation du récepteur CD36, conduisant à l'activation des MAPK (Moore *et al.*, 2002; Bamberger *et al.*, 2003; Rahaman *et al.*, 2006). Il serait intéressant de déterminer, à l'aide d'une étude de co-immunoprécipitation, si le EP 80317 entraîne le recrutement des kinases src (fyn et/ou lyn) et la formation d'un complexe avec le récepteur CD36. Un essai d'immunobuvardage effectué avec un anticorps dirigé contre src-phospho- Y418 nous permettrait également de déterminer si les ligands du CD36 induisent la phosphorylation

des src kinases. Ces études permettraient de clarifier la cascade de signalisation induite par les GHRPs entre le récepteur CD36 et les MAPK, résultant en l'activation du PPAR γ .

Rôle des ligands du CD36 dans le métabolisme des lipoprotéines et dans l'absorption intestinale

Nous avons montré que le EP 80317 entraîne une réduction des taux plasmatiques de cholestérol et une augmentation du transport inverse du cholestérol en favorisant l'excrétion intestinale du cholestérol. Afin d'élucider les mécanismes responsables d'une diminution du cholestérol dans les fèces suite à un traitement chronique avec les ligands du récepteur CD36, nous pourrions proposer de réaliser une expérience d'absorption du cholestérol chez une lignée cellulaire intestinale bien établie. Les cellules Caco-2/15 expriment le récepteur CD36, ce qui en fait un modèle de choix pour étudier les effets du EP 80317. Pour ce faire, les cellules sont incubées avec une solution contenant du cholestérol radioactif et du cholestérol lié à l'albumine en présence ou non de EP 80317. Cette étude nous permettrait de confirmer si le EP 80317 diminue l'absorption du cholestérol en modulant l'expression entre autres du NPC1L1 et des transporteurs ABCG5/G8, ce qui pourrait justifier d'effectuer une étude *in vivo*, dans laquelle l'absorption du cholestérol serait mesurée après l'administration d'un bolus intragastrique de cholestérol et de β -sitostanol marqués avec du [^{14}C] et du [^3H], respectivement, à des souris traitées avec les ligands du récepteur CD36. L'excrétion fécale du cholestérol et du β -sitostanol, un dérivé saturé des stérols provenant des plantes, vont permettre ensuite

d'évaluer l'absorption intestinale. Ces études sont importantes puisque, selon nos résultats, le EP 80317 ne module pas le métabolisme lipidique hépatique; indiquant que les efforts devraient être concentrés sur l'étude du EP 80317 sur le métabolisme intestinal des lipides.

Effets des GHRPs dans le métabolisme des lipides : similarité entre le développement de l'athérosclérose et la dégénérescence maculaire liée à l'âge

Outre les études proposées qui permettront de préciser les cibles moléculaires des GHRPs au niveau des macrophages, les recherches pourraient être orientées vers l'étude du métabolisme lipidique au niveau sous-rétinien. Des études ont montré que le CD36 est exprimé à la surface des cellules RPE et qu'il est l'un des récepteurs impliqués dans la clairance des segments externes des photorécepteurs (Ryeom *et al.*, 1996). De plus, les stades précoces de la dégénérescence maculaire liée à l'âge sont caractérisés par la formation de drusen, des dépôts de matériel extracellulaires dans la membrane de Bruch, menant à un épaississement de cette membrane (Green & Enger, 1993). Une étude a récemment montré que le récepteur CD36 joue un rôle essentiel dans l'internalisation des lipides oxydés par les RPE autant *in vitro* qu'*in vivo*, et qu'une délétion du gène CD36 entraîne l'accumulation sous-rétinienne de dépôts lipidiques et favorise l'épaississement de la membrane de Bruch (Picard *et al.*, 2010). L'activation du CD36, au contraire, prévient l'accumulation de dépôts lipidiques dans l'espace sous-rétinien et préserve en partie la fonction des cellules RPE (Picard *et al.*, 2010). L'expertise acquise dans le métabolisme des lipides et le développement de ligands sélectifs du CD36 nous permettraient d'étudier

l'efficacité de ces nouvelles molécules comme agents thérapeutiques potentiels dans le traitement de la dégénérescence maculaire. Dans un premier temps, l'effet des ligands du CD36 sur l'internalisation des LDLox par les RPE devrait être étudié en utilisant des lipoprotéines couplées à un marqueur fluorescent, de façon à analyser si les ligands du CD36 modulent l'internalisation des lipoprotéines marquées. De plus, l'étude du métabolisme des lipides dans les RPE pourraient être documentée en analysant l'effet des ligands du CD36 sur le transport des lipides. Des études ont montré que les RPE expriment à leur surface le transporteur ABCA1 et les ligands du LXR entraînent une augmentation de leur expression (Tserentsoodol *et al.*, 2006; Lakkaraju *et al.*, 2007; Duncan *et al.*, 2009). Comme nous avons montré que les ligands du CD36 stimule l'expression des transporteurs ABC dans les macrophages ainsi qu'une augmentation de l'efflux des lipides, il faudrait étudier les effets du EP 80317 (ou autres ligands du CD36) sur l'expression des transporteurs ABC dans les RPE ainsi que leurs effets sur l'efflux du cholestérol en utilisant des cellules ARPE-19 (lignée cellulaire de RPE humaine) ainsi que des cellules RPE provenant de souris apoE^{-/-} et apoE^{-/-}/CD36^{-/-}. Les ligands du CD36 pourraient être une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge en régulant le métabolisme des lipides.

9 Conclusion

En conclusion, les travaux effectués dans le cadre de cette thèse nous ont permis de montrer que l'activation du récepteur CD36 par le EP 80317 pourrait s'avérer être une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement de l'athérosclérose. Les effets anti-athérosclérotiques et hypocholestérolémiants des ligands synthétiques du récepteur CD36 lorsqu'administrés à long terme sont en partie engendrés par 1) la régulation du métabolisme des lipides au niveau des macrophages en réponse à l'activation du PPAR γ par son ligand endogène, le 15d-PGJ₂ et 2) par une augmentation du transport inverse du cholestérol, particulièrement par une augmentation de l'efflux transintestinal.

Bibliographie

Abdelkarim, M, Caron, S, Duhem, C, Prawitt, J, Dumont, J, Lucas, A, Bouchaert, E, Briand, O, Brozek, J, Kuipers, F, Fievet, C, Cariou, B & Staels, B. (2010). The farnesoid X receptor regulates adipocyte differentiation and function by promoting peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and interfering with the Wnt/beta-catenin pathways. *J Biol Chem*, **285**, 36759-36767.

Abe, T, Shimamura, M, Jackman, K, Kurinami, H, Anrather, J, Zhou, P & Iadecola, C. (2010). Key role of CD36 in Toll-like receptor 2 signaling in cerebral ischemia. *Stroke*, **41**, 898-904.

Abourbih, S, Filion, KB, Joseph, L, Schiffrin, EL, Rinfret, S, Poirier, P, Pilote, L, Genest, J & Eisenberg, MJ. (2009). Effect of fibrates on lipid profiles and cardiovascular outcomes: a systematic review. *Am J Med*, **122**, 962-968.

Abumrad, NA, el-Maghrabi, MR, Amri, EZ, Lopez, E & Grimaldi, PA. (1993). Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. *J Biol Chem*, **268**, 17665-17668.

Acton, S, Rigotti, A, Landschulz, KT, Xu, S, Hobbs, HH & Krieger, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, **271**, 518-520.

Adams, M, Reginato, MJ, Shao, D, Lazar, MA & Chatterjee, VK. (1997). Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *J Biol Chem*, **272**, 5128-5132.

Adorni, MP, Zimetti, F, Billheimer, JT, Wang, N, Rader, DJ, Phillips, MC & Rothblat, GH. (2007). The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J Lipid Res*, **48**, 2453-2462.

Akiyama, TE, Sakai, S, Lambert, G, Nicol, CJ, Matsusue, K, Pimprale, S, Lee, Y-H, Ricote, M, Glass, CK, Brewer, HB & Gonzales, FJ. (2002). Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor γ gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol*, **22**, 2607-2619.

Alder-Baerens, N, Muller, P, Pohl, A, Korte, T, Hamon, Y, Chimini, G, Pomorski, T & Herrmann, A. (2005). Headgroup-specific exposure of phospholipids in ABCA1-expressing cells. *J Biol Chem*, **280**, 26321-26329.

- Allred, KF, Smart, EJ & Wilson, ME. (2006). Estrogen receptor-alpha mediates gender differences in atherosclerosis induced by HIV protease inhibitors. *J Biol Chem*, **281**, 1419-1425.
- Alon, R, Kassner, PD, Carr, MW, Finger, EB, Hemler, ME & Springer, TA. (1995). The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol*, **128**, 1243-1253.
- Altmann, SW, Davis, HR, Jr., Zhu, LJ, Yao, X, Hoos, LM, Tetzloff, G, Iyer, SP, Maguire, M, Golovko, A, Zeng, M, Wang, L, Murgolo, N & Graziano, MP. (2004). Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science*, **303**, 1201-1204.
- Anitschkow, N & Chalator, S. (1913). Ueber experimentelle cholesterin-steatose und ihre bedeutung fur die entstehung einiger pathologischer prozess. pp. 1-9.
- Anwar, K, Voloshyna, I, Littlefield, MJ, Carsons, SE, Wirkowski, PA, Jaber, NL, Sohn, A, Eapen, S & Reiss, AB. (2011). COX-2 inhibition and inhibition of cytosolic phospholipase A2 increase CD36 expression and foam cell formation in THP-1 cells. *Lipids*, **46**, 131-142.
- Arakawa, R & Yokoyama, S. (2002). Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. *J Biol Chem*, **277**, 22426-22429.
- Armstrong, LC & Bornstein, P. (2003). Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol*, **22**, 63-71.
- Asch, AS, Barnwell, J, Silverstein, RL & Nachman, RL. (1987). Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest*, **79**, 1054-1061.
- Ashraf, MZ, Kar, NS & Podrez, EA. (2009). Oxidized phospholipids: biomarker for cardiovascular diseases. *Int J Biochem Cell Biol*, **41**, 1241-1244.
- Auffray, C, Fogg, D, Garfa, M, Elain, G, Join-Lambert, O, Kayal, S, Sarnacki, S, Cumano, A, Lauvau, G & Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science*, **317**, 666-670.
- Aurrand-Lions, M, Johnson-Leger, C & Imhof, BA. (2002). The last molecular fortress in leukocyte trans-endothelial migration. *Nat Immunol*, **3**, 116-118.
- Avallone, R, Demers, A, Rodrigue-Way, A, Bujold, K, Harb, D, Marleau, S, Ong, H & Tremblay, A. (2005). A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor prevents fatty streak development by activating PPAR in macrophages.

- Aye, IL, Singh, AT & Keelan, JA. (2009). Transport of lipids by ABC proteins: interactions and implications for cellular toxicity, viability and function. *Chem Biol Interact*, **180**, 327-339.
- Babior, BM. (2000). The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life*, **50**, 267-269.
- Baitsch, D, Bock, HH, Engel, T, Telgmann, R, Muller-Tidow, C, Varga, G, Bot, M, Herz, J, Robenek, H, von, EA & Nofer, JR. (2011). Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **31**, 1160-1168.
- Baldan, A, Gomes, AV, Ping, P & Edwards, PA. (2008). Loss of ABCG1 results in chronic pulmonary inflammation. *J Immunol*, **180**, 3560-3568.
- Baldan, A, Pei, L, Lee, R, Tarr, P, Tangirala, RK, Weinstein, MM, Frank, J, Li, AC, Tontonoz, P & Edwards, PA. (2006a). Impaired development of atherosclerosis in hyperlipidemic Ldlr^{-/-} and ApoE^{-/-} mice transplanted with Abcg1^{-/-} bone marrow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 2301-2307.
- Baldan, A, Tarr, P, Vales, CS, Frank, J, Shimotake, TK, Hawgood, S & Edwards, PA. (2006b). Deletion of the transmembrane transporter ABCG1 results in progressive pulmonary lipidosis. *J Biol Chem*, **281**, 29401-29410.
- Bamberger, ME, Harris, ME, McDonald, DR, Husemann, J & Landreth, GE. (2003). A cell surface receptor complex for fibrillar beta-amyloid mediates microglial activation. *J Neurosci*, **23**, 2665-2674.
- Baranova, IN, Kurlander, R, Bocharov, AV, Vishnyakova, TG, Chen, Z, Remaley, AT, Csako, G, Patterson, AP & Eggerman, TL. (2008). Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling. *J Immunol*, **181**, 7147-7156.
- Barter, PJ, Caulfield, M, Eriksson, M, Grundy, SM, Kastelein, JJ, Komajda, M, Lopez-Sendon, J, Mosca, L, Tardif, JC, Waters, DD, Shear, CL, Revkin, JH, Buhr, KA, Fisher, MR, Tall, AR & Brewer, B. (2007). Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*, **357**, 2109-2122.
- Beltowski, J. (2008). Liver X receptors (LXR) as therapeutic targets in dyslipidemia. *Cardiovasc Ther*, **26**, 297-316.
- Berge, KE, Tian, H, Graf, GA, Yu, L, Grishin, NV, Schultz, J, Kwiterovich, P, Shan, B, Barnes, R & Hobbs, HH. (2000). Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*, **290**, 1771-1775.
- Black, DD. (2007). Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. I. Development of intestinal lipid absorption: cellular events in chylomicron assembly and secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **293**, G519-G524.

- Bodart, V, Bouchard, JF, McNicoll, N, Escher, E, Carriere, P, Ghigo, E, Sejlitz, T, Sirois, MG, Lamontagne, D & Ong, H. (1999). Identification and characterization of a new growth hormone-releasing peptide receptor in the heart. *Circ Res*, **85**, 796-802.
- Bodart, V, Febbraio, M, Demers, A, McNicoll, N, Pohankova, P, Perreault, A, Sejlitz, T, Escher, E, Silverstein, RL, Lamontagne, D & Ong, H. (2002). CD36 mediates the cardiovascular action of growth hormone-releasing peptides in the heart. *Circ Res*, **90**, 844-849.
- Bodzioch, M, Orso, E, Klucken, J, Langmann, T, Bottcher, A, Diederich, W, Drobnik, W, Barlage, S, Buchler, C, Porsch-Ozcurumez, M, Kaminski, WE, Hahmann, HW, Oette, K, Rothe, G, Aslanidis, C, Lackner, KJ & Schmitz, G. (1999). The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet*, **22**, 347-351.
- Bolin, RB, Medina, F & Cheney, BA. (1981). Glycoprotein changes in fresh vs. room temperature-stored platelets and their buoyant density cohorts. *J Lab Clin Med*, **98**, 500-510.
- Bonen, A, Han, XX, Habets, DD, Febbraio, M, Glatz, JF & Luiken, JJ. (2007). A null mutation in skeletal muscle FAT/CD36 reveals its essential role in insulin- and AICAR-stimulated fatty acid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **292**, E1740-E1749.
- Bonen, A, Parolin, ML, Steinberg, GR, Calles-Escandon, J, Tandon, NN, Glatz, JF, Luiken, JJ, Heigenhauser, GJ & Dyck, DJ. (2004). Triacylglycerol accumulation in human obesity and type 2 diabetes is associated with increased rates of skeletal muscle fatty acid transport and increased sarcolemmal FAT/CD36. *FASEB J*, **18**, 1144-1146.
- Bouhrel, MA, Brozek, J, Derudas, B, Zawadzki, C, Jude, B, Staels, B & Chinetti-Gbaguidi, G. (2009). Unlike PPARgamma, PPARalpha or PPARbeta/delta activation does not promote human monocyte differentiation toward alternative macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, **386**, 459-462.
- Bouhrel, MA, Chinetti-Gbaguidi, G & Staels, B. (2007). Glitazones in the treatment of cardiovascular risk factors. *Fundam Clin Pharmacol*, **21 Suppl 2**, 7-13.
- Boullier, A, Bird, DA, Chang, M-K, Dennis, EA, Friedman, P, Gillotte-Taylor, K, Hörkö, S, Palinski, W, Quehenberger, O, Shaw, P, Steinberg, D, Terpstra, V & Witztum, JL. (2001). Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, **947**, 214-222.
- Bowers, CY. (1998). Growth hormone-releasing peptide (GHRP). *Cell Mol Life Sci*, **54**, 1316-1329.
- Bowers, CY, Momany, FA, Reynolds, GA & Hong, A. (1984). On the in vitro and in vivo activity of a new synthetic hexapeptide that acts on the pituitary to specifically release growth hormone. *Endocrinology*, **114**, 1537-1545.

Briand, F, Naik, SU, Fuki, I, Millar, JS, Macphee, C, Walker, M, Billheimer, J, Rothblat, G & Rader, DJ. (2009). Both the peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist, GW0742, and ezetimibe promote reverse cholesterol transport in mice by reducing intestinal reabsorption of HDL-derived cholesterol. *Clin Transl Sci*, **2**, 127-133.

Brooks-Wilson, A, Marcil, M, Clee, SM, Zhang, LH, Roomp, K, van, DM, Yu, L, Brewer, C, Collins, JA, Molhuizen, HO, Loubser, O, Ouelette, BF, Fichter, K, Ashbourne-Excoffon, KJ, Sensen, CW, Scherer, S, Mott, S, Denis, M, Martindale, D, Frohlich, J, Morgan, K, Koop, B, Pimstone, S, Kastelein, JJ, Genest, J, Jr. & Hayden, MR. (1999). Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet*, **22**, 336-345.

Brown, AJ, Dean, RT & Jessup, W. (1996). Free and esterified oxysterol: formation during copper-oxidation of low density lipoprotein and uptake by macrophages. *J Lipid Res*, **37**, 320-335.

Brown, AJ, Mander, EL, Gelissen, IC, Kritharides, L, Dean, RT & Jessup, W. (2000). Cholesterol and oxysterol metabolism and subcellular distribution in macrophage foam cells: accumulation of oxidized esters in lysosomes. *J Lipid Res*, **41**, 226-236.

Brown, JM, Bell, TA, III, Alger, HM, Sawyer, JK, Smith, TL, Kelley, K, Shah, R, Wilson, MD, Davis, MA, Lee, RG, Graham, MJ, Croke, RM & Rudel, LL. (2008). Targeted depletion of hepatic ACAT2-driven cholesterol esterification reveals a non-biliary route for fecal neutral sterol loss. *J Biol Chem*, **283**, 10522-10534.

Brown, MS & Goldstein, JL. (1979). Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 3330-3337.

Brown, MS & Goldstein, JL. (1999). A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11041-11048.

Brown, MS, Ho, YK & Goldstein, JL. (1980). The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters. *J Biol Chem*, **255**, 9344-9352.

Brundert, M, Heeren, J, Bahar-Bayansar, M, Ewert, A, Moore, KJ & Rinninger, F. (2006). Selective uptake of HDL cholesteryl esters and cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages independent of SR-BI. *J Lipid Res*, **47**, 2408-2421.

Brunham, LR, Kruit, JK, Iqbal, J, Fievet, C, Timmins, JM, Pape, TD, Coburn, BA, Bissada, N, Staels, B, Groen, AK, Hussain, MM, Parks, JS, Kuipers, F & Hayden, MR. (2006). Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest*, **116**, 1052-1062.

Bruni, F, Pasqui, AL, Pastorelli, M, Bova, G, Cercignani, M, Palazzuoli, A, Sawamura, T, Gioffre, WR, Auteri, A & Puccetti, L. (2005). Different effect of statins on platelet

oxidized-LDL receptor (CD36 and LOX-1) expression in hypercholesterolemic subjects. *Clin Appl Thromb Hemost*, **11**, 417-428.

Buchmann, J, Meyer, C, Neschen, S, Augustin, R, Schmolz, K, Kluge, R, Al-Hasani, H, Jurgens, H, Eulenberg, K, Wehr, R, Dohrmann, C, Joost, HG & Schurmann, A. (2007). Ablation of the cholesterol transporter adenosine triphosphate-binding cassette transporter G1 reduces adipose cell size and protects against diet-induced obesity. *Endocrinology*, **148**, 1561-1573.

Bujold, K, Rhinds, D, Jossart, C, Febbraio, M, Marleau, S & Ong, H. (2009). CD36-mediated cholesterol efflux is associated with PPARgamma activation via a MAPK-dependent COX-2 pathway in macrophages. *Cardiovasc Res*, **83**, 457-464.

Burgess, B, Naus, K, Chan, J, Hirsch-Reinshagen, V, Tansley, G, Matzke, L, Chan, B, Wilkinson, A, Fan, J, Donkin, J, Balik, D, Tanaka, T, Ou, G, Dyer, R, Innis, S, McManus, B, Lutjohann, D & Wellington, C. (2008). Overexpression of human ABCG1 does not affect atherosclerosis in fat-fed ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **28**, 1731-1737.

Burgess, JW, Frank, PG, Franklin, V, Liang, P, McManus, DC, Desforges, M, Rassart, E & Marcel, YL. (1999). Deletion of the C-terminal domain of apolipoprotein A-I impairs cell surface binding and lipid efflux in macrophage. *Biochemistry*, **38**, 14524-14533.

Burns, KA & Vanden Heuvel, JP. (2007). Modulation of PPAR activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta*, **1771**, 952-960.

Cai, SF, Kirby, RJ, Howles, PN & Hui, DY. (2001). Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. *J Lipid Res*, **42**, 902-909.

Calkin, AC & Tontonoz, P. (2010). Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **30**, 1513-1518.

Calpe-Berdiel, L, Rotllan, N, Fievet, C, Roig, R, Blanco-Vaca, F & Escola-Gil, JC. (2008). Liver X receptor-mediated activation of reverse cholesterol transport from macrophages to feces in vivo requires ABCG5/G8. *J Lipid Res*, **49**, 1904-1911.

Calvo, D, Gomez-Coronado, D, Suarez, Y, Lasuncion, MA & Vega, MA. (1998). Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *Lipid Res*, **39**, 777-788.

Camp, HS & Tafuri, SR. (1997). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **272**, 10811-10816.

- Campbell, SE, Tandon, NN, Woldegiorgis, G, Luiken, JJ, Glatz, JF & Bonen, A. (2004). A novel function for fatty acid translocase (FAT)/CD36: involvement in long chain fatty acid transfer into the mitochondria. *J Biol Chem*, **279**, 36235-36241.
- Cao, G, Beyer, TP, Yang, XP, Schmidt, RJ, Zhang, Y, Bensch, WR, Kauffman, RF, Gao, H, Ryan, TP, Liang, Y, Eacho, PI & Jiang, XC. (2002). Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. *J Biol Chem*, **277**, 39561-39565.
- Carvalho, MD, Vendrame, CM, Ketelhuth, DF, Yamashiro-Kanashiro, EH, Goto, H & Gidlund, M. (2010). High-density lipoprotein inhibits the uptake of modified low-density lipoprotein and the expression of CD36 and FcγRI. *J Atheroscler Thromb*, **17**, 844-857.
- Castrillo, A, Joseph, SB, Vaidya, SA, Haberland, M, Fogelman, AM, Cheng, G & Tontonoz, P. (2003). Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell*, **12**, 805-816.
- Castrillo, A & Tontonoz, P. (2004). Nuclear receptors in macrophage biology: at the crossroads of lipid metabolism and inflammation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**, 455-480.
- Cavelier, C, Lorenzi, I, Rohrer, L & von Eckardstein, A. (2006). Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1. *Biochim Biophys Acta*, **1761**, 655-666.
- Cha, JY & Repa, JJ. (2007). The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem*, **282**, 743-751.
- Chabowski, A, Coort, SL, Calles-Escandon, J, Tandon, NN, Glatz, JF, Luiken, JJ & Bonen, A. (2004). Insulin stimulates fatty acid transport by regulating expression of FAT/CD36 but not FABPpm. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **287**, E781-E789.
- Chan, ES, Zhang, H, Fernandez, P, Edelman, SD, Pillinger, MH, Ragolia, L, Palaia, T, Carsons, S & Reiss, AB. (2007). Effect of cyclooxygenase inhibition on cholesterol efflux proteins and atheromatous foam cell transformation in THP-1 human macrophages: a possible mechanism for increased cardiovascular risk. *Arthritis Res Ther*, **9**, R4.
- Chang, AJ, Song, DH & Wolfe, MM. (2006). Attenuation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) mediates gastrin-stimulated colorectal cancer cell proliferation. *J Biol Chem*, **281**, 14700-14710.
- Chawla, A, Boisvert, WA, Lee, CH, Laffitte, BA, Barak, Y, Joseph, SB, Liao, D, Nagy, L, Edwards, PA, Curtiss, LK, Evans, RM & Tontonoz, P. (2001a). A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*, **7**, 161-171.

- Chawla, A, Boisvert, WA, Lee, CH, Laffitte, BA, Barak, Y, Joseph, SB, Liao, D, Nagy, L, Edwards, PA, Curtiss, LK, Evans, RM & Tontonoz, P. (2001b). A PPARgamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*, **7**, 161-171.
- Chen, G, Liang, G, Ou, J, Goldstein, JL & Brown, MS. (2004). Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 11245-11250.
- Chen, M, Yang, Y, Braunstein, E, Georgeson, KE & Harmon, CM. (2001a). Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **281**, E916-E923.
- Chen, M, Yang, YK, Loux, TJ, Georgeson, KE & Harmon, CM. (2006). The role of hyperglycemia in FAT/CD36 expression and function. *Pediatr Surg Int*, **22**, 647-654.
- Chen, Z, Ishibashi, S, Perrey, S, Osuga, J, Gotoda, T, Kitamine, T, Tamura, Y, Okasaki, H, Yahagi, N, Iizuka, Y, Shionoiri, F, Ohashi, K, Harada, K, Shimano, H, Nagai, R & Yamada, N. (2001b). Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice: pleiotropic effects on CD36 expression and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 372-377.
- Chiang, JY. (2009a). Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res*, **50**, 1955-1966.
- Chiang, JY. (2009b). Hepatocyte nuclear factor 4alpha regulation of bile acid and drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **5**, 137-147.
- Chiang, JY, Kimmel, R & Stroup, D. (2001). Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha). *Gene*, **262**, 257-265.
- Chilongola, J, Balthazary, S, Mpina, M, Mhando, M & Mbugi, E. (2009). CD36 deficiency protects against malarial anaemia in children by reducing Plasmodium falciparum-infected red blood cell adherence to vascular endothelium. *Trop Med Int Health*, **14**, 810-816.
- Chinetti, G, Gbaguidi, FG, Griglio, S, Mallat, Z, Antonucci, M, Poulain, P, Chapman, J, Fruchart, JC, Tedgui, A, Najib-Fruchart, J & Staels, B. (2000). CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation*, **101**, 2411-2417.
- Chinetti, G, Lestavel, S, Bocher, V, Remaley, AT, Neve, B, Torra, IP, Teissier, E, Minnich, A, Jaye, M, Duverger, N, Brewer, HB, Fruchart, JC, Clavey, V & Staels, B. (2001). PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nature Med*, **7**, 53-58.

- Chiurchiu, V, Izzi, V, D'Aquilio, F, Vismara, D, Carotenuto, F, Catanzaro, G & Maccarrone, M. (2011). Endomorphin-1 prevents lipid accumulation via CD36 down-regulation and modulates cytokines release from human lipid-laden macrophages. *Peptides*, **32**, 80-85.
- Cho, S, Park, EM, Febbraio, M, Anrather, J, Park, L, Racchumi, G, Silverstein, RL & Iadecola, C. (2005). The class B scavenger receptor CD36 mediates free radical production and tissue injury in cerebral ischemia. *J Neurosci*, **25**, 2504-2512.
- Cho, S, Szeto, HH, Kim, E, Kim, H, Tolhurst, AT & Pinto, JT. (2007). A novel cell-permeable antioxidant peptide, SS31, attenuates ischemic brain injury by down-regulating CD36. *J Biol Chem*, **282**, 4634-4642.
- Chuang, PC, Lin, YJ, Wu, MH, Wing, LY, Shoji, Y & Tsai, SJ. (2010). Inhibition of CD36-dependent phagocytosis by prostaglandin E2 contributes to the development of endometriosis. *Am J Pathol*, **176**, 850-860.
- Collins, AR, Meehan, WP, Kintscher, U, Jackson, S, Wakino, S, Noh, G, Palinski, W, Hsueh, WA & Law, RE. (2001). Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 365-371.
- Collot-Teixeira, S, Martin, J, McDermott-Roe, C, Poston, R & McGregor, JL. (2007). CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, **75**, 468-477.
- Combadiere, C, Potteaux, S, Rodero, M, Simon, T, Pezard, A, Esposito, B, Merval, R, Proudfoot, A, Tedgui, A & Mallat, Z. (2008). Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytes and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, **117**, 1649-1657.
- Cooper, AD. (1991). Metabolic basis of cholesterol gallstone disease. *Gastroenterol Clin North Am*, **20**, 21-46.
- Coort, SL, Luiken, JJ, Van Der Vusse, GJ, Bonen, A & Glatz, JF. (2004). Increased FAT (fatty acid translocase)/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in cardiac myocytes from obese Zucker rats. *Biochem Soc Trans*, **32**, 83-85.
- Coraci, IS, Husemann, J, Berman, JW, Hulette, C, Dufour, JH, Campanella, GK, Luster, AD, Silverstein, SC & El-Khoury, JB. (2002). CD36, a class B scavenger receptor, is expressed on microglia in Alzheimer's disease brains and can mediate production of reactive oxygen species in response to beta-amyloid fibrils. *Am J Pathol*, **160**, 101-112.
- Costet, P. (2010). Molecular pathways and agents for lowering LDL-cholesterol in addition to statins. *Pharmacol Ther*, **126**, 263-278.

- Covey, SD, Krieger, M, Wang, W, Penman, M & Trigatti, BL. (2003). Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 1589-1594.
- Croce, K & Libby, P. (2007). Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol*, **14**, 55-61.
- Crombie, R & Silverstein, R. (1998). Lysosomal integral membrane protein II binds thrombospondin-1. Structure-function homology with the cell adhesion molecule CD36 defines a conserved recognition motif. *J Biol Chem*, **273**, 4855-4863.
- Cserepes, J, Szentpetery, Z, Seres, L, Ozvegy-Laczka, C, Langmann, T, Schmitz, G, Glavinas, H, Klein, I, Homolya, L, Varadi, A, Sarkadi, B & Elkind, NB. (2004). Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun*, **320**, 860-867.
- D'Souza, W, Stonik, JA, Murphy, A, Demosky, SJ, Sethi, AA, Moore, XL, Chin-Dusting, J, Remaley, AT & Sviridov, D. (2010). Structure/function relationships of apolipoprotein a-I mimetic peptides: implications for antiatherogenic activities of high-density lipoprotein. *Circ Res*, **107**, 217-227.
- Daugherty, A & Cassis, L. (1999). Chronic angiotensin II infusion promotes atherogenesis in low density lipoprotein receptor $-/-$ mice. *Ann N Y Acad Sci*, **892**, 108-118.
- Daugherty, A, Manning, MW & Cassis, LA. (2000). Angiotensin II promotes atherosclerotic lesions and aneurysms in apolipoprotein E-deficient mice. *J Clin Invest*, **105**, 1605-1612.
- Davidson, MH & Toth, PP. (2007). High-density lipoprotein metabolism: potential therapeutic targets. *Am J Cardiol*, **100**, n32-n40.
- Davignon, J. (2005). Apolipoprotein E and atherosclerosis: beyond lipid effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 267-269.
- Davignon, J & Ganz, P. (2004). Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*, **109**, III27-III32.
- Davis, HR, Jr. & Altmann, SW. (2009). Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochim Biophys Acta*, **1791**, 679-683.
- Dawson, DW, Pearce, SF, Zhong, R, Silverstein, RL, Frazier, WA & Bouck, NP. (1997). CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol*, **138**, 707-717.

- De Bont N., Netea, MG, Demacker, PN, Kullberg, BJ, van der Meer, JW & Stalenhoef, AF. (2000). Apolipoprotein E-deficient mice have an impaired immune response to *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Invest*, **30**, 818-822.
- De Bont N., Netea, MG, Demacker, PN, Verschueren, I, Kullberg, BJ, van Dijk, KW, van der Meer, JW & Stalenhoef, AF. (1999). Apolipoprotein E knock-out mice are highly susceptible to endotoxemia and *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Lipid Res*, **40**, 680-685.
- De Gennaro Colonna, V, Rossoni, G, Bernareggi, M, Muller, EE & Berti, F. (1997a). Cardiac ischemia and impairment of vascular endothelium function in hearts from growth hormone-deficient rats: protection by hexarelin. *Eur J Pharmacol*, **334**, 201-207.
- De Gennaro Colonna, V, Rossoni, G, Bernareggi, M, Muller, EE & Berti, F. (1997b). Hexarelin, a growth hormone-releasing peptide, discloses protectant activity against cardiovascular damage in rats with isolated growth hormone deficiency. *Cardiologia*, **42**, 1165-1172.
- de, LL-M, Connelly, MA, Drazul, D, Klein, SM, Favari, E, Yancey, PG, Williams, DL & Rothblat, GH. (2001). Scavenger receptor class B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL. *J Lipid Res*, **42**, 1969-1978.
- Dean, M, Hamon, Y & Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J Lipid Res*, **42**, 1007-1017.
- Demers, A, McNicoll, N, Febbraio, M, Servant, M, Marleau, S, Silverstein, R & Ong, H. (2004). Identification of the growth hormone-releasing peptide binding site in CD36: a photoaffinity cross-linking study. *Biochem J*, **382**, 417-424.
- Denis, M, Landry, YD & Zha, X. (2008). ATP-binding cassette A1-mediated lipidation of apolipoprotein A-I occurs at the plasma membrane and not in the endocytic compartments. *J Biol Chem*, **283**, 16178-16186.
- Devaraj, S, Hugou, I & Jialal, I. (2001). α -Tocopherol decreases CD36 expression in human monocyte-derived macrophages. *J Lipid Res*, **42**, 521-527.
- Di Bartolo, BA, Nicholls, SJ, Bao, S, Rye, KA, Heather, AK, Barter, PJ & Bursill, C. (2011). The apolipoprotein A-I mimetic peptide ETC-642 exhibits anti-inflammatory properties that are comparable to high density lipoproteins. *Atherosclerosis*, **217**, 395-400.
- Dijkers, A & Tietge, UJ. (2010). Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC. *World J Gastroenterol*, **16**, 5936-5945.
- Doi, T, Kurasawa, M, Higashino, K, Imanishi, T, Mori, T, Naito, M, Takahashi, K, Kawabe, Y, Wada, Y, Matsumoto, A & . (1994). The histidine interruption of an alpha-helical coiled coil allosterically mediates a pH-dependent ligand dissociation from macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem*, **269**, 25598-25604.

- Dressman, J, Kincer, J, Matveev, SV, Guo, L, Greenberg, RN, Guerin, T, Meade, D, Li, XA, Zhu, W, Uittenbogaard, A, Wilson, ME & Smart, EJ. (2003). HIV protease inhibitors promote atherosclerotic lesion formation independent of dyslipidemia by increasing CD36-dependent cholesteryl ester accumulation in macrophages. *J Clin Invest*, **111**, 389-397.
- Drobnik, W, Lindenthal, B, Lieser, B, Ritter, M, Christiansen, WT, Liebisch, G, Giesa, U, Igel, M, Borsukova, H, Buchler, C, Fung-Leung, WP, von, BK & Schmitz, G. (2001). ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) affects total body sterol metabolism. *Gastroenterology*, **120**, 1203-1211.
- Drover, VA, Ajmal, M, Nassir, F, Davidson, NO, Nauli, AM, Sahoo, D, Tso, P & Abumrad, NA. (2005). CD36 deficiency impairs intestinal lipid secretion and clearance of chylomicrons from the blood. *J Clin Invest*, **115**, 1290-1297.
- Drover, VA, Nguyen, DV, Bastie, CC, Darlington, YF, Abumrad, NA, Pessin, JE, London, E, Sahoo, D & Phillips, MC. (2008). CD36 mediates both cellular uptake of very long chain fatty acids and their intestinal absorption in mice. *J Biol Chem*, **283**, 13108-13115.
- Duan, SZ, Usher, MG & Mortensen, RM. (2009). PPARs: the vasculature, inflammation and hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, **18**, 128-133.
- Dunaief, JL, Dentchev, T, Ying, GS & Milam, AH. (2002). The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*, **120**, 1435-1442.
- Duncan, KG, Hosseini, K, Bailey, KR, Yang, H, Lowe, RJ, Matthes, MT, Kane, JP, LaVail, MM, Schwartz, DM & Duncan, JL. (2009). Expression of reverse cholesterol transport proteins ATP-binding cassette A1 (ABCA1) and scavenger receptor BI (SR-BI) in the retina and retinal pigment epithelium. *Br J Ophthalmol*, **93**, 1116-1120.
- Duval, C, Touche, V, Tailleux, A, Fruchart, JC, Fievet, C, Clavey, V, Staels, B & Lestavel, S. (2006). Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem Biophys Res Commun*, **340**, 1259-1263.
- Edgel, KA, McMillen, TS, Wei, H, Pamir, N, Houston, BA, Caldwell, MT, Mai, PO, Oram, JF, Tang, C & Leboeuf, RC. (2012). Obesity and weight loss result in increased adipose tissue ABCG1 expression in db/db mice. *Biochim Biophys Acta*, **1821**, 425-434.
- Ehehalt, R, Fullekrug, J, Pohl, J, Ring, A, Herrmann, T & Stremmel, W. (2006). Translocation of long chain fatty acids across the plasma membrane--lipid rafts and fatty acid transport proteins. *Mol Cell Biochem*, **284**, 135-140.
- El Khoury, JB, Moore, KJ, Means, TK, Leung, J, Terada, K, Toft, M, Freeman, MW & Luster, AD. (2003). CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J Exp Med*, **197**, 1657-1666.

- Elam, M, Lovato, LC & Ginsberg, H. (2011). Role of fibrates in cardiovascular disease prevention, the ACCORD-Lipid perspective. *Curr Opin Lipidol*, **22**, 55-61.
- Endemann, G, Stanton, LW, Madden, KS, Bryant, CM, White, RT & Protter, AA. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, **268**, 11811-11816.
- Enomoto, S, Sata, M, Fukuda, D, Nakamura, K & Nagai, R. (2009). Rosuvastatin prevents endothelial cell death and reduces atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient mice. *Biomed Pharmacother*, **63**, 19-26.
- Fajas, L, Auboeuf, D, Raspe, E, Schoonjans, K, Lefebvre, AM, Saladin, R, Najib, J, Laville, M, Fruchart, JC, Deeb, S, Vidal-Puig, A, Flier, J, Briggs, MR, Staels, B, Vidal, H & Auwerx, J. (1997). The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem*, **272**, 18779-18789.
- Fajas, L, Fruchart, JC & Auwerx, J. (1998). Transcriptional control of adipogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, **10**, 165-173.
- Faulkner, LE, Panagotopoulos, SE, Johnson, JD, Woollett, LA, Hui, DY, Witting, SR, Maiorano, JN & Davidson, WS. (2008). An analysis of the role of a retroendocytosis pathway in ABCA1-mediated cholesterol efflux from macrophages. *J Lipid Res*, **49**, 1322-1332.
- Fazio, S & Linton, MF. (2001). Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front Biosci*, **6**, D515-D525.
- Febbraio, M, Abumrad, NA, Hajjar, DP, Sharma, K, Cheng, W, Pearce, SF & Silverstein, RL. (1999). A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism. *J Biol Chem*, **274**, 19055-19062.
- Febbraio, M, Hajjar, DP & Silverstein, RL. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest*, **108**, 785-791.
- Febbraio, M, Podrez, EA, Smith, JD, Hajjar, DP, Hazen, SL, Hoff, HF, Sharma, K & Silverstein, RL. (2000). Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*, **105**, 1049-1056.
- Febbraio, M & Silverstein, RL. (2007). CD36: implications in cardiovascular disease. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 2012-2030.
- Feige, JN & Auwerx, J. (2007). Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis. *Trends Cell Biol*, **17**, 292-301.

- Feng, J, Han, J, Pearce, SFA, Silverstein, RL, Gotto, AM, Jr., Hajjar, DP & Nicholson, AC. (2000). Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR- γ . *J Lipid Res*, **41**, 688-696.
- Field, FJ, Watt, K & Mathur, SN. (2007). Ezetimibe interferes with cholesterol trafficking from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum in CaCo-2 cells. *J Lipid Res*, **48**, 1735-1745.
- Floyd, ZE & Stephens, JM. (2002). Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPAR γ in adipocytes. *J Biol Chem*, **277**, 4062-4068.
- Fong, LG & Le, D. (1999). The processing of ligands by the class A scavenger receptor is dependent on signal information located in the cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, **274**, 36808-36816.
- Francis, GA, Fayard, E, Picard, F & Auwerx, J. (2003). Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol*, **65**, 261-311.
- Francis, GA, Knopp, RH & Oram, JF. (1995). Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease. *J Clin Invest*, **96**, 78-87.
- Fruchart, JC, Sacks, FM, Hermans, MP, Assmann, G, Brown, WV, Ceska, R, Chapman, MJ, Dodson, PM, Fioretto, P, Ginsberg, HN, Kadowaki, T, Lablanche, JM, Marx, N, Plutzky, J, Reiner, Z, Rosenson, RS, Staels, B, Stock, JK, Sy, R, Wanner, C, Zambon, A & Zimmet, P. (2008). The Residual Risk Reduction Initiative: a call to action to reduce residual vascular risk in dyslipidaemic patient. *Diab Vasc Dis Res*, **5**, 319-335.
- Fuhrman, B, Koren, L, Volkova, N, Keidar, S, Hayek, T & Aviram, M. (2002a). Atorvastatin therapy in hypercholesterolemic patients suppresses cellular uptake of oxidized-LDL by differentiating monocytes. *Atherosclerosis*, **164**, 179-185.
- Fuhrman, B, Volkova, N & Aviram, M. (2002b). Oxidative stress increases the expression of the CD36 scavenger receptor and the cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein in macrophages from atherosclerotic mice: protective role of antioxidants and of paraoxonase. *Atherosclerosis*, **161**, 307-316.
- Funk, CD & FitzGerald, GA. (2007). COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. *J Cardiovasc Pharmacol*, **50**, 470-479.
- Gabison, EE, Hoang-Xuan, T, Mauviel, A & Menashi, S. (2003). [Metalloproteinases and angiogenesis]. *Pathol Biol (Paris)*, **51**, 161-166.
- Gao, D, Ashraf, MZ, Kar, NS, Lin, D, Sayre, LM & Podrez, EA. (2010). Structural basis for the recognition of oxidized phospholipids in oxidized low density lipoproteins by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI. *J Biol Chem*, **285**, 4447-4454.

- Garenc, C, Julien, P & Levy, E. (2010). Oxysterols in biological systems: the gastrointestinal tract, liver, vascular wall and central nervous system. *Free Radic Res*, **44**, 47-73.
- Geissmann, F, Auffray, C, Palframan, R, Wirrig, C, Ciocca, A, Campisi, L, Narni-Mancinelli, E & Lauvau, G. (2008). Blood monocytes: distinct subsets, how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol*, **86**, 398-408.
- Geissmann, F, Jung, S & Littman, DR. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, **19**, 71-82.
- Gelissen, IC, Harris, M, Rye, KA, Quinn, C, Brown, AJ, Kockx, M, Cartland, S, Packianathan, M, Kritharides, L & Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 534-540.
- Genest, J, McPherson, R, Frohlich, J, Anderson, T, Campbell, N, Carpentier, A, Couture, P, Dufour, R, Fodor, G, Francis, GA, Grover, S, Gupta, M, Hegele, RA, Lau, DC, Leiter, L, Lewis, GF, Lonn, E, Mancini, GB, Ng, D, Pearson, GJ, Sniderman, A, Stone, JA & Ur, E. (2009). 2009 Canadian Cardiovascular Society/Canadian guidelines for the diagnosis and treatment of dyslipidemia and prevention of cardiovascular disease in the adult - 2009 recommendations. *Can J Cardiol*, **25**, 567-579.
- Getz, GS & Reardon, CA. (2011). Apolipoprotein A-I and A-I mimetic peptides: a role in atherosclerosis. *J Inflamm Res*, **4**, 83-92.
- Ghiselli, G, Schaefer, EJ, Gascon, P & Breser, HB, Jr. (1981). Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E deficiency. *Science*, **214**, 1239-1241.
- Ghisletti, S, Huang, W, Jepsen, K, Benner, C, Hardiman, G, Rosenfeld, MG & Glass, CK. (2009). Cooperative NCoR/SMRT interactions establish a corepressor-based strategy for integration of inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways. *Genes Dev*, **23**, 681-693.
- Giese, SP, Amit, Z, Yang, YT, Shchepetkina, A & Katouah, H. (2010). Oxidant production, oxLDL uptake, and CD36 levels in human monocyte-derived macrophages are downregulated by the macrophage-generated antioxidant 7,8-dihydroneopterin. *Antioxid Redox Signal*, **13**, 1525-1534.
- Glomset, JA. (1968). The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*, **9**, 155-167.
- Goldstein, JL & Brown, MS. (2009). The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**, 431-438.

- Goodwin, B, Watson, MA, Kim, H, Miao, J, Kemper, JK & Kliewer, SA. (2003). Differential regulation of rat and human CYP7A1 by the nuclear oxysterol receptor liver X receptor-alpha. *Mol Endocrinol*, **17**, 386-394.
- Gordon, S & Taylor, PR. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, **5**, 953-964.
- Goudriaan, JR, Dahlmans, VE, Teusink, B, Ouwens, DM, Febbraio, M, Maassen, JA, Romijn, JA, Havekes, LM & Voshol, PJ. (2003). CD36 deficiency increases insulin sensitivity in muscle, but induces insulin resistance in the liver in mice. *J Lipid Res*, **44**, 2270-2277.
- Goudriaan, JR, den Boer, MA, Rensen, PC, Febbraio, M, Kuipers, F, Romijn, JA, Havekes, LM & Voshol, PJ. (2005). CD36 deficiency in mice impairs lipoprotein lipase-mediated triglyceride clearance. *J Lipid Res*, **46**, 2175-2181.
- Grainger, DJ, Reckless, J & McKilligin, E. (2004). Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol*, **173**, 6366-6375.
- Green, WR & Enger, C. (1993). Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology*, **100**, 1519-1535.
- Greenwalt, DE, Lipsky, RH, Ockenhouse, CF, Ikeda, H, Tandon, NN & Jamieson, GA. (1992). Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *J Am Soc Hematology*, **80**, 1105-1115.
- Grefhorst, A, Elzinga, BM, Voshol, PJ, Plosch, T, Kok, T, Bloks, VW, van der Sluijs, FH, Havekes, LM, Romijn, JA, Verkade, HJ & Kuipers, F. (2002). Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem*, **277**, 34182-34190.
- Griffin, E, Re, A, Hamel, N, Fu, C, Bush, H, McCaffrey, T & Asch, AS. (2001). A link between diabetes and atherosclerosis: glucose regulates expression of CD36 at the level of translation. *Nature Med*, **7**, 840-846.
- Groen, AK, Bloks, VW, Bandsma, RH, Ottenhoff, R, Chimini, G & Kuipers, F. (2001). Hepatobiliary cholesterol transport is not impaired in Abca1-null mice lacking HDL. *J Clin Invest*, **108**, 843-850.
- Gronros, J, Wikstrom, J, Brandt-Eliasson, U, Forsberg, GB, Behrendt, M, Hansson, GI & Gan, LM. (2008). Effects of rosuvastatin on cardiovascular morphology and function in an ApoE-knockout mouse model of atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **295**, H2046-H2053.

- Groot, PH, Pearce, NJ, Yates, JW, Stocker, C, Sauermelch, C, Doe, CP, Willette, RN, Olzinski, A, Peters, T, d'Epagnier, D, Morasco, KO, Krawiec, JA, Webb, CL, Aravindhan, K, Jucker, B, Burgert, M, Ma, C, Marino, JP, Collins, JL, Macphee, CH, Thompson, SK & Jaye, M. (2005). Synthetic LXR agonists increase LDL in CETP species. *J Lipid Res*, **46**, 2182-2191.
- Gruarin, P, Throne, RF, Dorahy, DJ, Burns, GF, Sitia, R & Alessio, M. (2000). CD36 is a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport. *Biochem Biophys Res Commun*, **275**, 446-454.
- Guo, H, Shi, Y, Liu, L, Sun, A, Xu, F & Chi, J. (2009). Rosuvastatin inhibits MMP-2 expression and limits the progression of atherosclerosis in LDLR-deficient mice. *Arch Med Res*, **40**, 345-351.
- Hajri, T & Abumrad, NA. (2002). Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Annu Rev Nutr*, **22**, 383-415.
- Hamblin, M, Chang, L, Fan, Y, Zhang, J & Chen, YE. (2009). PPARs and the cardiovascular system. *Antioxid Redox Signal*, **11**, 1415-1452.
- Han, J, Hajjar, DP, Febbraio, M & Nicholson, AC. (1997). Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem*, **272**, 21654-21659.
- Han, J, Hajjar, DP, Tauras, JM, Feng, J, Gotto, AM, Jr. & Nicholson, AC. (2000). Transforming Growth Factor- β 1(TGF- β 1) and TGF- β 2 Decrease Expression of CD36, the Type B Scavenger Receptor, through Mitogen-activated Protein Kinase phosphorylation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ . *J Biol Chem*, **275**, 1241-1246.
- Han, J, Hajjar, DP, Tauras, JM & Nicholson, AC. (1999). Cellular cholesterol regulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. *J Lipid Res*, **40**, 830-838.
- Han, J, Hajjar, DP, Zhou, X, Gotto, AM, Jr. & Nicholson, AC. (2002). Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ -mediated gene expression. A new mechanism of action for high density lipoprotein. *J Biol Chem*, **277**, 23582-23586.
- Han, J, Parsons, M, Zhou, X, Nicholson, AC, Gotto, AM, Jr. & Hajjar, DP. (2004). Functional interplay between the macrophage scavenger receptor class B type I and pitavastatin (NK-104). *Circulation*, **110**, 3472-3479.
- Han, S & Sidell, N. (2002). Peroxisome-proliferator-activated-receptor gamma (PPAR γ) independent induction of CD36 in THP-1 monocytes by retinoic acid. *Immunology*, **106**, 53-59.

- Harb, D, Bujold, K, Febbraio, M, Sirois, MG, Ong, H & Marleau, S. (2009). The role of the scavenger receptor CD36 in regulating mononuclear phagocyte trafficking to atherosclerotic lesions and vascular inflammation. *Cardiovasc Res*, **83**, 42-51.
- Hassan, HH, Denis, M, Lee, DY, Iatan, I, Nyholt, D, Ruel, I, Krimbou, L & Genest, J. (2007). Identification of an ABCA1-dependent phospholipid-rich plasma membrane apolipoprotein A-I binding site for nascent HDL formation: implications for current models of HDL biogenesis. *J Lipid Res*, **48**, 2428-2442.
- Hawkes, M, Li, X, Crockett, M, Diassiti, A, Finney, C, Min-Oo, G, Liles, WC, Liu, J & Kain, KC. (2010). CD36 deficiency attenuates experimental mycobacterial infection. *BMC Infect Dis*, **10**, 299.
- Higashi, Y, Noma, K, Yoshizumi, M & Kihara, Y. (2009). Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*, **73**, 411-418.
- Hoebe, K, Georgel, P, Rutschmann, S, Du, X, Mudd, S, Crozat, K, Sovath, S, Shamel, L, Hartung, T, Zahringer, U & Beutler, B. (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*, **433**, 523-527.
- Hoekstra, M, van Berkel, TJ & Van, EM. (2010). Scavenger receptor BI: a multi-purpose player in cholesterol and steroid metabolism. *World J Gastroenterol*, **16**, 5916-5924.
- Home, PD, Pocock, SJ, Beck-Nielsen, H, Curtis, PS, Gomis, R, Hanefeld, M, Jones, NP, Komajda, M & McMurray, JJ. (2009). Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. *Lancet*, **373**, 2125-2135.
- Hoosdally, SJ, Andress, EJ, Wooding, C, Martin, CA & Linton, KJ. (2009). The Human Scavenger Receptor CD36: glycosylation status and its role in trafficking and function. *J Biol Chem*, **284**, 16277-16288.
- Hu, E, Kim, JB, Sarraf, P & Spiegelman, BM. (1996). Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science*, **274**, 2100-2103.
- Hu, J, Roy, SK, Shapiro, PS, Rodig, SR, Reddy, SP, Plataniias, LC, Schreiber, RD & Kalvakolanu, DV. (2001). ERK1 and ERK2 activate CCAAAT/enhancer-binding protein-beta-dependent gene transcription in response to interferon-gamma. *J Biol Chem*, **276**, 287-297.
- Huang, JT, Welch, JS, Ricote, M, Binder, CJ, Willson, TM, Kelly, C, Witztum, JL, Funk, CD, Conrad, D & Glass, CK. (1999). Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature*, **400**, 378-382.

- Huang, ZH, Lin, C-Y, Oram, JF & Mazzone, T. (2001). Sterol efflux mediated by endogenous macrophage ApoE expression is independent of ABCA1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 2019-2025.
- Huh, HY, Lo, SK, Yesner, LM & Silverstein, RL. (1995). CD36 induction on human monocytes upon adhesion to tumor necrosis factor-activated endothelial cells. *J Biol Chem*, **270**, 6267-6271.
- Huh, HY, Pearce, SF, Yesner, LM, Schindler, JL & Silverstein, RL. (1996). Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation. *Blood*, **87**, 2020-2028.
- Hui, DY. (2003). HIV protease inhibitors and atherosclerosis. *J Clin Invest*, **111**, 317-318.
- Hui, DY, Labonte, ED & Howles, PN. (2008). Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. III. Intestinal transporters and cholesterol absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **294**, G839-G843.
- Hunt, JA & Lu, Z. (2009). Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibitors. *Curr Top Med Chem*, **9**, 419-427.
- Huo, Y & Xia, L. (2009). P-selectin glycoprotein ligand-1 plays a crucial role in the selective recruitment of leukocytes into the atherosclerotic arterial wall. *Trends Cardiovasc Med*, **19**, 140-145.
- Ibrahimi, A, Bonen, A, Blinn, WD, Hajri, T, Li, X, Zhong, K, Cameron, R & Abumrad, NA. (1999). Muscle-specific overexpression of FAT/CD36 enhances fatty acid oxidation by contracting muscle, reduces plasma triglycerides and fatty acids, and increases plasma glucose and insulin. *J Biol Chem*, **274**, 26761-26766.
- Inoue, H, Tanabe, T & Umesono, K. (2000). Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem*, **275**, 28028-28032.
- Inoue, M, Ohtake, T, Motomura, W, Takahashi, N, Hosoki, Y, Miyoshi, S, Suzuki, Y, Saito, H, Kohgo, Y & Okumura, T. (2005). Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **336**, 215-222.
- Iqbal, J & Hussain, MM. (2009). Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **296**, E1183-E1194.
- Ishibashi, S, Goldstein, JL, Brown, MS, Herz, J & Burns, DK. (1994). Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest*, **93**, 1885-1893.
- Issandou, M. (2006). Pharmacological regulation of low density lipoprotein receptor expression: current status and future developments. *Pharmacol Ther*, **111**, 424-433.

- Itabe, H. (2009). Oxidative modification of LDL: its pathological role in atherosclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol*, **37**, 4-11.
- Janabi, M, Yamashita, S, Hirano, K, Sakai, N, Hiraoka, H, Matsumoto, K, Zhang, Z, Nozaki, S & Matsuzawa, Y. (2000). Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1953-1960.
- Jandeleit-Dahm, KA, Calkin, A, Tikellis, C & Thomas, M. (2009). Direct antiatherosclerotic effects of PPAR agonists. *Curr Opin Lipidol*, **20**, 24-29.
- Janowski, BA, Grogan, MJ, Jones, SA, Wisely, GB, Kliewer, SA, Corey, EJ & Mangelsdorf, DJ. (1999). Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 266-271.
- Janowski, BA, Willy, PJ, Devi, TR, Falck, JR & Mangelsdorf, DJ. (1996). An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature*, **383**, 728-731.
- Jeon, H & Blacklow, SC. (2005). Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem*, **74**, 535-562.
- Jeppesen, J, Albers, PH, Rose, AJ, Birk, JB, Schjerling, P, Dzamko, N, Steinberg, GR & Kiens, B. (2011). Contraction-induced skeletal muscle FAT/CD36 trafficking and FA uptake is AMPK independent. *J Lipid Res*, **52**, 699-711.
- Jessup, W & Kritharides, L. (2000). Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Curr Opin Lipidol*, **11**, 473-481.
- Ji, Y, Liu, J, Wang, Z, Liu, N & Gou, W. (2009a). PPARgamma agonist, rosiglitazone, regulates angiotensin II-induced vascular inflammation through the TLR4-dependent signaling pathway. *Lab Invest*, **89**, 887-902.
- Ji, YY, Liu, JT, Liu, N, Wang, ZD & Liu, CH. (2009b). PPARalpha activator fenofibrate modulates angiotensin II-induced inflammatory responses in vascular smooth muscle cells via the TLR4-dependent signaling pathway. *Biochem Pharmacol*, **78**, 1186-1197.
- Jia, L, Betters, JL & Yu, L. (2011). Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport. *Annu Rev Physiol*, **73**, 239-259.
- Jiang, C, Ting, AT & Seed, B. (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, **391**, 82-86.
- Jimenez, B, Volpert, OV, Crawford, SE, Febbraio, M, Silverstein, RL & Bouck, N. (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med*, **6**, 41-48.

- Joseph, SB, Castrillo, A, Laffitte, BA, Mangelsdorf, DJ & Tontonoz, P. (2003). Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med*, **9**, 213-219.
- Joseph, SB, Laffitte, BA, Patel, PH, Watson, MA, Matsukuma, KE, Walczak, R, Collins, JL, Osborne, TF & Tontonoz, P. (2002a). Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem*, **277**, 11019-11025.
- Joseph, SB, McKilligin, E, Pei, L, Watson, MA, Collins, AR, Laffitte, BA, Chen, M, Noh, G, Goodman, J, Hagger, GN, Tran, J, Tippin, TK, Wang, X, Lusis, AJ, Hsueh, WA, Law, RE, Collins, JL, Willson, TM & Tontonoz, P. (2002b). Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7604-7609.
- Kalaany, NY & Mangelsdorf, DJ. (2006). LXRS and FXR: the yin and yang of cholesterol and fat metabolism. *Annu Rev Physiol*, **68**, 159-191.
- Kamisako, T & Ogawa, H. (2004). Effects of pravastatin and bezafibrate on biliary lipid excretion and hepatic expression of Abcg5 and Abcg8 in the rat. *J Gastroenterol Hepatol*, **19**, 879-883.
- Kar, NS, Ashraf, MZ, Valiyaveetil, M & Podrez, EA. (2008). Mapping and characterization of the binding site for specific oxidized phospholipids and oxidized low density lipoprotein of scavenger receptor CD36. *J Biol Chem*, **283**, 8765-8771.
- Karin, M. (1995). The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, **270**, 16483-16486.
- Kennedy, MA, Barrera, GC, Nakamura, K, Baldan, A, Tarr, P, Fishbein, MC, Frank, J, Francone, OL & Edwards, PA. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab*, **1**, 121-131.
- Khera, AV, Cuchel, M, Llera-Moya, M, Rodrigues, A, Burke, MF, Jafri, K, French, BC, Phillips, JA, Mucksavage, ML, Wilensky, RL, Mohler, ER, Rothblat, GH & Rader, DJ. (2011). Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med*, **364**, 127-135.
- Kim, E, Tolhurst, AT, Qin, LY, Chen, XY, Febbraio, M & Cho, S. (2008). CD36/fatty acid translocase, an inflammatory mediator, is involved in hyperlipidemia-induced exacerbation in ischemic brain injury. *J Neurosci*, **28**, 4661-4670.
- Kindel, T, Lee, DM & Tso, P. (2010). The mechanism of the formation and secretion of chylomicrons. *Atheroscler Suppl*, **11**, 11-16.
- Kiss, RS, Maric, J & Marcel, YL. (2005). Lipid efflux in human and mouse macrophagic cells: evidence for differential regulation of phospholipid and cholesterol efflux. *J Lipid Res*, **46**, 1877-1887.

Kleemann, R, Princen, HM, Emeis, JJ, Jukema, JW, Fontijn, RD, Horrevoets, AJ, Kooistra, T & Havekes, LM. (2003). Rosuvastatin reduces atherosclerosis development beyond and independent of its plasma cholesterol-lowering effect in APOE*3-Leiden transgenic mice: evidence for antiinflammatory effects of rosuvastatin. *Circulation*, **108**, 1368-1374.

Klerkx, AH, El, HK, van der Steeg, WA, Boekholdt, SM, Stroes, ES, Kastelein, JJ & Kuivenhoven, JA. (2006). Cholesteryl ester transfer protein (CETP) inhibition beyond raising high-density lipoprotein cholesterol levels: pathways by which modulation of CETP activity may alter atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 706-715.

Kliwer, SA, Sundseth, SS, Jones, SA, Brown, PJ, Wisely, GB, Koble, CS, Devchand, P, Wahli, W, Willson, TM, Lenhard, JM & Lehmann, JM. (1997). Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4318-4323.

Koonen, DP, Jacobs, RL, Febbraio, M, Young, ME, Soltys, CL, Ong, H, Vance, DE & Dyck, JR. (2007). Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes*, **56**, 2863-2871.

Kozarsky, KF, Donahee, MH, Rigotti, A, Iqbal, SN, Edelman, ER & Krieger, M. (1997). Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*, **387**, 414-417.

Kratzer, A, Buchebner, M, Pfeifer, T, Becker, TM, Uray, G, Miyazaki, M, Miyazaki-Anzai, S, Ebner, B, Chandak, PG, Kadam, RS, Calayir, E, Rathke, N, Ahammer, H, Radovic, B, Trauner, M, Hoefler, G, Kompella, UB, Fauler, G, Levi, M, Levak-Frank, S, Kostner, GM & Kratky, D. (2009). Synthetic LXR agonist attenuates plaque formation in apoE^{-/-} mice without inducing liver steatosis and hypertriglyceridemia. *J Lipid Res*, **50**, 312-326.

Kruit, JK, Plosch, T, Havinga, R, Boverhof, R, Groot, PH, Groen, AK & Kuipers, F. (2005). Increased fecal neutral sterol loss upon liver X receptor activation is independent of biliary sterol secretion in mice. *Gastroenterology*, **128**, 147-156.

Kruit, JK, Wijesekara, N, Westwell-Roper, C, Vanmierlo, T, de, HW, Bhattacharjee, A, Tang, R, Wellington, CL, Lutjohann, D, Johnson, JD, Brunham, LR, Verchere, CB & Hayden, MR. (2012). Loss of both ABCA1 and ABCG1 results in increased disturbances in islet sterol homeostasis, inflammation, and impaired beta-cell function. *Diabetes*, **61**, 659-664.

Kruth, HS, Huang, W, Ishii, I & Zhang, WY. (2002). Macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J Biol Chem*, **277**, 34573-34580.

Kruth, HS, Jones, NL, Huang, W, Zhao, B, Ishii, I, Chang, J, Combs, CA, Malide, D & Zhang, WY. (2005). Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J Biol Chem*, **280**, 2352-2360.

- Kunjathoor, VV, Febbraio, M, Podrez, EA, Moore, KJ, Andersson, L, Koehn, S, Rhee, JS, Silverstein, R, Hoff, HF & Freeman, MW. (2002). Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem*, **277**, 49982-49988.
- Kunz, A, Abe, T, Hochrainer, K, Shimamura, M, Anrather, J, Racchumi, G, Zhou, P & Iadecola, C. (2008). Nuclear factor-kappaB activation and postischemic inflammation are suppressed in CD36-null mice after middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci*, **28**, 1649-1658.
- Laffitte, BA, Joseph, SB, Chen, M, Castrillo, A, Repa, J, Wilpitz, D, Mangelsdorf, D & Tontonoz, P. (2003). The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. *Mol Cell Biol*, **23**, 2182-2191.
- Laffitte, BA, Repa, JJ, Joseph, SB, Wilpitz, DC, Kast, HR, Mangelsdorf, DJ & Tontonoz, P. (2001). LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 507-512.
- Lakkaraju, A, Finnemann, SC & Rodriguez-Boulan, E. (2007). The lipofuscin fluorophore A2E perturbs cholesterol metabolism in retinal pigment epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 11026-11031.
- Langmann, T, Liebisch, G, Moehle, C, Schifferer, R, Dayoub, R, Heiduczek, S, Grandl, M, Dada, A & Schmitz, G. (2005). Gene expression profiling identifies retinoids as potent inducers of macrophage lipid efflux. *Biochim Biophys Acta*, **1740**, 155-161.
- Laskowitz, DT, Lee, DM, Schmechel, D & Staats, HF. (2000). Altered immune responses in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res*, **41**, 613-620.
- Last, AR, Ference, JD & Falleroni, J. (2011). Pharmacologic treatment of hyperlipidemia. *Am Fam Physician*, **84**, 551-558.
- Lawn, RM, Wade, DP, Garvin, MR, Wang, X, Schwartz, K, Porter, JG, Seilhamer, JJ, Vaughan, AM & Oram, JF. (1999). The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest*, **104**, R25-R31.
- Lee, MH, Lu, K, Hazard, S, Yu, H, Shulenin, S, Hidaka, H, Kojima, H, Allikmets, R, Sakuma, N, Pegoraro, R, Srivastava, AK, Salen, G, Dean, M & Patel, SB. (2001). Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet*, **27**, 79-83.
- Lehmann, JM, Kliewer, SA, Moore, LB, Smith-Oliver, TA, Oliver, BB, Su, JL, Sundseth, SS, Winegar, DA, Blanchard, DE, Spencer, TA & Willson, TM. (1997). Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem*, **272**, 3137-3140.

- Leon, S, Volkova, N, Littlefield, MJ & Reiss, AB. (2011). Atherogenic properties of coxibs in human monocytes/macrophages.
- Levy, E, Spahis, S, Sinnett, D, Peretti, N, Maupas-Schwalm, F, Delvin, E, Lambert, M & Lavoie, MA. (2007). Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond. *Curr Opin Lipidol*, **18**, 310-318.
- Li, AC, Binder, CJ, Gutierrez, A, Brown, KK, Plotkin, CR, Pattison, JW, Valledor, AF, Davis, RA, Willson, TM, Witztum, JL, Palinski, W & Glass, CK. (2004). Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest*, **114**, 1564-1576.
- Li, AC, Brown, KK, Silvestre, MJ, Willson, TM, Palinski, W & Glass, CK. (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*, **106**, 523-531.
- Li, AC & Glass, CK. (2002). The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med*, **8**, 1235-1242.
- Li, AC & Glass, CK. (2004). PPAR- and LXR-dependent pathways controlling lipid metabolism and the development of atherosclerosis. *J Lipid Res*, **45**, 2161-2173.
- Li, CM, Chung, BH, Presley, JB, Malek, G, Zhang, X, Dashti, N, Li, L, Chen, J, Bradley, K, Kruth, HS & Curcio, CA. (2005). Lipoprotein-like particles and cholesteryl esters in human Bruch's membrane: initial characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **46**, 2576-2586.
- Libby, P & Simon, DI. (2001). Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation*, **103**, 1718-1720.
- Lincoff, AM, Wolski, K, Nicholls, SJ & Nissen, SE. (2007). Pioglitazone and risk of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of randomized trials. *JAMA*, **298**, 1180-1188.
- Linsel-Nitschke, P & Tall, AR. (2005). HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*, **4**, 193-205.
- Linton, MF & Fazio, S. (2001). Class A scavenger receptors, macrophages, and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, **12**, 489-495.
- Lipsky, RH, Eckert, DM, Tang, Y & Ockenhouse, CF. (1997). The carboxyl-terminal cytoplasmic domain of CD36 is required for oxidized low-density lipoprotein modulation of NF-kappaB activity by tumor necrosis factor-alpha. *Recept Signal Transduct*, **7**, 1-11.
- Liu, L, Bortnick, AE, Nickel, M, Dhanasekaran, P, Subbaiah, PV, Lund-Katz, S, Rothblat, GH & Phillips, MC. (2003). Effects of apolipoprotein A-I on ATP-binding cassette

transporter A1-mediated efflux of macrophage phospholipid and cholesterol: formation of nascent high density lipoprotein particles. *J Biol Chem*, **278**, 42976-42984.

Lobo, MV, Huerta, L, Ruiz-Velasco, N, Teixeira, E, de la Cueva, P, Celdran, A, Martin-Hidalgo, A, Vega, MA & Bragado, R. (2001). 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*, **49**, 1253-1260.

Lorenzi, I, von, EA, Radosavljevic, S & Rohrer, L. (2008). Lipidation of apolipoprotein A-I by ATP-binding cassette transporter (ABC) A1 generates an interaction partner for ABCG1 but not for scavenger receptor BI. *Biochim Biophys Acta*, **1781**, 306-313.

Luiken, JJ, Coort, SL, Willems, J, Coumans, WA, Bonen, A, Van Der Vusse, GJ & Glatz, JF. (2003). Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes*, **52**, 1627-1634.

Luiken, JJ, Dyck, DJ, Han, XX, Tandon, NN, Arumugam, Y, Glatz, JF & Bonen, A. (2002). Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **282**, E491-E495.

Lukasova, M, Hanson, J, Tunaru, S & Offermanns, S. (2011a). Nicotinic acid (niacin): new lipid-independent mechanisms of action and therapeutic potentials. *Trends Pharmacol Sci*.

Lukasova, M, Malaval, C, Gille, A, Kero, J & Offermanns, S. (2011b). Nicotinic acid inhibits progression of atherosclerosis in mice through its receptor GPR109A expressed by immune cells. *J Clin Invest*, **121**, 1163-1173.

Luo, DX, Cao, DL, Xiong, Y, Peng, XH & Liao, DF. (2010). A novel model of cholesterol efflux from lipid-loaded cells. *Acta Pharmacol Sin*, **31**, 1243-1257.

Luscher, TF & Barton, M. (1997). Biology of the endothelium. *Clin Cardiol*, **20**, II-10.

Lusis, AJ. (2000). Atherosclerosis. *Nature*, **407**, 233-241.

Lusis, AJ, Fogelman, AM & Fonarow, GC. (2004). Genetic basis of atherosclerosis: part I: new genes and pathways. *Circulation*, **110**, 1868-1873.

Mach, F, Schonbeck, U, Sukhova, GK, Bourcier, T, Bonnefoy, JY, Pober, JS & Libby, P. (1997). Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1931-1936.

Maggi, LB, Jr., Sadeghi, H, Weigand, C, Scarim, AL, Heitmeier, MR & Corbett, JA. (2000). Anti-inflammatory actions of 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 and

troglitazone: evidence for heat shock-dependent and -independent inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression. *Diabetes*, **49**, 346-355.

Mak, PA, Laffitte, BA, Desrumaux, C, Joseph, SB, Curtiss, LK, Mangelsdorf, DJ, Tontonoz, P & Edwards, PA. (2002). Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem*, **277**, 31900-31908.

Malaud, E, Hourton, D, Giroux, LM, Ninio, E, Buckland, R & McGregor, JL. (2002). 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*, **364**, 507-515.

Malek, G, Li, CM, Guidry, C, Medeiros, NE & Curcio, CA. (2003). Apolipoprotein B in cholesterol-containing drusen and basal deposits of human eyes with age-related maculopathy. *Am J Pathol*, **162**, 413-425.

Mandosi, E, Fallarino, M, Gatti, A, Carnovale, A, Rossetti, M, Lococo, E, Buchetti, B, Filetti, S, Lenti, L & Morano, S. (2010). Atorvastatin downregulates monocyte CD36 expression, nuclear NFkappaB and TNFalpha levels in type 2 diabetes. *J Atheroscler Thromb*, **17**, 539-545.

Martin-Fuentes, P, Civeira, F, Recalde, D, Garcia-Otin, AL, Jarauta, E, Marzo, I & Cenerro, A. (2007). Individual variation of scavenger receptor expression in human macrophages with oxidized low-density lipoprotein is associated with a differential inflammatory response. *J Immunol*, **179**, 3242-3248.

Matsumoto, K, Hirano, K, Nozaki, S, Takamoto, A, Nishida, M, Nakagawa-Toyama, Y, Janabi, MY, Ohya, T, Yamashita, S & Matsuzawa, Y. (2000). Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype in vitro, and its implication in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1027-1032.

Maxeiner, H, Husemann, J, Thomas, CA, Loike, JD, El, KJ & Silverstein, SC. (1998). Complementary roles for scavenger receptor A and CD36 of human monocyte-derived macrophages in adhesion to surfaces coated with oxidized low-density lipoproteins and in secretion of H₂O₂. *J Exp Med*, **188**, 2257-2265.

Mazzone, T & Reardon, C. (1994). Expression of heterologous human apolipoprotein E by J774 macrophages enhances cholesterol efflux to HDL3. *J Lipid Res*, **35**, 1345-1353.

McDermott-Roe, C, Martin, J, Collot-Teixeira, S & McGregor, JL. (2008). CD36 N-terminal cytoplasmic domain is not required for the internalization of oxidized low-density lipoprotein. *Biosci Rep*, **28**, 145-151.

- McGilvray, ID, Serghides, L, Kapus, A, Rotstein, OD & Kain, KC. (2000). Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood*, **96**, 3231-3240.
- McLaren, JE, Michael, DR, Salter, RC, Ashlin, TG, Calder, CJ, Miller, AM, Liew, FY & Ramji, DP. (2010). IL-33 reduces macrophage foam cell formation. *J Immunol*, **185**, 1222-1229.
- Means, TK, Mylonakis, E, Tampakakis, E, Colvin, RA, Seung, E, Puckett, L, Tai, MF, Stewart, CR, Pukkila-Worley, R, Hickman, SE, Moore, KJ, Calderwood, SB, Hacohen, N, Luster, AD & El, KJ. (2009). Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *J Exp Med*, **206**, 637-653.
- Medeiros, LA, Khan, T, El Khoury, JB, Pham, CL, Hatters, DM, Howlett, GJ, Lopez, R, O'Brien, KD & Moore, KJ. (2004). Fibrillar amyloid protein present in atheroma activates CD36 signal transduction. *J Biol Chem*, **279**, 10643-10648.
- Mencarelli, A, Cipriani, S, Renga, B, Francisci, D, Palladino, G, Distrutti, E, Baldelli, F & Fiorucci, S. (2010). The bile acid sensor FXR protects against dyslipidemia and aortic plaques development induced by the HIV protease inhibitor ritonavir in mice. *PLoS One*, **5**, e13238.
- Mencarelli, A, Renga, B, Distrutti, E & Fiorucci, S. (2009). Antiatherosclerotic effect of farnesoid X receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **296**, H272-H281.
- Miki, S, Horikawa, K, Nishizumi, H, Suemura, M, Sato, B, Yamamoto, M, Takatsu, K, Yamamoto, T & Miki, Y. (2001). Reduction of atherosclerosis despite hypercholesterolemia in lyn-deficient mice fed a high-fat diet. *Genes Cells*, **6**, 37-42.
- Millar, JS, Duffy, D, Gadi, R, Bloedon, LT, Dunbar, RL, Wolfe, ML, Movva, R, Shah, A, Fuki, IV, McCoy, M, Harris, CJ, Wang, MD, Howey, DC & Rader, DJ. (2009). Potent and selective PPAR-alpha agonist LY518674 upregulates both ApoA-I production and catabolism in human subjects with the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**, 140-146.
- Miller, YI, Choi, SH, Fang, L & Tsimikas, S. (2010). Lipoprotein modification and macrophage uptake: role of pathologic cholesterol transport in atherogenesis. *Subcell Biochem*, **51**, 229-251.
- Monte, MJ, Marin, JJ, Antelo, A & Vazquez-Tato, J. (2009). Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology. *World J Gastroenterol*, **15**, 804-816.
- Moore, KJ, El, KJ, Medeiros, LA, Terada, K, Geula, C, Luster, AD & Freeman, MW. (2002). A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J Biol Chem*, **277**, 47373-47379.

- Moore, KJ & Freeman, MW. (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 1702-1711.
- Moore, KJ, Rosen, ED, Fitzgerald, ML, Randow, F, Andersson, LP, Altshuler, D, Milstone, DS, Mortensen, RM, Spiegelman, BM & Freeman, MW. (2001). The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med*, **7**, 41-47.
- Muller, H, Deckers, K & Eckel, J. (2002). 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*, **293**, 665-669.
- Mulligan, JD, Flowers, MT, Tebon, A, Bitgood, JJ, Wellington, C, Hayden, MR & Attie, AD. (2003). ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens. *J Biol Chem*, **278**, 13356-13366.
- Munteanu, A, Ricciarelli, R & Zingg, JM. (2004). HIV protease inhibitors-induced atherosclerosis: prevention by alpha-tocopherol. *IUBMB Life*, **56**, 629-631.
- Munteanu, A, Zingg, JM, Ricciarelli, R & Azzi, A. (2005). CD36 overexpression in ritonavir-treated THP-1 cells is reversed by alpha-tocopherol. *Free Radic Biol Med*, **38**, 1047-1056.
- Murphy, AJ, Akhtari, M, Tolani, S, Pagler, T, Bijl, N, Kuo, CL, Wang, M, Sanson, M, Abramowicz, S, Welch, C, Bochem, AE, Kuivenhoven, JA, Yvan-Charvet, L & Tall, AR. (2011). ApoE regulates hematopoietic stem cell proliferation, monocytosis, and monocyte accumulation in atherosclerotic lesions in mice. *J Clin Invest*, **121**, 4138-4149.
- Mwaikambo, BR, Sennlaub, F, Ong, H, Chemtob, S & Hardy, P. (2008a). Genetic ablation of CD36 induces age-related corneal neovascularization. *Cornea*, **27**, 1037-1041.
- Mwaikambo, BR, Yang, C, Ong, H, Chemtob, S & Hardy, P. (2008b). Emerging roles for the CD36 scavenger receptor as a potential therapeutic target for corneal neovascularization. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, **8**, 255-272.
- Naghavi, M, Libby, P, Falk, E, Casscells, SW, Litovsky, S, Rumberger, J, Badimon, JJ, Stefanadis, C, Moreno, P, Pasterkamp, G, Fayad, Z, Stone, PH, Waxman, S, Raggi, P, Madjid, M, Zarrabi, A, Burke, A, Yuan, C, Fitzgerald, PJ, Siscovick, DS, de Korte, CL, Aikawa, M, Juhani Airaksinen, KE, Assmann, G, Becker, CR, Chesebro, JH, Farb, A, Galis, ZS, Jackson, C, Jang, IK, Koenig, W, Lodder, RA, March, K, Demirovic, J, Navab, M, Priori, SG, Rekhter, MD, Bahr, R, Grundy, SM, Mehran, R, Colombo, A, Boerwinkle, E, Ballantyne, C, Insull, W, Jr., Schwartz, RS, Vogel, R, Serruys, PW, Hansson, GK, Faxon, DP, Kaul, S, Drexler, H, Greenland, P, Muller, JE, Virmani, R, Ridker, PM, Zipes, DP, Shah, PK & Willerson, JT. (2003). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation*, **108**, 1664-1672.

- Nagy, L, Tontonoz, P, Alvarez, JG, Chen, H & Evans, RM. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*, **93**, 229-240.
- Naik, SU, Wang, X, Da Silva, JS, Jaye, M, Macphee, CH, Reilly, MP, Billheimer, JT, Rothblat, GH & Rader, DJ. (2006). Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. *Circulation*, **113**, 90-97.
- Nakashima, Y, Plump, AS, Raines, EW, Breslow, JL & Ross, R. (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*, **14**, 133-140.
- Nakashima, Y, Raines, EW, Plump, AS, Breslow, JL & Ross, R. (1998). Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 842-851.
- Nakata, A, Nakagawa, Y, Nishida, M, Nozaki, S, Miyagawa, J, Nakagawa, T, Tamura, R, Matsumoto, K, Kameda-Takemura, K, Yamashita, S & Matsuzawa, Y. (1999). CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipid-laden macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**, 1333-1339.
- Nassir, F, Wilson, B, Han, X, Gross, RW & Abumrad, NA. (2007). CD36 is important for fatty acid and cholesterol uptake by the proximal but not distal intestine. *J Biol Chem*, **282**, 19493-19501.
- Nauli, AM, Nassir, F, Zheng, S, Yang, Q, Lo, CM, Vonlehmden, SB, Lee, D, Jandacek, RJ, Abumrad, NA & Tso, P. (2006). CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology*, **131**, 1197-1207.
- Navab, M, Anantharamaiah, GM, Hama, S, Hough, G, Reddy, ST, Frank, JS, Garber, DW, Handattu, S & Fogelman, AM. (2005). D-4F and statins synergize to render HDL antiinflammatory in mice and monkeys and cause lesion regression in old apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 1426-1432.
- Navab, M, Shechter, I, Anantharamaiah, GM, Reddy, ST, Van Lenten, BJ & Fogelman, AM. (2010). Structure and function of HDL mimetics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **30**, 164-168.
- Navazo, MD, Daviet, L, Savill, J, Ren, Y, Leung, LL & McGregor, JL. (1996). Identification of a domain (155-183) on CD36 implicated in the phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J Biol Chem*, **271**, 15381-15385.
- Neufeld, EB, Stonik, JA, Demosky, SJ, Jr., Knapper, CL, Combs, CA, Cooney, A, Comly, M, Dwyer, N, Blanchette-Mackie, J, Remaley, AT, Santamarina-Fojo, S & Brewer, HB, Jr.

(2004). The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease. *J Biol Chem*, **279**, 15571-15578.

Newbold, CI, Craig, AG, Kyes, S, Berendt, AR, Snow, RW, Peshu, N & Marsh, K. (1997). PfEMP1, polymorphism and pathogenesis. *Ann Trop Med Parasitol*, **91**, 551-557.

Nguyen, DV, Drover, VA, Knopfel, M, Dhanasekaran, P, Hauser, H & Phillips, MC. (2009). Influence of class B scavenger receptors on cholesterol flux across the brush border membrane and intestinal absorption. *J Lipid Res*, **50**, 2235-2244.

Nicholls, SJ, Tuzcu, EM, Brennan, DM, Tardif, JC & Nissen, SE. (2008). Cholesteryl ester transfer protein inhibition, high-density lipoprotein raising, and progression of coronary atherosclerosis: insights from ILLUSTRATE (Investigation of Lipid Level Management Using Coronary Ultrasound to Assess Reduction of Atherosclerosis by CETP Inhibition and HDL Elevation). *Circulation*, **118**, 2506-2514.

Nicholson, AC, Febbraio, M, Han, J, Silverstein, RL & Hajjar, DP. (2000). CD36 in atherosclerosis. The role of a class B macrophage scavenger receptor. *Ann N Y Acad Sci*, **902**, 128-131.

Nicholson, AC, Frieda, S, Pearce, A & Silverstein, RL. (1995). 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*, **15**, 269-275.

Nieland, TJ, Penman, M, Dori, L, Krieger, M & Kirchhausen, T. (2002). Discovery of chemical inhibitors of the selective transfer of lipids mediated by the HDL receptor SR-BI. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 15422-15427.

Nishimoto, T, Pellizzon, MA, Aihara, M, Stylianou, IM, Billheimer, JT, Rothblat, G & Rader, DJ. (2009). Fish oil promotes macrophage reverse cholesterol transport in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**, 1502-1508.

Nissen, SE, Nicholls, SJ, Wolski, K, Howey, DC, McErlean, E, Wang, MD, Gomez, EV & Russo, JM. (2007a). Effects of a potent and selective PPAR-alpha agonist in patients with atherogenic dyslipidemia or hypercholesterolemia: two randomized controlled trials. *JAMA*, **297**, 1362-1373.

Nissen, SE, Tardif, JC, Nicholls, SJ, Revkin, JH, Shear, CL, Duggan, WT, Ruzyllo, W, Bachinsky, WB, Lasala, GP & Tuzcu, EM. (2007b). Effect of torcetrapib on the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med*, **356**, 1304-1316.

Nissen, SE, Tsunoda, T, Tuzcu, EM, Schoenhagen, P, Cooper, CJ, Yasin, M, Eaton, GM, Lauer, MA, Sheldon, WS, Grines, CL, Halpern, S, Crowe, T, Blankenship, JC & Kerensky, R. (2003). Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA*, **290**, 2292-2300.

- Nissen, SE & Wolski, K. (2010). Rosiglitazone revisited: an updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med*, **170**, 1191-1201.
- Nozaki, S, Kashiwagi, H, Yamashita, S, Nakagawa, T, Kostner, B, Tomiyama, Y, Nakata, A, Ishigami, M, Miyagawa, J, Kameda-Takemura, K & . (1995). Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects. *J Clin Invest*, **96**, 1859-1865.
- Ockenhouse, CF, Klotz, FW, Tandon, NN & Jamieson, GA. (1991). Sequestrin, a CD36 recognition protein on Plasmodium falciparum malaria-infected erythrocytes identified by anti-idiotypic antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3175-3179.
- Oh, J, Weng, S, Felton, SK, Bhandare, S, Riek, A, Butler, B, Proctor, BM, Petty, M, Chen, Z, Schechtman, KB, Bernal-Mizrachi, L & Bernal-Mizrachi, C. (2009). 1,25(OH)₂ vitamin d inhibits foam cell formation and suppresses macrophage cholesterol uptake in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, **120**, 687-698.
- Ohama, T, Hirano, K, Zhang, Z, Aoki, R, Tsujii, K, Nakagawa-Toyama, Y, Tsukamoto, K, Ikegami, C, Matsuyama, A, Ishigami, M, Sakai, N, Hiraoka, H, Ueda, K, Yamashita, S & Matsuzawa, Y. (2002). Dominant expression of ATP-binding cassette transporter-1 on basolateral surface of Caco-2 cells stimulated by LXR/RXR ligands. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 625-630.
- Ohgami, N, Nagai, R, Ikemoto, M, Arai, H, Kuniyasu, A, Horiuchi, S & Nakayama, H. (2001). CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products. *Ann N Y Acad Sci*, **947**, 350-355.
- Okamura, DM, Pennathur, S, Pasichnyk, K, Lopez-Guisa, JM, Collins, S, Febbraio, M, Heinecke, J & Eddy, AA. (2009). CD36 regulates oxidative stress and inflammation in hypercholesterolemic CKD. *J Am Soc Nephrol*, **20**, 495-505.
- Oquendo, P, Hundt, E, Lawler, J & Seed, B. (1989). CD36 directly mediates cytoadherence of Plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. *Cell*, **58**, 95-101.
- Osei-Hwedieh, DO, Amar, M, Sviridov, D & Remaley, AT. (2011). Apolipoprotein mimetic peptides: Mechanisms of action as anti-atherogenic agents. *Pharmacol Ther*, **130**, 83-91.
- Ostermann, G, Weber, KS, Zerneck, A, Schroder, A & Weber, C. (2002). JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol*, **3**, 151-158.
- Ou, X, Dai, X, Long, Z, Tang, Y, Cao, D, Hao, X, Hu, Y, Li, X & Tang, C. (2008). Liver X receptor agonist T0901317 reduces atherosclerotic lesions in apoE^{-/-} mice by up-regulating NPC1 expression. *Sci China C Life Sci*, **51**, 418-429.

- Oude Elferink, RP, Ottenhoff, R, van, WM, Frijters, CM, van, NC & Groen, AK. (1996). Uncoupling of biliary phospholipid and cholesterol secretion in mice with reduced expression of mdr2 P-glycoprotein. *J Lipid Res*, **37**, 1065-1075.
- Oude Elferink, RP, Ottenhoff, R, van, WM, Smit, JJ, Schinkel, AH & Groen, AK. (1995). Regulation of biliary lipid secretion by mdr2 P-glycoprotein in the mouse. *J Clin Invest*, **95**, 31-38.
- Out, R, Hoekstra, M, Hildebrand, RB, Kruit, JK, Meurs, I, Li, Z, Kuipers, F, van Berkel, TJ & Van, EM. (2006). Macrophage ABCG1 deletion disrupts lipid homeostasis in alveolar macrophages and moderately influences atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 2295-2300.
- Out, R, Hoekstra, M, Spijkers, JA, Kruijt, JK, Van, EM, Bos, IS, Twisk, J & van Berkel, TJ. (2004). Scavenger receptor class B type I is solely responsible for the selective uptake of cholesteryl esters from HDL by the liver and the adrenals in mice. *J Lipid Res*, **45**, 2088-2095.
- Ozer, NK, Negis, Y, Aytan, N, Villacorta, L, Ricciarelli, R, Zingg, JM & Azzi, A. (2006). Vitamin E inhibits CD36 scavenger receptor expression in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, **184**, 15-20.
- Packard, RR & Libby, P. (2008). Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem*, **54**, 24-38.
- Park, L, Wang, G, Zhou, P, Zhou, J, Pitstick, R, Previti, ML, Younkin, L, Younkin, SG, Van Nostrand, WE, Cho, S, Anrather, J, Carlson, GA & Iadecola, C. (2011). Scavenger receptor CD36 is essential for the cerebrovascular oxidative stress and neurovascular dysfunction induced by amyloid-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 5063-5068.
- Pasceri, V, Cheng, JS, Willerson, JT & Yeh, ET. (2001). Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation*, **103**, 2531-2534.
- Pasceri, V, Wu, HD, Willerson, JT & Yeh, ET. (2000). Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation*, **101**, 235-238.
- Pascual, G, Fong, AL, Ogawa, S, Gamliel, A, Li, AC, Perissi, V, Rose, DW, Willson, TM, Rosenfeld, MG & Glass, CK. (2005). A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature*, **437**, 759-763.
- Passlick, B, Flieger, D & Ziegler-Heitbrock, HW. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, **74**, 2527-2534.

- Patel, SN, Serghides, L, Smith, TG, Febbraio, M, Silverstein, RL, Kurtz, TW, Pravenec, M & Kain, KC. (2004). CD36 mediates the phagocytosis of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by rodent macrophages. *J Infect Dis*, **189**, 204-213.
- Pearce, SF, Roy, P, Nicholson, AC, Hajjar, DP, Febbraio, M & Silverstein, RL. (1998). Recombinant glutathione S-transferase/CD36 fusion proteins define an oxidized low density lipoprotein-binding domain. *J Biol Chem*, **273**, 34875-34881.
- Pearce, SFA, Wu, J & Silverstein, RL. (1995). Recombinant GST/CD36 fusion proteins define a thrombospondin binding domain. Evidence for a single calcium-dependent binding site on CD36. *J Biol Chem*, **270**, 2981-2986.
- Pendse, AA, Arbones-Mainar, JM, Johnson, LA, Altenburg, MK & Maeda, N. (2009). Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. *J Lipid Res*, **50 Suppl**, S178-S182.
- Peng, D, Hiipakka, RA, Dai, Q, Guo, J, Reardon, CA, Getz, GS & Liao, S. (2008). Antiatherosclerotic effects of a novel synthetic tissue-selective steroidal liver X receptor agonist in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther*, **327**, 332-342.
- Peng, D, Hiipakka, RA, Xie, JT, Dai, Q, Kokontis, JM, Reardon, CA, Getz, GS & Liao, S. (2011). A novel potent synthetic steroidal liver X receptor agonist lowers plasma cholesterol and triglycerides and reduces atherosclerosis in LDLR(-/-) mice. *Br J Pharmacol*, **162**, 1792-1804.
- Picard, E, Houssier, M, Bujold, K, Sapiuha, P, Lubell, W, Dorfman, A, Racine, J, Hardy, P, Febbraio, M, Lachapelle, P, Ong, H, Sennlaub, F & Chemtob, S. (2010). CD36 plays an important role in the clearance of oxLDL and associated age-dependent sub-retinal deposits. *Aging (Albany NY)*, **2**, 981-989.
- Pietsch, A, Erl, W & Lorenz, RL. (1996). Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells. *Biochem Pharmacol*, **52**, 433-439.
- Plosch, T, Kusters, A, Groen, AK & Kuipers, F. (2005). The ABC of hepatic and intestinal cholesterol transport. *Handb Exp Pharmacol*, 465-482.
- 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. (2002a). 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**, 38517-38523.
- 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. (2002b). Identification of a novel family

of oxidized phospholipids that serve as ligands for the macrophage scavenger receptor CD36. *J Biol Chem*, **277**, 38503-38516.

Poirier, H, Degrace, P, Niot, I, Bernard, A & Besnard, P. (1996). Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP). *Eur J Biochem*, **238**, 368-373.

Porcheray, F, Viaud, S, Rimaniol, AC, Leone, C, Samah, B, Dereuddre-Bosquet, N, Dormont, D & Gras, G. (2005). Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol*, **142**, 481-489.

Potteaux, S, Ait-Oufella, H & Mallat, Z. (2007). Mouse models of atherosclerosis. *Drug Discovery Today: Disease Models*, **4**, 165-170.

Prieto, J, Eklund, A & Patarroyo, M. (1994). Regulated expression of integrins and other adhesion molecules during differentiation of monocytes into macrophages. *Cell Immunol*, **156**, 191-211.

Puccetti, L, Sawamura, T, Pasqui, AL, Pastorelli, M, Auteri, A & Bruni, F. (2005). Atorvastatin reduces platelet-oxidized-LDL receptor expression in hypercholesterolaemic patients. *Eur J Clin Invest*, **35**, 47-51.

Puente Navazo, MD, Daviet, L, Ninio, E & McGregor, JL. (1996). Identification on human CD36 of a domain (155-183) implicated in binding oxidized low-density lipoproteins (Ox-LDL). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **16**, 1033-1039.

Rac, ME, Safranow, K & Poncyljusz, W. (2007). Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Mol Med*, **13**, 288-296.

Raffai, RL, Loeb, SM & Weisgraber, KH. (2005). Apolipoprotein E promotes the regression of atherosclerosis independently of lowering plasma cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 436-441.

Rahaman, SO, Lennon, DJ, Febbraio, M, Podrez, EA, Hazen, SL & Silverstein, RL. (2006). A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab*, **4**, 211-221.

Raines, EW & Ferri, N. (2005). Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *J Lipid Res*, **46**, 1081-1092.

Ranalletta, M, Wang, N, Han, S, Yvan-Charvet, L, Welch, C & Tall, AR. (2006). Decreased atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice transplanted with *Abcg1*^{-/-} bone marrow. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **26**, 2308-2315.

- Ravid, Z, Bendayan, M, Delvin, E, Sane, AT, Elchebly, M, Lafond, J, Lambert, M, Mailhot, G & Levy, E. (2008). Modulation of intestinal cholesterol absorption by high glucose levels: impact on cholesterol transporters, regulatory enzymes, and transcription factors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **295**, G873-G885.
- Ray, KK & Cannon, CP. (2005). The potential relevance of the multiple lipid-independent (pleiotropic) effects of statins in the management of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, **46**, 1425-1433.
- Reddick, RL, Zhang, SH & Maeda, N. (1994). Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arterioscler Thromb*, **14**, 141-147.
- Redondo, S, Martinez-Gonzalez, J, Urraca, C & Tejerina, T. (2011). Emerging therapeutic strategies to enhance HDL function. *Lipids Health Dis*, **10**, 175.
- Rege, TA, Stewart, J, Jr., Dranka, B, Benveniste, EN, Silverstein, RL & Gladson, CL. (2009). Thrombospondin-1-induced apoptosis of brain microvascular endothelial cells can be mediated by TNF-R1. *J Cell Physiol*, **218**, 94-103.
- Reiss, AB, Anwar, F, Chan, ES & Anwar, K. (2009). Disruption of cholesterol efflux by coxib medications and inflammatory processes: link to increased cardiovascular risk. *J Investig Med*, **57**, 695-702.
- Remick, J, Weintraub, H, Setton, R, Offenbacher, J, Fisher, E & Schwartzbard, A. (2008). Fibrate therapy: an update. *Cardiol Rev*, **16**, 129-141.
- Ren, J, Jin, W & Chen, H. (2010). oxHDL decreases the expression of CD36 on human macrophages through PPARgamma and p38 MAP kinase dependent mechanisms. *Mol Cell Biochem*, **342**, 171-181.
- Ren, Y, Silverstein, RL, Allen, J & Savill, J. (1995). CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med*, **181**, 1857-1862.
- Repa, JJ, Liang, G, Ou, J, Bashmakov, Y, Lobaccaro, JM, Shimomura, I, Shan, B, Brown, MS, Goldstein, JL & Mangelsdorf, DJ. (2000a). Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev*, **14**, 2819-2830.
- Repa, JJ & Mangelsdorf, DJ. (2002). The liver X receptor gene team: potential new players in atherosclerosis. *Nat Med*, **8**, 1243-1248.
- Repa, JJ, Turley, SD, Lobaccaro, JA, Medina, J, Li, L, Lustig, K, Shan, B, Heyman, RA, Dietschy, JM & Mangelsdorf, DJ. (2000b). Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science*, **289**, 1524-1529.

- Rhains, D, Brodeur, M, Lapointe, J, Charpentier, D, Falstrault, L & Brissette, L. (2003). The role of human and mouse hepatic scavenger receptor class B type I (SR-BI) in the selective uptake of low-density lipoprotein-cholesteryl esters. *Biochemistry*, **42**, 7527-7538.
- Ricci, R, Sumara, G, Sumara, I, Rozenberg, I, Kurrer, M, Akhmedov, A, Hersberger, M, Eriksson, U, Eberli, FR, Becher, B, Boren, J, Chen, M, Cybulsky, MI, Moore, KJ, Freeman, MW, Wagner, EF, Matter, CM & Luscher, TF. (2004). Requirement of JNK2 for scavenger receptor A-mediated foam cell formation in atherogenesis. *Science*, **306**, 1558-1561.
- Ricciarelli, R, Zingg, JM & Azzi, A. (2000). Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation*, **102**, 82-87.
- Ricote, M, Huang, J, Fajas, L, Li, A, Welch, J, Najib, J, Witztum, JL, Auwerx, J, Palinski, W & Glass, CK. (1998a). Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7614-7619.
- Ricote, M, Li, AC, Willson, TM, Kelly, CJ & Glass, CK. (1998b). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, **391**, 79-82.
- Ricote, M, Li, AC, Willson, TM, Kelly, CJ & Glass, CK. (1998c). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, **391**, 79-82.
- Ricote, M, Valledor, AF & Glass, CK. (2004). Decoding transcriptional programs regulated by PPARs and LXRs in the macrophage: effects on lipid homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **24**, 230-239.
- Riek, AE, Oh, J & Bernal-Mizrachi, C. (2010). Vitamin D regulates macrophage cholesterol metabolism in diabetes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **121**, 430-433.
- Rigamonti, E, Chinetti-Gbaguidi, G & Staels, B. (2008). Regulation of macrophage functions by PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LXRs in mice and men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **28**, 1050-1059.
- Rigamonti, E, Helin, L, Lestavel, S, Mutka, AL, Lepore, M, Fontaine, C, Bouhlef, MA, Bultel, S, Fruchart, JC, Ikonen, E, Clavey, V, Staels, B & Chinetti-Gbaguidi, G. (2005). Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. *Circ Res*, **97**, 682-689.
- Rigot, V, Hamon, Y, Chambenoit, O, Alibert, M, Duverger, N & Chimini, G. (2002). Distinct sites on ABCA1 control distinct steps required for cellular release of phospholipids. *J Lipid Res*, **43**, 2077-2086.

- Rigotti, A, Acton, SL & Krieger, M. (1995). The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem*, **270**, 16221-16224.
- Rigotti, A, Trigatti, BL, Penman, M, Rayburn, H, Herz, J & Krieger, M. (1997). A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type I reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12610-12615.
- Rodriguez-Manzaneque, JC, Lane, TF, Ortega, MA, Hynes, RO, Lawler, J & Iruela-Arispe, ML. (2001). Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12485-12490.
- Roglans, N, Vazquez-Carrera, M, Alegret, M, Novell, F, Zambon, D, Ros, E, Laguna, JC & Sanchez, RM. (2004). Fibrates modify the expression of key factors involved in bile-acid synthesis and biliary-lipid secretion in gallstone patients. *Eur J Clin Pharmacol*, **59**, 855-861.
- Rong, X, Li, Y, Ebihara, K, Zhao, M, Kusakabe, T, Tomita, T, Murray, M & Nakao, K. (2010). Irbesartan treatment up-regulates hepatic expression of PPARalpha and its target genes in obese Koletsky (fa(k)/fa(k)) rats: a link to amelioration of hypertriglyceridaemia. *Br J Pharmacol*, **160**, 1796-1807.
- Roselaar, SE & Daugherty, A. (1998). Apolipoprotein E-deficient mice have impaired innate immune responses to *Listeria monocytogenes* in vivo. *J Lipid Res*, **39**, 1740-1743.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, **340**, 115-126.
- Ross, R, Glomset, J & Harker, L. (1977). Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*, **86**, 675-684.
- Ross, R & Glomset, JA. (1973). Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*, **180**, 1332-1339.
- Rothblat, GH, Llera-Moya, M, Atger, V, Kellner-Weibel, G, Williams, DL & Phillips, MC. (1999). Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. *J Lipid Res*, **40**, 781-796.
- Rothblat, GH & Phillips, MC. (1986). Cholesterol efflux: mechanism and regulation. *Adv Exp Med Biol*, **201**, 195-204.
- Rothblat, GH & Phillips, MC. (2010). High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol*, **21**, 229-238.

- Rotllan, N, Llaverias, G, Julve, J, Jauhiainen, M, Calpe-Berdiel, L, Hernandez, C, Simo, R, Blanco-Vaca, F & Escola-Gil, JC. (2011). Differential effects of gemfibrozil and fenofibrate on reverse cholesterol transport from macrophages to feces in vivo. *Biochim Biophys Acta*, **1811**, 104-110.
- Roy, SK, Hu, J, Meng, Q, Xia, Y, Shapiro, PS, Reddy, SP, Plataniias, LC, Lindner, DJ, Johnson, PF, Pritchard, C, Pages, G, Pouyssegur, J & Kalvakolanu, DV. (2002). MEKK1 plays a critical role in activating the transcription factor C/EBP-beta-dependent gene expression in response to IFN-gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 7945-7950.
- Rubic, T & Lorenz, RL. (2006). Downregulated CD36 and oxLDL uptake and stimulated ABCA1/G1 and cholesterol efflux as anti-atherosclerotic mechanisms of interleukin-10. *Cardiovasc Res*, **69**, 527-535.
- Ruiz-Velasco, N, Dominguez, A & Vega, MA. (2004). Statins upregulate CD36 expression in human monocytes, an effect strengthened when combined with PPAR-gamma ligands Putative contribution of Rho GTPases in statin-induced CD36 expression. *Biochem Pharmacol*, **67**, 303-313.
- Rust, S, Rosier, M, Funke, H, Real, J, Amoura, Z, Piette, JC, Deleuze, JF, Brewer, HB, Duverger, N, Deneffe, P & Assmann, G. (1999). Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1. *Nat Genet*, **22**, 352-355.
- Ryeom, SW, Sparrow, JR & Silverstein, RL. (1996). CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J Cell Sci*, **109 (Pt 2)**, 387-395.
- Saederup, N, Chan, L, Lira, SA & Charo, IF. (2008). Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2^{-/-} mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation*, **117**, 1642-1648.
- Saha, P, Modarai, B, Humphries, J, Mattock, K, Waltham, M, Burnand, KG & Smith, A. (2009). The monocyte/macrophage as a therapeutic target in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol*, **9**, 109-118.
- Saha, SA & Arora, RR. (2011). Hyperlipidaemia and cardiovascular disease: do fibrates have a role? *Curr Opin Lipidol*, **22**, 270-276.
- Sakai, A, Kume, N, Nishi, E, Tanoue, K, Miyasaka, M & Kita, T. (1997). P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 are focally expressed in aortas of hypercholesterolemic rabbits before intimal accumulation of macrophages and T lymphocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 310-316.
- Sampson, MJ, Davies, IR, Braschi, S, Ivory, K & Hughes, DA. (2003). Increased expression of a scavenger receptor (CD36) in monocytes from subjects with Type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, **167**, 129-134.

Sankaranarayanan, S, Oram, JF, Asztalos, BF, Vaughan, AM, Lund-Katz, S, Adorni, MP, Phillips, MC & Rothblat, GH. (2009). Effects of acceptor composition and mechanism of ABCG1-mediated cellular free cholesterol efflux. *J Lipid Res*, **50**, 275-284.

Sarah Jane George & Jason Johnson. (2010). *Atherosclerosis: Molecular and Cellular Mechanisms*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim.

Savill, J, Hogg, N, Ren, Y & Haslett, C. (1992). Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest*, **90**, 1513-1522.

Scalia, R, Gooszen, ME, Jones, SP, Hoffmeyer, M, Rimmer, DM, III, Trocha, SD, Huang, PL, Smith, MB, Lefer, AM & Lefer, DJ. (2001). Simvastatin exerts both anti-inflammatory and cardioprotective effects in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, **103**, 2598-2603.

Scher, JU & Pillinger, MH. (2005). 15d-PGJ(2): The anti-inflammatory prostaglandin? *Clinical Immunology*, **114**, 100-109.

Schmidt, A, Endo, N, Rutledge, SJ, Vogel, R, Shinar, D & Rodan, GA. (1992). Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol Endocrinol*, **6**, 1634-1641.

Schmitz, G & Kaminski, WE. (2001). ABC transporters and cholesterol metabolism. *Front Biosci*, **6**, D505-D514.

Schmitz, G, Kaminski, WE & Orso, E. (2000). ABC transporters in cellular lipid trafficking. *Curr Opin Lipidol*, **11**, 493-501.

Schmitz, G, Langmann, T & Heimerl, S. (2001). Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J Lipid Res*, **42**, 1513-1520.

Schroeter, MR, Humboldt, T, Schafer, K & Konstantinides, S. (2009). Rosuvastatin reduces atherosclerotic lesions and promotes progenitor cell mobilisation and recruitment in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis*, **205**, 63-73.

Schultz, JR, Tu, H, Luk, A, Repa, JJ, Medina, JC, Li, L, Schwendner, S, Wang, S, Thoolen, M, Mangelsdorf, DJ, Lustig, KD & Shan, B. (2000). Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*, **14**, 2831-2838.

Schwenk, RW, Dirkx, E, Coumans, WA, Bonen, A, Klip, A, Glatz, JF & Luiken, JJ. (2010). Requirement for distinct vesicle-associated membrane proteins in insulin- and AMP-activated protein kinase (AMPK)-induced translocation of GLUT4 and CD36 in cultured cardiomyocytes. *Diabetologia*, **53**, 2209-2219.

- Schwenk, RW, Luiken, JJ, Bonen, A & Glatz, JF. (2008). Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease. *Cardiovasc Res*, **79**, 249-258.
- Sehayek, E & Hazen, SL. (2008). Cholesterol absorption from the intestine is a major determinant of reverse cholesterol transport from peripheral tissue macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **28**, 1296-1297.
- Seibert, K, Masferrer, J, Zhang, Y, Gregory, S, Olson, G, Hauser, S, Leahy, K, Perkins, W & Isakson, P. (1995). Mediation of inflammation by cyclooxygenase-2. *Agents Actions Suppl*, **46**, 41-50.
- Seibert, K & Masferrer, JL. (1994). Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor*, **4**, 17-23.
- Seres, L, Cserepes, J, Elkind, NB, Torocsik, D, Nagy, L, Sarkadi, B & Homolya, L. (2008). Functional ABCG1 expression induces apoptosis in macrophages and other cell types. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 2378-2387.
- Serghides, L, Smith, TG, Patel, SN & Kain, KC. (2003). CD36 and malaria: friends or foes? *Trends Parasitol*, **19**, 461-469.
- Sethi, AA, Amar, M, Shamburek, RD & Remaley, AT. (2007). Apolipoprotein AI mimetic peptides: possible new agents for the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs*, **8**, 201-212.
- Shao, D, Rangwala, SM, Bailey, ST, Krakow, SL, Reginato, MJ & Lazar, MA. (1998). Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature*, **396**, 377-380.
- Shaw, SK, Bamba, PS, Perkins, BN & Luscinskas, FW. (2001). Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol*, **167**, 2323-2330.
- Shelness, GS & Sellers, JA. (2001). Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol*, **12**, 151-157.
- Shi, W, Haberland, ME, Jien, ML, Shih, DM & Lusis, AJ. (2000). Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice. *Circulation*, **102**, 75-81.
- Silverstein, RL & Febbraio, M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal*, **2**, re3.
- Simantov, R, Febbraio, M, Crombie, R, Asch, AS, Nachman, RL & Silverstein, RL. (2001). Histidine-rich glycoprotein inhibits the antiangiogenic effect of thrombospondin-1. *J Clin Invest*, **107**, 45-52.

Smit, JJ, Schinkel, AH, Oude Elferink, RP, Groen, AK, Wagenaar, E, van, DL, Mol, CA, Ottenhoff, R, van der Lugt, NM, van Roon, MA & . (1993). Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell*, **75**, 451-462.

Smith, JD, Waelde, C, Horwitz, A & Zheng, P. (2002). Evaluation of the role of phosphatidylserine translocase activity in ABCA1-mediated lipid efflux. *J Biol Chem*, **277**, 17797-17803.

Smith, WL, Dewitt, DL & Garavito, RM. (2000). Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, **69**, 145-182.

Stein, O & Stein, Y. (2005). Lipid transfer proteins (LTP) and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **178**, 217-230.

Steinberg, D, Parthasarathy, S, Carew, TE, Khoo, JC & Witztum, JL. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, **320**, 915-924.

Stewart, CR, Stuart, LM, Wilkinson, K, van Gils, JM, Deng, J, Halle, A, Rayner, KJ, Boyer, L, Zhong, R, Frazier, WA, Lacy-Hulbert, A, El, KJ, Golenbock, DT & Moore, KJ. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*, **11**, 155-161.

Stieger, B. (2009). Recent insights into the function and regulation of the bile salt export pump (ABCB11). *Curr Opin Lipidol*, **20**, 176-181.

Stocker, R & Keaney, JF, Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, **84**, 1381-1478.

Stuart, LM, Bell, SA, Stewart, CR, Silver, JM, Richard, J, Goss, JL, Tseng, AA, Zhang, A, El Khoury, JB & Moore, KJ. (2007). CD36 signals to the actin cytoskeleton and regulates microglial migration via a p130Cas complex. *J Biol Chem*, **282**, 27392-27401.

Stuart, LM, Deng, J, Silver, JM, Takahashi, K, Tseng, AA, Hennessy, EJ, Ezekowitz, RA & Moore, KJ. (2005a). Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol*, **170**, 477-485.

Stuart, LM, Deng, J, Silver, JM, Takahashi, K, Tseng, AA, Hennessy, EJ, Ezekowitz, RA & Moore, KJ. (2005b). Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol*, **170**, 477-485.

Sturek, JM, Castle, JD, Trace, AP, Page, LC, Castle, AM, Evans-Molina, C, Parks, JS, Mirmira, RG & Hedrick, CC. (2010). An intracellular role for ABCG1-mediated

cholesterol transport in the regulated secretory pathway of mouse pancreatic beta cells. *J Clin Invest*, **120**, 2575-2589.

Su, X & Abumrad, NA. (2009). Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. *Trends Endocrinol Metab*, **20**, 72-77.

Su, X, Maguire-Zeiss, KA, Giuliano, R, Prifti, L, Venkatesh, K & Federoff, HJ. (2008). Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, **29**, 1690-1701.

Sumara, G, Belwal, M & Ricci, R. (2005). "Jnking" atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 2487-2494.

Sun, J, Hopkins, BD, Tsujikawa, K, Perruzzi, C, Adini, I, Swerlick, R, Bornstein, P, Lawler, J & Benjamin, LE. (2009). Thrombospondin-1 modulates VEGF-A-mediated Akt signaling and capillary survival in the developing retina. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **296**, H1344-H1351.

Surh, YJ, Na, HK, Park, JM, Lee, HN, Kim, W, Yoon, IS & Kim, DD. (2011). 15-Deoxy-Delta(1)(2),(1)-prostaglandin J, an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. *Biochem Pharmacol*, **82**, 1335-1351.

Swerlick, RA, Lee, KH, Wick, TM & Lawley, TJ. (1992). Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. *J Immunol*, **148**, 78-83.

Swirski, FK, Libby, P, Aikawa, E, Alcaide, P, Luscinskas, FW, Weissleder, R & Pittet, MJ. (2007). Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytois and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest*, **117**, 195-205.

Szanto, A, Benko, S, Szatmari, I, Balint, BL, Furtos, I, Ruhl, R, Molnar, S, Csiba, L, Garuti, R, Calandra, S, Larsson, H, Diczfalusy, U & Nagy, L. (2004). Transcriptional regulation of human CYP27 integrates retinoid, peroxisome proliferator-activated receptor, and liver X receptor signaling in macrophages. *Mol Cell Biol*, **24**, 8154-8166.

Tabit, CE, Chung, WB, Hamburg, NM & Vita, JA. (2010). Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord*, **11**, 61-74.

Tacke, F, Alvarez, D, Kaplan, TJ, Jakubzick, C, Spanbroek, R, Llodra, J, Garin, A, Liu, J, Mack, M, van, RN, Lira, SA, Habenicht, AJ & Randolph, GJ. (2007). Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, **117**, 185-194.

Takata, Y, Liu, J, Yin, F, Collins, AR, Lyon, CJ, Lee, CH, Atkins, AR, Downes, M, Barish, GD, Evans, RM, Hsueh, WA & Tangirala, RK. (2008). PPARdelta-mediated

antiinflammatory mechanisms inhibit angiotensin II-accelerated atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 4277-4282.

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. (2008). Oxidized low density lipoprotein activates peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) and PPARgamma through MAPK-dependent COX-2 expression in macrophages. *J Biol Chem*, **283**, 9852-9862.

Tall, AR. (2008). Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the athero-protective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med*, **263**, 256-273.

Tall, AR, Yvan-Charvet, L, Terasaka, N, Pagler, T & Wang, N. (2008). HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab*, **7**, 365-375.

Tandon, NN, Kralisz, U & Jamieson, GA. (1989a). Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J Biol Chem*, **264**, 7576-7583.

Tandon, NN, Lipsky, RH, Burgess, WH & Jamieson, GA. (1989b). Isolation and characterization of platelet glycoprotein IV (CD36). *J Biol Chem*, **264**, 7570-7575.

Tangirala, RK, Bischoff, ED, Joseph, SB, Wagner, BL, Walczak, R, Laffitte, BA, Daige, CL, Thomas, D, Heyman, RA, Mangelsdorf, DJ, Wang, X, Lusis, AJ, Tontonoz, P & Schulman, IG. (2002). Identification of macrophage liver X receptors as inhibitors of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11896-11901.

Tangirala, RK, Rubin, EM & Palinski, W. (1995). Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res*, **36**, 2320-2328.

Tao, N, Wagner, SJ & Lublin, DM. (1996). CD36 is palmitoylated on both N- and C-terminal cytoplasmic tails. *J Biol Chem*, **271**, 22315-22320.

Tarling, EJ & Edwards, PA. (2011). ATP binding cassette transporter G1 (ABCG1) is an intracellular sterol transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 19719-19724.

Temel, RE, Sawyer, JK, Yu, L, Lord, C, Degirolamo, C, McDaniel, A, Marshall, S, Wang, N, Shah, R, Rudel, LL & Brown, JM. (2010). Biliary sterol secretion is not required for macrophage reverse cholesterol transport. *Cell Metab*, **12**, 96-102.

Terasaka, N, Hiroshima, A, Koieyama, T, Ubukata, N, Morikawa, Y, Nakai, D & Inaba, T. (2003). T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Lett*, **536**, 6-11.

- Terasaka, N, Wang, N, Yvan-Charvet, L & Tall, AR. (2007). High-density lipoprotein protects macrophages from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by promoting efflux of 7-ketocholesterol via ABCG1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 15093-15098.
- Tham, DM, Martin-McNulty, B, Wang, YX, Wilson, DW, Vergona, R, Sullivan, ME, Dole, W & Rutledge, JC. (2002). Angiotensin II is associated with activation of NF-kappaB-mediated genes and downregulation of PPARs. *Physiol Genomics*, **11**, 21-30.
- Tiwari, RL, Singh, V & Barthwal, MK. (2008). Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis. *Med Res Rev*, **28**, 483-544.
- Tonelli, M, Lloyd, A, Clement, F, Conly, J, Husereau, D, Hemmelgarn, B, Klarenbach, S, McAlister, FA, Wiebe, N & Manns, B. (2011). Efficacy of statins for primary prevention in people at low cardiovascular risk: a meta-analysis. *CMAJ*, **183**, E1189-E1202.
- Tontonoz, P & Mangelsdorf, DJ. (2003). Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease. *Mol Endocrinol*, **17**, 985-993.
- Tontonoz, P & Nagy, L. (1999). Regulation of macrophage gene expression by peroxisome-proliferator-activated receptor gamma: implications for cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, **10**, 485-490.
- Tontonoz, P, Nagy, L, Alvarez, JG, Thomazy, VA & Evans, RM. (1998). PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, **93**, 241-252.
- Toussaint, J-F, Jacob, M-P, Lagrost, L & Chapman, J. (2003). *Athérosclérose: physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques*. Masson: Paris.
- Triantafilou, M, Gamper, FG, Haston, RM, Mouratis, MA, Morath, S, Hartung, T & Triantafilou, K. (2006). Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem*, **281**, 31002-31011.
- Tserentsoodol, N, Gordiyenko, NV, Pascual, I, Lee, JW, Fliesler, SJ & Rodriguez, IR. (2006). Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors. *Mol Vis*, **12**, 1319-1333.
- Ueda, Y, Royer, L, Gong, E, Zhang, J, Cooper, PN, Francone, O & Rubin, EM. (1999). Lower plasma levels and accelerated clearance of high density lipoprotein (HDL) and non-HDL cholesterol in scavenger receptor class B type I transgenic mice. *J Biol Chem*, **274**, 7165-7171.
- van Bilsen, M & van Nieuwenhoven, FA. (2010). PPARs as therapeutic targets in cardiovascular disease. *Expert Opin Ther Targets*, **14**, 1029-1045.

- van der Hoorn, J, Linden, D, Lindahl, U, Bekkers, M, Voskuilen, M, Nilsson, R, Oscarsson, J, Lindstedt, E & Princen, H. (2011). Low dose of the liver X receptor agonist, AZ876, reduces atherosclerosis in APOE*3Leiden mice without affecting liver or plasma triglyceride levels. *Br J Pharmacol*, **162**, 1553-1563.
- van der Veen, JN, van Dijk, TH, Vrins, CL, van, MH, Havinga, R, Bijsterveld, K, Tietge, UJ, Groen, AK & Kuipers, F. (2009). Activation of the liver X receptor stimulates trans-intestinal excretion of plasma cholesterol. *J Biol Chem*, **284**, 19211-19219.
- van der Velde, AE & Groen, AK. (2005). Shifting gears: liver SR-BI drives reverse cholesterol transport in macrophages. *J Clin Invest*, **115**, 2699-2701.
- Van Oort, MM, van Doorn, JM, Bonen, A, Glatz, JF, Van der Horst, DJ, Rodenburg, KW & Luiken, JJ. (2008). Insulin-induced translocation of CD36 to the plasma membrane is reversible and shows similarity to that of GLUT4. *Biochim Biophys Acta*, **1781**, 61-71.
- Van Oosten M., Rensen, PC, Van Amersfoort, ES, Van, EM, Van Dam, AM, Breve, JJ, Vogel, T, Panet, A, van Berkel, TJ & Kuiper, J. (2001). Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. A new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis. *J Biol Chem*, **276**, 8820-8824.
- van, BA, Werder, M, Thuahnai, ST, Han, CH, Duong, P, Williams, DL, Wettstein, P, Schulthess, G, Phillips, MC & Hauser, H. (2005). Class B scavenger receptor-mediated intestinal absorption of dietary beta-carotene and cholesterol. *Biochemistry*, **44**, 4517-4525.
- Varban, ML, Rinninger, F, Wang, N, Fairchild-Huntress, V, Dunmore, JH, Fang, Q, Gosselin, ML, Dixon, KL, Deeds, JD, Acton, SL, Tall, AR & Huszar, D. (1998). Targeted mutation reveals a central role for SR-BI in hepatic selective uptake of high density lipoprotein cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4619-4624.
- Vaughan, AM & Oram, JF. (2005). ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J Biol Chem*, **280**, 30150-30157.
- Vaughan, AM & Oram, JF. (2006). ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res*, **47**, 2433-2443.
- Vedhachalam, C, Duong, PT, Nickel, M, Nguyen, D, Dhanasekaran, P, Saito, H, Rothblat, GH, Lund-Katz, S & Phillips, MC. (2007). Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem*, **282**, 25123-25130.
- Venkateswaran, A, Laffitte, BA, Joseph, SB, Mak, PA, Wilpitz, DC, Edwards, PA & Tontonoz, P. (2000a). Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12097-12102.

- Venkateswaran, A, Repa, JJ, Lobaccaro, JM, Bronson, A, Mangelsdorf, DJ & Edwards, PA. (2000b). Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem*, **275**, 14700-14707.
- Venugopal, SK, Devaraj, S & Jialal, I. (2004). RRR-alpha-tocopherol decreases the expression of the major scavenger receptor, CD36, in human macrophages via inhibition of tyrosine kinase (Tyk2). *Atherosclerosis*, **175**, 213-220.
- Verschuren, L, de Vries-van der Weij, Zadelaar, S, Kleemann, R & Kooistra, T. (2009). LXR agonist suppresses atherosclerotic lesion growth and promotes lesion regression in apoE*3Leiden mice: time course and mechanisms. *J Lipid Res*, **50**, 301-311.
- Villines, TC, Kim, AS, Gore, RS & Taylor, AJ. (2011). Niacin: The Evidence, Clinical Use, and Future Directions. *Curr Atheroscler Rep*.
- Vinals, M, Bermudez, I, Llaverias, G, Alegret, M, Sanchez, RM, Vazquez-Carrera, M & Laguna, JC. (2005). Aspirin increases CD36, SR-BI, and ABCA1 expression in human THP-1 macrophages. *Cardiovasc Res*, **66**, 141-149.
- Virchow, R. (1856). Phlogose und Thrombose im Gefasssystem. pp. 458-521. Frankfurt-am-Main: F Meidinger Sohn and Company.
- Voloshyna, I & Reiss, AB. (2011). The ABC transporters in lipid flux and atherosclerosis. *Prog Lipid Res*, **50**, 213-224.
- Volpert, OV, Pili, R, Sikder, HA, Nelius, T, Zaichuk, T, Morris, C, Shiflett, CB, Devlin, MK, Conant, K & Alani, RM. (2002). Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. *Cancer Cell*, **2**, 473-483.
- Wang, HH, Lammert, F, Schmitz, A & Wang, DQ. (2010). Transgenic overexpression of Abcb11 enhances biliary bile salt outputs, but does not affect cholesterol cholelithogenesis in mice. *Eur J Clin Invest*, **40**, 541-551.
- Wang, N, Chen, W, Linsel-Nitschke, P, Martinez, LO, Agerholm-Larsen, B, Silver, DL & Tall, AR. (2003a). A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I. *J Clin Invest*, **111**, 99-107.
- Wang, N, Lan, D, Chen, W, Matsuura, F & Tall, AR. (2004). ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 9774-9779.
- Wang, R, Lam, P, Liu, L, Forrest, D, Yousef, IM, Mignault, D, Phillips, MJ & Ling, V. (2003b). Severe cholestasis induced by cholic acid feeding in knockout mice of sister of P-glycoprotein. *Hepatology*, **38**, 1489-1499.

- Wang, X, Collins, HL, Ranalletta, M, Fuki, IV, Billheimer, JT, Rothblat, GH, Tall, AR & Rader, DJ. (2007). Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest*, **117**, 2216-2224.
- Wang, Y, Van Oort, MM, Yao, M, Van der Horst, DJ & Rodenburg, KW. (2011). Insulin and chromium picolinate induce translocation of CD36 to the plasma membrane through different signaling pathways in 3T3-L1 adipocytes, and with a differential functionality of the CD36. *Biol Trace Elem Res*, **142**, 735-747.
- Warner, GJ, Stoudt, G, Bamberger, M, Johnson, WJ & Rothblat, GH. (1995). Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol. *J Biol Chem*, **270**, 5772-5778.
- Wasan, KM, Brocks, DR, Lee, SD, Sachs-Barrable, K & Thornton, SJ. (2008). Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, **7**, 84-99.
- Watson, JM, Harding, TW, Golubovskaya, V, Morris, JS, Hunter, D, Li, X, Haskill, JS & Earp, HS. (2001). Inhibition of the calcium-dependent tyrosine kinase (CADTK) blocks monocyte spreading and motility. *J Biol Chem*, **276**, 3536-3542.
- Watts, GF, Barrett, PH & Chan, DC. (2008). HDL metabolism in context: looking on the bright side. *Curr Opin Lipidol*, **19**, 395-404.
- Weber, C & Noels, H. (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*, **17**, 1410-1422.
- Weber, C & Soehnlein, O. (2011). ApoE controls the interface linking lipids and inflammation in atherosclerosis. *J Clin Invest*, **121**, 3825-3827.
- Weber, O, Bischoff, H, Schmeck, C & Bottcher, MF. (2010). Cholesteryl ester transfer protein and its inhibition. *Cell Mol Life Sci*, **67**, 3139-3149.
- Weiss, D, Kools, JJ & Taylor, WR. (2001). Angiotensin II-induced hypertension accelerates the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Circulation*, **103**, 448-454.
- Werb, Z & Chin, JR. (1983). Onset of apoprotein E secretion during differentiation of mouse bone marrow-derived mononuclear phagocytes. *J Cell Biol*, **97**, 1113-1118.
- Werder, M, Han, CH, Wehrli, E, Bimmler, D, Schulthess, G & Hauser, H. (2001). Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine. *Biochemistry*, **40**, 11643-11650.
- Weyrich, AS, McIntyre, TM, McEver, RP, Prescott, SM & Zimmerman, GA. (1995). Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor

necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J Clin Invest*, **95**, 2297-2303.

Widlansky, ME, Gokce, N, Keaney, JF, Jr. & Vita, JA. (2003). The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, **42**, 1149-1160.

Wilkinson, B, Koenigsnecht-Talboo, J, Grommes, C, Lee, CY & Landreth, G. (2006). Fibrillar beta-amyloid-stimulated intracellular signaling cascades require Vav for induction of respiratory burst and phagocytosis in monocytes and microglia. *J Biol Chem*, **281**, 20842-20850.

Williams, DL, Connelly, MA, Temel, RE, Swarnakar, S, Phillips, MC, Llera-Moya, M & Rothblat, GH. (1999). Scavenger receptor BI and cholesterol trafficking. *Curr Opin Lipidol*, **10**, 329-339.

Wojcik, AJ, Skafien, MD, Srinivasan, S & Hedrick, CC. (2008). A critical role for ABCG1 in macrophage inflammation and lung homeostasis. *J Immunol*, **180**, 4273-4282.

Woollard, KJ & Geissmann, F. (2010). Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol*, **7**, 77-86.

Wu, JE, Basso, F, Shamburek, RD, Amar, MJ, Vaisman, B, Szakacs, G, Joyce, C, Tansey, T, Freeman, L, Paigen, BJ, Thomas, F, Brewer, HB, Jr. & Santamarina-Fojo, S. (2004). Hepatic ABCG5 and ABCG8 overexpression increases hepatobiliary sterol transport but does not alter aortic atherosclerosis in transgenic mice. *J Biol Chem*, **279**, 22913-22925.

Wu, KK. (2005). Control of cyclooxygenase-2 transcriptional activation by pro-inflammatory mediators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **72**, 89-93.

Wu, KK, Liou, JY & Cieslik, K. (2005). Transcriptional Control of COX-2 via C/EBPbeta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **25**, 679-685.

Wuttge, DM, Romert, A, Eriksson, U, Torma, H, Hansson, GK & Sirsjo, A. (2001). Induction of CD36 by all-trans retinoic acid: retinoic acid receptor signaling in the pathogenesis of atherosclerosis. *FASEB J*, **15**, 1221-1223.

Xie, C, Ng, H & Nagarajan, S. (2011). OxLDL or TLR2-induced cytokine response is enhanced by oxLDL-independent novel domain on mouse CD36. *Immunol Lett*, **137**, 15-27.

Yan, W, Zhang, T, Cheng, J, Zhou, X, Qu, X & Hu, H. (2010). Liver X receptor agonist methyl-3beta-hydroxy-5alpha,6alpha-epoxycholesterol attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice without increasing plasma triglyceride. *Pharmacology*, **86**, 306-312.

- Yancey, PG, Bortnick, AE, Kellner-Weibel, G, Llera-Moya, M, Phillips, MC & Rothblat, GH. (2003). Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 712-719.
- Yancey, PG, Llera-Moya, M, Swarnakar, S, Monzo, P, Klein, SM, Connelly, MA, Johnson, WJ, Williams, DL & Rothblat, GH. (2000). High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J Biol Chem*, **275**, 36596-36604.
- Yang, Y, Chen, M, Loux, TJ & Harmon, CM. (2007). Regulation of FAT/CD36 mRNA gene expression by long chain fatty acids in the differentiated 3T3-L1 cells. *Pediatr Surg Int*, **23**, 675-683.
- 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. (2007). 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*, **100**, 1442-1451.
- Ye, Y, Nishi, SP, Manickavasagam, S, Lin, Y, Huang, MH, Perez-Polo, JR, Uretsky, BF & Birnbaum, Y. (2007). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) by atorvastatin is mediated by 15-deoxy-delta-12,14-PGJ2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **84**, 43-53.
- Yehualaeshet, T, O'Connor, R, Green-Johnson, J, Mai, S, Silverstein, R, Murphy-Ullrich, JE & Khalil, N. (1999). Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36. *Am J Pathol*, **155**, 841-851.
- Yesner, LM, Huh, HY, Pearce, SF & Silverstein, RL. (1996). Regulation of monocyte CD36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **16**, 1019-1025.
- Yona, S & Jung, S. (2010). Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Curr Opin Hematol*, **17**, 53-59.
- Young, IS & McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*, **29**, 358-362.
- Yu, L, Bharadwaj, S, Brown, JM, Ma, Y, Du, W, Davis, MA, Michaely, P, Liu, P, Willingham, MC & Rudel, LL. (2006). Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J Biol Chem*, **281**, 6616-6624.
- Yu, L, Hammer, RE, Li-Hawkins, J, von, BK, Lutjohann, D, Cohen, JC & Hobbs, HH. (2002a). Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16237-16242.

- Yu, L, Li-Hawkins, J, Hammer, RE, Berge, KE, Horton, JD, Cohen, JC & Hobbs, HH. (2002b). Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest*, **110**, 671-680.
- Yu, L, York, J, von, BK, Lutjohann, D, Cohen, JC & Hobbs, HH. (2003). Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem*, **278**, 15565-15570.
- Yun, MR, Im, DS, Lee, SJ, Park, HM, Bae, SS, Lee, WS & Kim, CD. (2009). 4-Hydroxynonenal enhances CD36 expression on murine macrophages via p38 MAPK-mediated activation of 5-lipoxygenase. *Free Radic Biol Med*, **46**, 692-698.
- Yun, MR, Im, DS, Lee, SJ, Woo, JW, Hong, KW, Bae, SS & Kim, CD. (2008). 4-hydroxynonenal contributes to macrophage foam cell formation through increased expression of class A scavenger receptor at the level of translation. *Free Radic Biol Med*, **45**, 177-183.
- Yusuf-Makagiansar, H, Anderson, ME, Yakovleva, TV, Murray, JS & Siahhan, TJ. (2002). Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev*, **22**, 146-167.
- Yvan-Charvet, L, Pagler, TA, Seimon, TA, Thorp, E, Welch, CL, Witztum, JL, Tabas, I & Tall, AR. (2010). ABCA1 and ABCG1 protect against oxidative stress-induced macrophage apoptosis during efferocytosis. *Circ Res*, **106**, 1861-1869.
- Yvan-Charvet, L, Ranalletta, M, Wang, N, Han, S, Terasaka, N, Li, R, Welch, C & Tall, AR. (2007). Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J Clin Invest*, **117**, 3900-3908.
- Zadelaar, S, Kleemann, R, Verschuren, L, de Vries-van der Weij, van der Hoorn, J, Princen, HM & Kooistra, T. (2007). Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **27**, 1706-1721.
- Zanotti, I, Poti, F, Pedrelli, M, Favari, E, Moleri, E, Franceschini, G, Calabresi, L & Bernini, F. (2008). The LXR agonist T0901317 promotes the reverse cholesterol transport from macrophages by increasing plasma efflux potential. *J Lipid Res*, **49**, 954-960.
- Zelcer, N & Tontonoz, P. (2006). Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling. *J Clin Invest*, **116**, 607-614.
- Zhang, W, Yancey, PG, Su, YR, Babaev, VR, Zhang, Y, Fazio, S & Linton, MF. (2003). Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, **108**, 2258-2263.

- Zhao, ZZ, Wang, Z, Li, GH, Wang, R, Tan, JM, Cao, X, Suo, R & Jiang, ZS. (2011). Hydrogen sulfide inhibits macrophage-derived foam cell formation. *Exp Biol Med (Maywood)*, **236**, 169-176.
- Zhou, C, King, N, Chen, KY & Breslow, JL. (2009). Activation of PXR induces hypercholesterolemia in wild-type and accelerates atherosclerosis in apoE deficient mice. *J Lipid Res*, **50**, 2004-2013.
- Zhou, J, Febbraio, M, Wada, T, Zhai, Y, Kuruba, R, He, J, Lee, JH, Khadem, S, Ren, S, Li, S, Silverstein, RL & Xie, W. (2008). Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology*, **134**, 556-567.
- Zhou, J, Zhai, Y, Mu, Y, Gong, H, Uppal, H, Toma, D, Ren, S, Evans, RM & Xie, W. (2006). A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway. *J Biol Chem*, **281**, 15013-15020.
- Ziegler-Heitbrock, HW, Thiel, E, Futterer, A, Herzog, V, Wirtz, A & Riethmuller, G. (1988). Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer*, **41**, 456-461.
- Ziegler-Heitbrock, L. (2007). The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol*, **81**, 584-592.
- Zingg, JM, Libinaki, R, Lai, CQ, Meydani, M, Gianello, R, Ogru, E & Azzi, A. (2010). Modulation of gene expression by alpha-tocopherol and alpha-tocopheryl phosphate in THP-1 monocytes. *Free Radic Biol Med*, **49**, 1989-2000.
- Zuckerman, SH, Panousis, C, Mizrahi, J & Evans, G. (2000). The effect of gamma-interferon to inhibit macrophage-high density lipoprotein interactions is reversed by 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin J2. *Lipids*, **35**, 1239-1247.